



TESIS DE DOCTORADO

**ESTUDIO DE LA ACCIÓN DEL
PROPÓLEO SOBRE LAS
BACTERIAS PATÓGENAS DEL
TRACTO GASTROINTESTINAL
DE POLLOS DE ENGORDE**

Manly Enrique Espinosa Benavides

**ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA Y SANIDAD
VETERINARIA**

LUGO 2020



D./Dña. **Manly Enrique Espinosa Benavides**

Título da tese: **“Estudio de la acción del propóleo sobre las bacterias patógenas del tractogastrointestinal de pollos de engorde”**

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

- 1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.
- 2) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En Ibarra, 16 de noviembre de 2020.

Firma electrónica



Firmado electrónicamente por:
**MANLY ENRIQUE
ESPINOSA
BENAVIDES**

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA





DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

D. Manly Enrique Espinosa Benavides

Titulo de la Tesis:

“Estudio de la acción del propóleo sobre las bacterias patógenas del tracto gastrointestinal de pollos de engorde”

(Estudo da acción do propóleo sobre as bacterias patóxenas do tracto gastrointestinal dos asadores)

Presento el documento final del trabajo de doctorado y declaro categoricamente, no tener conflicto de intereses creados ya que no ha sido financiado por ninguna empresa en particular, y no se han desarrollado patentes fruto de los resultados de la presente investigación.

(Presento o documento final do traballo de doutoramento e declaro categoricamente que non teño ningún conflito de intereses xa que non foi financiado por ningunha empresa en particular e non se desenvolveron patentes como resultado dos resultados desta investigación.)

Ibarra, 18 de enero de 2021



Firmado electrónicamente por:
**MANLY ENRIQUE
ESPINOSA
BENAVIDES**

Manly Enrique Espinosa Benavides.

Estudiante de doctoramiento



D./Dña. **José Manuel Miranda López**

En condición de: **Director/a**

Título de la tesis: **Estudio de la acción del propóleo sobre las bacterias patógenas del tracto gastrointestinal de pollos de engorde**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/Dña **Many Enrique Espinosa Benavides**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **Lugo, 14 de noviembre de 2020**

Firma electrónica



Sinatura dixital / Firma digital / Digital signature

Asinante/Firmante/Signer: JOSE MANUEL MIRANDA LOPEZ, NIF 52456830V, 16/11/2020 09:39:52.

CSV: 85C3-BB7A-473C-B755



D./Dña. **Carlos Manuel Franco Abuín**

En condición de: **Tutor/a**

Título de la tesis: **Estudio de la acción del propóleo sobre las bacterias patógenas del tractogastrointestinal de pollos de engorde**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/Dña **Manly Enrique Espinosa Banavides**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **Lugo, 16 de noviembre de 2020**

Firma electrónica



Sinatura dixital / Firma digital / Digital signature

Asinante/Firmante/Signer: CARLOS MANUEL FRANCO ABUIN, NIF 33861565E, 16/11/2020 10:07:44.

CSV: 7312-F9AB-44ED-B465



AGRADECIMIENTOS

Al haber culminado con mucha dedicación y esfuerzo esta tesis doctoral, quiero dejar impreso mi sentimiento más sentido de gratitud a quienes, se han constituido como los soportes fundamentales para poder llevarla a feliz término.

Primero a mi **Buen Dios** que me ha permitido la bendición de poder ser parte de esta etapa de formación, por las bendiciones recibidas en toda mi vida y a lo largo de estos años de desarrollo del trabajo en general, para ¡Ti Señor sea la gloria y la alabanza!

A mi amada **Lorena**, que ha sido realmente mi esposa y compañera en todos los momentos tan difíciles, que me ha tocado sobrellevar durante los últimos años, convirtiéndose en un baluarte de abnegación, entrega y fidelidad, incluso soportando mis momentos de apremio y mal humor.

A mis hijitos: **Monserath del Cisne, Manly Ricardo, Mateo Josué y Paulo Reynel**, pues son la inspiración y el motivo comprometedor para continuar y no desmayar en este proyecto y anhelo de superación personal y familiar.

A mis queridos **Adelita y Enrique**, mis papacitos, a los cuales les ofrecí algún día darles esta alegría que es el complemento de mi formación iniciada gracias a ellos que me enseñaron a buscar el conocimiento desde mi etapa de niñez, a su paciencia y apoyo constante, nunca han perdido la fe en mi capacidad y nunca dejaron de dirigir sus oraciones por mí.

A mis hermanos **Wilmer, Janneth, Omey y Bayrón** que han sabido acompañarme con sus buenos deseos y consejos, además de aquel sentimiento de cariño, con el que me demuestran su amor y su confianza, que es una de mis fuentes de energía para la consecución de mis objetivos.

Al programa de **doctoramiento en Medicina y Sanidad Veterinaria de la USC**, en sus directivos y personal de apoyo por la coordinación diligente de todas las actividades referentes a colegiaturas anuales.

Es momento de agradecer a una persona extraordinaria como es el **Dr. José Manuel Miranda**, director del presente trabajo de Tesis, quien, con sus conocimientos y ayuda continua, ha sabido guiar acertadamente el desarrollo de esta investigación, pero mayor gratitud y admiración por su paciencia y colaboración generosa para culminar correctamente esta tesis doctoral.

A la **PUCESI** que, con su apoyo administrativo y logístico, me facilitó las instalaciones de laboratorios y granja experimental de la ECAA, para la realización de pruebas y ensayos correspondientes a la temática del trabajo, en especial a quienes han conformado el departamento de investigaciones, que siempre apoyaron para salir adelante con el proyecto.

A muchos de mis compañeros de trabajo que de una u otra forma han colaborado compartiendo sus conocimientos, experiencias y su apoyo siendo motivadores para continuar y culminar esta meta como son: Valdemar Andrade, Santiago Mafla, Diego León, Diego Jauregui, Vicente Cadena, Luis Haro y José Cañamar.

De igual forma quiero dejar constancia de mi agradecimiento a los becarios: Carla Rojas, Daniel Buitrón, Tania Mantilla, Lennin Morillo y Hugo Córdova, quienes me acompañaron desinteresadamente en las distintas fases de estudio del presente trabajo doctoral.

Y en general mi gratitud a todas las personas que de una u otra manera, colaboraron, dándome ánimo y sobre todo su confianza, respeto y afecto durante la etapa de trabajo de la presente tesis doctoral.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

Agrocalidad: Agencia de regulación y control Fito y Zoonosanitario.

AMR: Antimicrobial resistance (Infecciones resistentes a antimicrobianos).

APC: Antibiótico promotor de crecimiento.

BPAs: Buenas prácticas Avícolas.

CA: Conversión alimenticia.

CMB: Concentración mínima bactericida.

CMI: Concentración mínima inhibitoria.

CONAVE: Corporación Nacional de Avicultores del Ecuador.

DBCA: Diseño de bloques completamente al azar.

DCA: Diseño completamente al azar.

DS: Desviación estándar.

ECAA: Escuela de ciencias Agrícolas y Ambientales.

EEP: Extracto etanólico de Propóleo.

FAO: Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura).

FDA: U.S. Food and Drug Administration (Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE. UU).

GAD: Gobierno autónomo descentralizado, nombre que toman las prefecturas y los cantones.

INEC: Instituto Nacional de Estadística y Censos.

INEN: Servicio Ecuatoriano de Normalización.

MAB: Ministerio de Agricultura de Brasil **MAG:** Ministerio de agricultura y ganadería.

MAGAP: Ministerio de agricultura, ganadería y pesca, (este nombre lo tuvo el MAG desde el 2008 a 2017).

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

pH: potencial de hidrogeniones, Medida del grado de acidez o alcalinidad de una sustancia o una solución.

PIB: Producto Interno Bruto.

PIBA: Producto Interno Bruto Agropecuario.

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción).

SINAGAP: Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca.

UFC: Unidades Formadoras de colonias.

ÍNDICE GENERAL

	Pag
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Avicultura en Ecuador	15
1.1.1. Avicultura en la provincia de Imbabura	17
1.2. Proceso de producción avícola	18
1.2.1. Productividad Avícola	21
1.3. Aparato digestivo de las aves	22
1.4. Morfofisiología del intestino de las aves	25
1.4.1. Microorganismos del intestino	28
1.4.2. Bacterias patógenas intestinales	30
1.4.2.1. <i>Salmonella</i> spp	33
1.4.2.2. <i>Escherichia coli</i>	35
1.5. Resistencia antimicrobiana	38
1.6. Uso de probióticos en avicultura	40
1.7. La apicultura	45
1.7.1. Las Abejas	46
1.7.2. Importancia de la Apicultura	48
1.7.3. Productos que se obtienen de las abejas	51
1.7.3.1. El propóleo	53
1.8. Producción apícola en Ecuador	58
1.8.1. Apicultura en Imbabura	59
1.8.2. Flora Apícola	60
1.8.2. 1 Flora Apícola en la provincia de Imbabura	61
2. OBJETIVOS	63
3. MATERIALES Y MÉTODOS	65
3.1. Descripción y localización del área de estudio	65
3.2. Determinación de la composición de propóleos obtenidos en cada uno de los cantones de la provincia de Imbabura	65

3.2.1. Preparación de los extractos en laboratorio e identificación de sus características organolépticas, químicas y físicas	66
3.3. Determinación de la prevalencia de principales enterobacterias en pollos de la provincia de Imbabura	70
3.3.1. Procesamiento de las muestras fecales de pollo y determinaciones microbiológicas	73
3.3.2. Aislamiento de colonias de enterobacterias intestinales habituales en pollos de engorde	75
3.4. Identificación genética de las bacterias habituales en pollos de Imbabura	75
3.5. Determinación de la actividad antimicrobiana de propóleos obtenidos en la provincia de Imbabura	77
3.5.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida	79
3.5.2. Difusión en Agar	80
3.6. Determinación de la acción inmunoestimulante del propóleo	81
3.7. Evaluación del efecto del propóleo como promotor de crecimiento	83
3.8. Efecto del propóleo sobre la microbiota intestinal de los pollos	85
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	87
4.1. Determinación de la composición química de propóleos procedentes de los diferentes cantones de la provincia de Imbabura	87
4.2. Determinación de la prevalencia de las principales enterobacterias patógenas en las explotaciones de pollos de engorde de la provincia de Imbabura	96
4.3. Identificación y secuenciación de las enterobacterias ...	102
4.4. Determinación de la actividad antimicrobiana de propóleos de Imbabura	102

4.4.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida	103
4.4.2. Difusión en Agar	105
4.5. Determinación de la actividad inmunoestimulante de los propóleos obtenidos en la provincia de Imbabura	110
4.5.1. Infección controlada con la cepas de <i>Escherichia coli</i>	110
4.5.2. Control de temperatura cloacal post infección	111
4.5.3. Comportamiento de las heces (score de diarreas) e índice de mortalidad	113
4.5.4. Influencia del propóleo en los parámetros productivos	113
4.6. Determinación de los efectos del propóleo como promotor del crecimiento	117
4.6.1. Efectos del propóleo sobre la mortalidad en las aves..	120
4.6.2. Determinación de la acción de exclusión competitiva en la microbiota intestinal del propóleo	121
4.6.3. Efectos del propóleo sobre las vellosidades intestinales de los pollos	123
4.6.4. Efectos del propóleo sobre la morfología de los órganos linfoides de los pollos de engorde	125
4.7. Efecto del propóleo sobre la microbiota intestinal de los pollos	128
4.7.1. Registros del consumo de alimento y peso corporal de los pollos	129
5. CONCLUSIONES	133
6. BIBLIOGRAFÍA	136



ÍNDICE DE TABLAS

	Pag
Tabla 1. Índice del consumo per cápita de carne de pollo (kg/año) en Ecuador	16
Tabla 2. Localización específica de bacterias más frecuentes en el tracto gastrointestinal	29
Tabla 3. Localizaciones de infecciones más frecuentes de Enterobacterias	31
Tabla 4. Serotipos de <i>Salmonella spp</i> más comunes en aves...	34
Tabla 5. Origen de los productos de la colmena.....	51
Tabla 6. Métodos de Recolección del propóleo.....	54
Tabla 7. Composición promedio de sustancias que forman parte del propóleo.....	55
Tabla 8. Distribución de las muestras propóleos recolectados en los diferentes cantones de la provincia de Imbabura.....	66
Tabla 9. Métodos empleados para la caracterización química de los propóleos recolectados.....	67
Tabla 10. Principales especies de la flora apícola en la provincia de Imbabura.....	69
Tabla 11. Localización, georreferenciación, altitud y Cantidad de producción Avícola en estudio.....	71
Tabla 12. Medios de cultivos empleados para los análisis microbiológicos de las muestras cloacales de pollos.....	74
Tabla 13. Propóleos y bacterias confrontados.....	80
Tabla 14. Orígenes del propóleo empleado en las pruebas de inhibición y antibacterianos empleados usualmente.....	81
Tabla 15. Dosis de propóleo empleadas para el estudio de la acción inmunoestimulante.....	82
Tabla 16. Dosis de propóleo empleadas como promotor de crecimiento.....	84
Tabla 17. Tratamientos y Dosis de propóleo empleadas. en ensayo como prebiótico y simbiótico.....	86

Tabla 18. Resultados del análisis químico de propóleos de la provincia de Imbabura recolectados por el método de raspado..	89
Tabla 19. Resultados del análisis microbiológico (log ₁₀ UFC/g) en las explotaciones avícolas en la provincia de Imbabura, según los cantones testados.....	98
Tabla 20. Serotipos Identificados de las enterobacterias aisladas y remitidas del cantón Ibarra.....	102
Tabla 21. Concentración de propóleo para obtener la CMI y CMB de las enterobacterias.....	105
Tabla 22. Resultados de las pruebas de difusión en disco de tintura de propóleo frente a las 4 enterobacterias investigadas...	105
Tabla 23. Promedio halos de inhibición (mm) de antimicrobianos comerciales frente a las enterobacterias aisladas en la provincia de Imbabura.....	107
Tabla 24. Incremento de peso corporal y comportamiento del índice de conversión alimenticia en pollos tratados: con propóleo a 2 mL/L (T1), 3,5 mL/L (T2), tratados con bacitracina de zinc (T3) y controles (T4)	118
Tabla 25. Recuentos (log ₁₀ UFC/g) obtenidos de Lactobacillus acidophillus y Escherichia coli en pollos de 42 días tratados con propóleo a 2 mL/L (T1), 3,5 mL/L (T2), tratados con bacitracina de zinc (T3) y controles (T4)	121
Tabla 26: Dimensiones promedio de las vellosidades intestinales de segmentos del íleon de los pollos tratados con propóleo a 2 mL/L (T1), 3,5 mL/L (T2), tratados con bacitracina de zinc (T3) y controles (T4)	124
Tabla 27. Peso de los diferentes órganos linfoides e intestino tras el sacrificio en los pollos tratados con propóleo a 2 mL/L (T1), 3,5 mL/L (T2), tratados con bacitracina de zinc (T3) y controles (T4).....	126
Tabla 28. Promedio de los resultados obtenidos en los principales parámetros productivos.....	129

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag
Figura 1. Porcentaje de producción de pollos broiler en los diferentes cantones de la provincia de Imbabura.....	17
Figura 2. Regiones, segmentos, partes del aparato digestivo de la especie <i>Gallus gallus</i>	26
Figura 3. Estructura de las Vellosidades intestinales del pollo de engorde.....	27
Figura 4. Clasificación de las bacterias.....	31
Figura 5. Estructura de una célula enterobacteriana.....	32
Figura 6. Taxonomía de <i>Salmonella</i> spp.....	33
Figura 7. Imagen por microscopía electrónica de <i>Salmonella</i> spp.....	35
Figura 8. Imagen por microscopía electrónica de <i>Escherichia coli</i>	36
Figura 9. Clasificación de las diferentes actividades patógenas de <i>Escherichia coli</i>	37
Figura 10. Representación macroscópica de una abeja, <i>Apis mellífera</i>	46
Figura 11. Familia Apícola.....	47
Figura 12. Partes de la Colmena.....	50
Figura 13. Procedimiento de recolección de propóleo por raspado con palanca.....	65
Figura 14. Procedimientos para la caracterización de propóleo.....	69
Figura 15. Densidad de producción por Cantones sobre el total de la provincia de Imbabura.....	71
Figura 16. Actividades realizadas para la determinación de prevalencias.....	73
Figura 17. Muestreo, preparación, siembra y cultivo de enterobacterias.....	74
Figura 18. Electroforesis de la amplificación del gen 16S para <i>Escherichia coli</i>	76
Figura 19. Visualización del gen 16S para <i>Escherichia coli</i>	77
Figura 20. Métodos para determinar la actividad antimicrobiana.....	78
Figura 21. Esquema de realización de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) por difusión en tubo.....	79
Figura 22. Actividades para ensayo de EEP como inmunoestimulador.....	83

Figura 23. Actividades para ensayo de EEP como promotor de crecimiento e inmunoestimulador.	85
Figura 24. Distribución del % de impurezas en los propóleos recolectados en los diferentes cantones de la provincia de Imbabura...	92
Figura 25. Prevalencia de bacterias enteropatógenos en las explotaciones avícolas en los diferentes cantones de la provincia de Imbabura (log ₁₀ UFC/g).	99
Figura 26: Resultados de la CMI, de las bacterias <i>Salmonella spp.</i> (izquierda), <i>E. coli</i> (centro) y <i>Yersinia spp.</i> (derecha).	103
Figura 27. Esquema de determinación de las CMI del EEP en tubos de caldo nutritivo, frente a <i>E. coli</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Yersinia spp.</i> , y <i>Shigella spp.</i>	104
Figura 28. Efecto del propóleo sobre <i>E. coli</i> aislados de los diferentes cantones de la provincia de Imbabura, a las 22 y 42 horas.....	106
Figura 29. Método de difusión en placa, 1) Medición de halos de inhibición, 2) Halos de inhibición de los discos impregnados en propóleo, 3) Halos de inhibición con antibióticos comerciales.....	108
Figura 30: Recuentos de UFC de <i>E. coli</i> , post infección controlada para confirmar el prendimiento de la bacteria.....	111
Figura 31. Temperatura cloacal de los pollos suplementados con diferentes concentraciones de tintura de EEP en el agua de bebida.....	112
Figura 32. Alimento ingerido (g), incremento del peso corporal (g) e índice de conversión alimentaria (g pienso/ g incremento de peso en los pollos) bajo tratamiento de EEP	114
Figura 33. Porcentajes de peso de timo, bazo y bursa, con respecto al peso corporal de las aves antes de su sacrificio en los pollos tratados con propóleo	127
Figura 34. Comportamiento de los Tratamientos y dosificaciones sobre los principales parámetros productivos.....	130

RESUMEN

La producción avícola mundial es una actividad ganadera muy dinámica y en continuo crecimiento, caracterizándose por grandes volúmenes de producción y cambios vanguardistas en el manejo artificial de ambientes a través del equipo y la infraestructura. Estos cambios deben ir acordes a las exigencias de la genética, nutrición, y sanidad, sin menoscabar la avicultura informal que en países en vías de desarrollo representa un gran volumen de producción.

Esta industria involucra muchos eslabones marcando incluso especialidades propias de los mismos como agentes específicos e innovadores dentro de los campos de la alimentación y nutrición, elaboración de máquinas, equipos, cambios constantes en la selección genética, investigación en insumos, biológicos y productos mejoradores de producción, tecnología, programas informáticos, automatización, maquinaria pesada, o el transporte, sectores a los cuales fortalece y dinamiza.

Está previsto por parte de organismos mundiales, que este sector pecuario, para la siguiente década, sea el principal productor de carne a nivel mundial y la carne de pollo sea la más consumida por la humanidad. Entre los factores que influyen en esta tendencia, podemos citar que es la carne más asequible económicamente, es un producto con alto contenido en proteína y baja concentración de grasa, de fácil preparación, y que no enfrenta restricciones, médicas, religiosas o culturales. Es indudable que esto abrirá nuevos mercados y seguirá siendo el motor de un gran movimiento socioeconómico.

En el Ecuador este comportamiento es evidente, siendo la carne de mayor consumo per cápita del país (30 Kg) muy por encima del consumo de carne de otras especies. En la actualidad, esta actividad pecuaria, es quizá la más importante dentro de la economía del país, contribuyendo con uno de los porcentajes más considerables del PIB Agropecuario, y que, desde mediados del siglo pasado, no ha dejado la

tendencia de crecimiento anual. Dentro de Ecuador, la provincia de Imbabura ocupa el quinto lugar de producción nacional, repartida esta, en los cantones con clima más favorable como son Ibarra, Urcuquí y Antonio Ante. Una de fortalezas actuales en las que se apoya, es la implementación de buenas prácticas de producción avícola, en las que se busca una ventaja competitiva que permita elevar la productividad y la confianza en el público consumidor, que actualmente exige, inocuidad y seguridad alimentaria.

Uno de los pilares de las buenas prácticas avícolas está basado en el manejo y evaluación de indicadores de producción, para lo cual es fundamental levantar la información más confiable, el mantenimiento de estos registros, el análisis de los indicadores, y la toma de decisiones para mejorar continuamente el proceso productivo. Entre muchos de los indicadores se encuentra los porcentajes, índices y factores productivos que resumen el comportamiento de las parvadas ya sea en el desempeño sanitario, técnico o económico, temas de importancia para conducir el mejoramiento continuo de las manadas.

Otro de los pilares es el afianzamiento de la producción en los programas sanitarios preventivos de bioseguridad, tendentes a evitar el ingreso de patógenos a las explotaciones o minimizar cualquier afectación que desafíe la homeostasis de las aves. Para esto es necesario que las aves mantengan su equilibrio fisiológico en todos sus aparatos y sistemas. De primordial importancia es mantener la salud del tracto gastrointestinal, sistema vital para mantener no solamente la vida, sino el encargado de realizar la digestión de los alimentos complejo, a simples moléculas de fácil absorción, indispensable para conseguir la tan esperada productividad aviar.

La estructura del aparato digestivo, tan particular en las aves, está compuesto de distintas partes diferenciadas entre sí y adaptadas a los procesos fisiológicos propios de estos animales, con funciones muy específicas de acuerdo al segmento u órgano componente del aparato, pero sin embargo de estas características es uno de los aparatos más eficientes en el proceso inicial de digestión y metabolismo para convertir los alimentos en proteína de origen animal.

Los procesos bioquímicos necesarios para conseguir esta eficiencia de absorción no funcionan sin la ayuda de la microbiota intestinal

propia de las aves, esta se genera naturalmente desde el momento de la eclosión de los embriones la misma que varía en tipo, composición y cantidad de microorganismos en las distintas partes del ducto intestinal, incluye cientos de especies bacterianas pertenecientes por lo general en los troncos Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria y Actinobacteria. Cuando la microbiota es alterada por situaciones internas o externas a los pollos que trastornan el hábitat microbiano, se provoca una pérdida de los microorganismos nativos, produciéndose el crecimiento de bacterias patógenas albergadas en la microbiota y que colonizan los receptores comunes desocupados por las bacterias benéficas ocasionando enfermedades y/o fallas productivas o inmunitarias.

La microbiota ideal mantiene la simbiosis indispensable para recibir del hospedador el ambiente idóneo para su progreso y desarrollo, y por su lado contribuir con el huésped, en la síntesis de nutrientes y los elementos inmunitarios que se generan en gran proporción en el intestino, necesarios para mantener la salud en general de las aves. El microbiota de las aves de corral, también puede contener eubacterias, que son invasivos oportunistas como muchos de los integrantes de la familia Enterobacteriae, que rompen el equilibrio valiéndose de factores predisponentes o estresantes que les permiten su replicación y ataque infeccioso.

Para mantener la integridad de la salud intestinal, y promover el crecimiento de las aves de corral, se viene empleando desde la década de 1950, antibióticos en dosis reducidas para: controlar el desarrollo de bacterias patógenas, mejorar el bienestar animal, al controlar la respuesta inflamatoria del intestino ante el ataque bacteriano, y mejoramiento de la eficiencia en los parámetros productivos. Desde hace dos décadas, la comunidad europea dentro de su jurisdicción, prohíbe el uso de antibióticos como promotores de crecimiento en la alimentación animal, debido a las evidencias demostradas en los últimos tiempos de ser una de las causas de la existencia de bacterias resistentes a muchos antibióticos de uso humano.

Debido a estas restricciones, que ahora también son exigidas por las agencias de aseguramiento de la calidad, se crea la necesidad de buscar alternativas viables y justificadas que permitan el abandono en el uso de antibióticos de las fórmulas nutricionales para alimentación

animal. Estas alternativas, están representadas por productos físicos químicos o biológicos no invasivos, que ayudan a manipular beneficiosamente, el interior del tracto digestivo, entre ellos se mencionan, prebióticos, o los ácidos orgánicos, entre otros.

Los probióticos, definidos como microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del consumidor, se llevan la mayor atención por parte de investigadores y productores, debido a los evidentes efectos que ocasionan, manteniendo el equilibrio de la microbiota y la regulación inmunitaria en el huésped, estableciendo el favorable entorno intestinal que promueve el crecimiento de microorganismos útiles y limitando la colonización de las bacterias infecciosas. Todas las ventajas utilitarias que se obtiene de su empleo se traducen en el plano económico, en mejoras del incremento de peso vivo, de los factores de conversión alimenticia y de eficiencia, productiva.

La ciencia dirige la mirada la búsqueda de estas alternativas tecnológicas, una de las diferentes fuentes a las que enfocan sus investigaciones son los productos de abejas, como son la miel, el propóleo y el polen. Es conocido el valor de muchos de estos productos y los efectos positivos que provocan ayudando a solucionar problemas en distintas áreas de salud pública, la industria alimentaria, y otros ámbitos de la sociedad. En Ecuador, el sector apícola aún se encuentra en franco desarrollo, siendo la producción de miel el principal objetivo de los productores, aunque es deficitaria y no es capaz de satisfacer el consumo el mercado nacional. Ecuador, al ser un país con una gran biodiversidad, otorga muchos espacios y ambientes climáticos adecuados para que esta actividad progrese y logre un desarrollo satisfactorio.

El propóleo o propolis es una resina extraída de las grietas de tallos y corteza de los árboles que las abejas llevan a la colmena para emplearlo dentro de la colmena como desinfectante al cubrir intrusos de la colmena, refuerzo de celdas, sellante de grietas y hendiduras. El propóleo es uno de los productos que más bondades presenta para la salud humana, presentado efecto inmunoestimulante, antioxidante, cicatrizante, analgésico, antiinflamatorio, antifúngico y bacteriostático. Estas bondades han sido atribuidas a la concentración sus compuestos

biológicamente activos como son fenoles y flavonoides. Sin embargo, a pesar de sus cualidades benéficas, su calidad está condicionada por la gran variabilidad en composición química, la misma que está supeditada a la vez, por el tipo de flora apícola circundante a la colmena, la estación del año, y la estirpe o especie de la abeja.

Con este preámbulo, en la presente investigación, se pretende demostrar los objetivos específicos planteados:

- Determinar la composición cualitativa del propóleo de cada uno de los seis cantones de la provincia de Imbabura.
- Establecer in vitro la dosis bactericida de los diferentes propóleos de Imbabura contra bacterias patógenas más representativas de pollos de engorde de la provincia de Imbabura.
- Analizar la acción bacteriostática o bactericida del propóleo en pollos de engorde expuestos experimentalmente a las enterobacterias patógenas más prevalentes en la provincia de Imbabura.
- Comparar la acción de los antibióticos habitualmente empleados como promotores de crecimiento en la región, contra la acción antimicrobiana del propóleo.
- Determinar la acción del propóleo sobre los parámetros que determinan la rentabilidad económica de las explotaciones avícolas, como ganancia diaria de peso, índice de conversión del alimento, o reducción de la mortandad.

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación se realizaron pruebas y ensayos conducentes a descubrir con el método científico las inquietudes de investigación, y se pudo discutir los resultados obtenidos con varios trabajos desarrollados en investigaciones similares o en los temas planteados. El muestreo para caracterización del propóleo, y la determinación de las enterobacterias frecuentes en pollos de engorde, se hizo en base al registro provincial de apiarios y planteles avícolas que posee la entidad ecuatoriana reguladora del sector. Con esta información, y siguiendo las técnicas respectivas de muestreo, se procedió a reunir: 28 muestras propóleo por método de raspado, de los seis cantones, y para contaje y prevalencias de las enterobacterias, se tomaron muestras cloacales de pollos de la última semana de engorde, en 34 granjas de los tres cantones de mayor población avícola. Los dos tipos de especímenes fueron conducidos,

preparados y analizados en los laboratorios respectivos de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (laboratorio de Química, Microbiología y Biotecnología). Además, se realizaron los análisis in vitro de las dosis bacteriostáticas, bactericidas del propóleo y la determinación de la actividad antimicrobiana sobre las bacterias entéricas frecuentes de los pollos.

Los ensayos realizados para determinar las acciones o efectos del propóleo como inmunoestimulante, probiótico, prebiótico, promotor de crecimiento fueron emplazados en las explotaciones del sector avícola de la granja Experimental La Victoria, ubicada en Ibarra y de propiedad de la ECAA.

A través de los estudios aludidos, se pudo desarrollar el que según nuestro conocimiento es el primer trabajo de caracterización química del propóleo de *Apis mellifera* en Ecuador, llegando a determinar que entre todos los propóleos hubo diferencias significativas por el origen cantonal. La humedad relativa promedio de las muestras superó al exigido por la normativa vigente, presentando las muestras obtenidas en los cantones Antonio Ante y Pimampiro las más elevadas (17,7% y 15,1% respectivamente frente al 10% máximo exigido por la normativa ecuatoriana). El contenido porcentual de cenizas se mantuvo en concordancia con la norma (5% máximo) en todos los cantones involucrados. El porcentaje de impurezas se presentó muy elevado en Urcuquí (37,3%) excediendo el límite permitido en la norma ecuatoriana que es de 25% máximo. Esto quizá guarda relación con el rudimentario manejo de los apiarios en este cantón.

El porcentaje de contenido en ceras, marcó un promedio de 22,72%) menor que el parámetro establecido por la norma nacional (35% máximo), siendo esta la razón para que el propóleo de la provincia presenta un buen contenido de elementos bioactivos. El resultado que mostró diferencia significativa frente a los otros se encontró en Urcuquí, que alcanzó un promedio del 13,84% en ceras. De este mismo cantón, se obtuvo el menor porcentaje para la solubilidad en etanol con un valor promedio del 12,56%, por debajo del valor promedio de la provincia que fue del 15,39% y muy por debajo del límite exigido por la normativa ecuatoriana. (35% mínimo). Por el contrario, los propóleos

obtenidos en los cantones de Ibarra y Urcuquí tuvieron valores más altos que el parámetro aceptado (38,1% y 37,08%, respectivamente).

Con respecto al índice de oxidación, este generalmente varía en sentido inverso al contenido en compuestos fenólicos y flavonoides del propóleo, ya que estos tienen acción antioxidante, la normativa exige 22 s máximo, el promedio de los propóleos de la provincia fue de 11,12% y los que sobrepasaron la normativa fueron los valores de Urcuquí, Pimampiro y ligeramente el de Ibarra (26%, 22.8% y 22.3%)

Con relación al contenido de componentes bioactivos, podemos destacar que los cantones que mayor concentración en fenoles presentaron en el propóleo, fueron los obtenidos en los cantones de Urcuquí, Antonio Ante e Ibarra, que tuvieron marcadores superiores al 5% exigido por la normativa. El de menor concentración de fenoles fue el propóleo procedente de Otavalo con un 2,76%. Este mismo cantón presentó también el menor contenido de flavonoides (0,76%), mientras que los que sobrepasaron el parámetro exigido por la normativa ecuatoriana (1% mínimo) fueron Cotacachi (1,8%), Ibarra (1,5%), Pimampiro (1,34%) y Urcuquí (1,23%).

Por lo tanto, al evaluar en conjunto todos los resultados obtenidos, podemos deducir que únicamente el propóleo procedente del cantón de Ibarra cumple con los parámetros establecidos por ambas normas de calidad en todos los parámetros investigados.

En lo referente a los resultados microbiológicos con los que se investigó la presencia de las enterobacterias habituales en las explotaciones avícolas de Imbabura, se pudo categorizar que el 85,7% de los casos investigados presentaron *Escherichia coli*, en las granjas de Ibarra y 78,8% en Antonio Ante y Urcuquí. Unos resultados similares se constataron para *Salmonella* spp. que se pudo aislar en el 85,7% de las explotaciones avícolas de Ibarra y Antonio Ante, y en un 77,8% de las localizadas en el cantón de Urcuquí. También se encontró una prevalencia muy baja *Shigella* spp. y *Yersinia* spp., pues solamente fueron aisladas en un par de granjas de los cantones de Antonio Ante y Urcuquí. Se pudo evidenciar que las granjas ubicadas a menor altitud y condiciones ambientales de tipo tropical y subtropical, presentaron mayor prevalencia de las entéricas *E. coli* y *Salmonella* spp. Por el contrario, las únicas granjas en las que se encontró presencia de *Shigella*

y *Yersinia* fueron granjas de clima templado a frío ubicadas sobre los 2.200 metros sobre el nivel mar. Se encontraron menores concentraciones de enterobacterias en las explotaciones o integraciones mejor organizadas y con mejor implementación de buenas prácticas avícolas.

Las mencionadas enterobacterias fueron aisladas y sometidas a extracción por las pruebas de reacción en cadena de la polimerasa y longitud de polimorfismo de fragmentos de restricción, para limpiar, amplificar y conseguir el pellet de ADN de cada una, para secuenciación y caracterización genética. Los resultados obtenidos definieron que las especies existentes en los planteles avícolas de Imbabura son *E. coli* YKUTI708, *E. coli* YKUTI707, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella* serovar *Newport*, *Shigella* sp. clone *CAN 067R* y *Shigella* sp. strain *WHQ-9*.

Ante la determinación de la actividad antimicrobiana, mediante la prueba de concentración mínima inhibitoria, se estableció que el extracto etanólico de propóleo (al 20%) mostró capacidad inhibitoria a partir los 600 µg/ml frente a *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Shigella* spp, mientras que para *Yersinia* spp la concentración necesaria para obtener inhibición fue 800 µg/ml de propóleo activo. Mediante el método de difusión en agar, se pudo determinar que el extracto etanólico de propóleo inhibió el crecimiento de colonias las 24 horas, con halos evidentes desde 4,4 a 7,9 mm en las placas de *E. coli*, mientras que frente a las otras enterobacterias no mostró efecto alguno.

Después de las pruebas desarrolladas en laboratorio, con el objeto de establecer el propóleo de mejor composición según el cantón de origen y determinar las especies prevalentes de enterobacterias que afectan la avicultura de la provincia de Imbabura, fueron realizadas pruebas de campo con pollos Cobb 500 y Ross 308, para determinar de manera preliminar, los efectos que el extracto etanólico de propóleo muestra en la fisiología, inmunología o productividad de las aves.

Los resultados del primer ensayo instalado para comprobar si el propóleo estimula el sistema inmune, fue desarrollado con 120 pollos Cobb, en donde se probaron tres dosis de extracto etanólico de propóleo más controles en tres repeticiones de cada tratamiento, unidades experimentales con 5 pollos macho y 5 hembra, de tres semanas de

edad. Al día 24, todas las aves fueron inoculadas por vía oral con una única dosis de 1 ml del cultivo de *E. coli*, previamente preparado y reservado en frascos a una concentración estandarizada de $3,5 \times 10^6$ unidades formadoras de colonias/mL. El ensayo se realizó desde los 24 hasta 44 días de edad, registrando para el análisis posterior los datos claves del comportamiento de temperatura cloacal, score de diarreas, recuentos intestinales de *E. coli*, registro diario del consumo de alimento y pesos corporales cada semana.

Con los resultados obtenidos se pudo determinar que *E. coli*, presentó mayor prevalencia desde los recuentos realizados desde la primera semana post infección en el tratamiento control y mantuvo esta tendencia hasta finalizar el ensayo, presumiblemente porque no tuvo ningún producto que regule o controle su replicación intestinal. La temperatura no presentó diferencia significativa entre los grupos, se mantuvo siempre entre los rangos normales para pollos (40,5-41,5° C). Solamente se observó un descenso hacia el rango inferior en todos los grupos desde el 6° al 10° día, que después volvió a ubicarse entre los límites homeostáticos para aves. Los grupos de estudio, en lo que respecta al seguimiento de cambios en la expulsión de heces, tuvieron un comportamiento muy similar entre todos, no se pudo observar un comportamiento singular en ninguna de las repeticiones. Por lo tanto, no se procedió a analizarlas y se puede referir que ninguno de los tratamientos influyó en cuadros de disentería específicos, o de manera particular sobre las repeticiones en estudio.

En cuanto a los distintos parámetros de comportamiento productivo, en el porcentaje de mortalidad, se terminó con un 0% para todos los grupos en estudio, no se presentaron bajas durante el período de ensayo, terminando todos los ensayos con el número inicial de aves repartidas. El incremento del peso corporal presentó diferencias estadísticamente significativas entre el incremento experimentado en el grupo suplementado con 2 mL de extracto etanólico de propóleo/L de agua (1,6 kg por animal) y el grupo control (1,44 kg por animal). Los grupos que fueron suplementados con dosis mayores no mostraron diferencias estadísticamente relevantes con respecto a los controles, por lo que se puede deducir que no es conveniente la aplicación de dosis más altas que 2 mL/L.

A tenor de los resultados obtenidos, se puede asociar que la ingesta de extracto etanólico de propóleo contribuyó a una mejor reacción a la infección controlada por *E. coli*, consiguiendo menor crecimiento del patógeno y prevalencia en el tracto intestinal, lo que presumiblemente causó un mejor desempeño de la microbiota benéfica en la protección inmunitaria del aparato gastrointestinal y mejores resultados en los índices productivos como incremento de peso corporal.

Otro de los ensayos emplazados, y complementario al estudio anterior, se enfocó a demostrar la actividad como promotor de crecimiento en la etapa de finalización de pollos de engorde, y se complementó el criterio de inmunoestimulante. Para este fin se emplearon 120 pollos línea Cobb 500 repartidos al azar en 12 unidades experimentales, en donde se probaron tres tratamientos, dos de ellos con 2 mL/L, 0,5 mL/L de extracto de propóleo en agua de bebida y otro como 350 g/Tm de bacitracina de Zinc en pienso, más un grupo control. Cada tratamiento se aplicó por triplicado, en grupos formados por 5 machos y 5 hembras, de tres semanas de edad. El ensayo se realizó desde los 24 hasta 44 días de edad, registrando para el análisis posterior los datos claves del comportamiento de consumo de alimento diario, pesos corporales (al inicio del ensayo y luego cada semana), recuentos cloacales de *E. coli* al día 28, porcentaje de mortalidad, y morfometría de órganos linfoides al final del ensayo. Los resultados finales en cuanto a los índices productivos determinaron que, en todos los casos estudiados, los pollos machos mostraron ser significativamente más eficientes en la conversión del alimento en carne, como es de esperarse por el dimorfismo sexual biológico y genético. En el caso de los pollos machos, los mejores incrementos de peso se consiguieron con bacitracina de zinc y con propóleo a 3,5 mL/L, mientras que no se observó un incremento en el peso corporal de los controles y los tratados con propóleo a una concentración de 2 mL/L. Sin embargo, aunque en el presente estudio no se observó significancia estadística de los tratamientos sobre las variables, se pueden constatar diferencias de valor importantes a favor de los tratamientos con propóleo en lo que a conversión alimenticia se refiere. Al no haberse presentado decesos durante el tiempo de estudio, el porcentaje de viabilidad final fue del 100% por lo que se puede definir que ninguno de los tratamientos

influyó negativamente en el parámetro de mortalidad. Se pudo también demostrar la exclusión competitiva para este periodo de prueba, con lo que se determinó, que a mayor presencia de *Lactobacillus acidophilus*, hubo menor crecimiento de *E. coli*, con una prevalencia entre el 2 y 3% mayor de los tratamientos con respecto a los grupos controles. Los resultados obtenidos mostraron que la dosis 3,5 mL/L fue la que mejor inhibió el crecimiento del *E. coli*, ya el crecimiento del patógeno, pues fue la que obtuvo resultados significativamente inferiores en el crecimiento de este patógeno. En lo que atañe a salud intestinal, medida por los resultados histológicos de las vellosidades, se observó que, en los tres tratamientos ensayados, la altura de las vellosidades intestinales fue mayor que las del grupo control, y siendo significativamente mayor en los pollos que recibieron extracto etanólico que propóleo que en aquellos que recibieron suplementación con bacitracina de zinc en el alimento. Tras la prueba de Spearman, se corroboró la correlación significativa que guarda la longitud de vellosidades con el tamaño de la bursa y la cantidad de UFC/ml de *Lactobacillus* en el intestino delgado, lo que presumiblemente, mejoró la respuesta de bienestar de las aves y por ende a su mejor performance de producción.

Se comprobó además que la tintura de propóleo permitió mayores tamaños de los principales órganos linfoides como son el timo y la bolsa de Fabricio en los grupos de prueba que tuvieron mayor peso que el grupo control. Mediante el test de Spearman, se pudo determinar que hay alta correlación entre la longitud del intestino con el incremento del peso corporal y en el índice de conversión alimentaria, estableciéndose que, a mayor longitud de intestino, mayor fue el incremento de peso alcanzado, y de igual forma en la conversión de alimento pues a mayor tamaño intestinal, mejor fue el índice de conversión alimentaria. Con estos resultados se llegó a establecer que el extracto etanólico de propóleo puede ser empleado como promotor de crecimiento pues, confiere resultados similares a los promotores que se han utilizado durante muchas décadas en la industria avícola. Además, el desarrollo de los órganos inmunitarios primarios y tamaño de vellosidades intestinales confirma que el propóleo es un agente importante para conseguir la estimulación del sistema inmunitario en las aves.

El último ensayo implementado, buscó determinar los efectos del extracto etanólico de propóleo sobre la microbiota intestinal. Para ello se planteó comparar los efectos del extracto etanólico de propóleo con los de dos tratamientos con probióticos comerciales, uno de ellos basado en la presencia de *Lactobacillus acidophilus* y otro basado en la mezcla de *Lactobacillus Rhamnosus* y *Enterococcus faecium*, así como un control sin probiótico. El extracto de propóleo se empleó mediante dos modalidades: tintura de propóleo al 20%, bacitracina de zinc. También se incluyó en el ensayo un control sin adición de fármacos. Para este ensayo, se destinaron 27 jaulas con 8 pollos de la línea Ross 308 (repartiendo 4 mach y 4 hembras) en cada unidad experimental, durante 21 días. Los resultados obtenidos mostraron mejoras en el índice de conversión alimentaria en los animales que recibieron la tintura de propóleo con respecto a los controles. En consecuencia, se comprobó la importante acción del propóleo sobre la microbiota intestinal en las aves de corral, y se pudo también evidenciar que, en sinergia con los probióticos, mejora el rendimiento de los pollos y por último se ratificó nuevamente, que puede convertirse en una sustancial alternativa en el desafío de reemplazar a los antibióticos como promotores del crecimiento en las dietas alimenticias.

1. INTRODUCCIÓN

La avicultura, sigue creciendo e industrializándose en muchas partes del mundo, promovida por el impulso que le da el crecimiento demográfico, al aumento en los ingresos familiares y los procesos de urbanización. La avicultura a nivel mundial se ha convertido en una gran industria. es el subsector agrícola de más rápido crecimiento, especialmente en los países en desarrollo (Mottet y Tempio, 2017). Los operadores económicos que forman parte de este sector están caracterizados por el gran volumen de producción y la infraestructura acorde al tamaño de explotación, ubicados en los estados que se dedican especialmente a la exportación de este producto. Actualmente, el país de mayor producción de pollo broiler, es Estados Unidos con el 18% de la producción mundial, seguido de China, Brasil y la Federación de Rusia (FAO, 2018). Es además un sector que presenta un crecimiento constante a nivel mundial, si bien este crecimiento es diferente en función de la zona geográfica. En 2017, la carne de origen avícola representó cerca del 37 por ciento de la producción mundial de carne. En base a información tomada de El Sitio Avícola (2016), en el período comprendido entre el 2000-2016, Asia, Europa y Oceanía han registrado incrementos de producción que superan el 5% al año, en África el crecimiento fue apenas más bajo 4,9% mientras que el crecimiento en América es la menor, 4,3%.

Para el desarrollo de esta industria, mundialmente se utilizan, la infraestructura, genética y alimentación a nivel muy similar, importada de los países con alto desarrollo tecnológico, variando únicamente las prácticas de manejo y los programas sanitarios, que varían y se adaptan, en base a la situación que se manifiesta en cada país.

La avicultura ha experimentado cambios estructurales importantes durante las últimas décadas debido a la introducción de métodos modernos de producción intensiva, mejoras genéticas, mejores medidas de control preventivo de enfermedades y bioseguridad (Ricke, 2018).

Según la FAO, cuando termine el año 2020, la industria avícola será el principal productor de carne a nivel mundial, y será el pollo el tipo de carne más consumida, pues según sus referencias se evidencia el aumento de 1,6% anual la producción global anual y 2,4% anual para su consumo. Ya hoy en día, el consumo de carne de pollo es más elevado que el de la carne de bovino y es prácticamente similar al de la carne de cerdo.

En 2017, la carne de origen avícola representó cerca del 37% de la producción mundial de carne. (FAO, 2020), Este gran éxito dentro del consumo ha experimentado cambios estructurales importantes durante las últimas dos décadas debido a la introducción de métodos modernos de producción intensiva, mejoras genéticas, mejores medidas de control preventivo de enfermedades y bioseguridad. El aumento del mercado mundial de carne es debido a que la carne de pollo es asequible a la mayoría de los hogares, tiene un contenido relativamente bajo de grasa y se enfrenta a pocas restricciones religiosas o culturales (FAO 2018).

El continente americano, es el productor de pollo más grande del mundo, aunque en los últimos años, la industria se ha ralentizado comparándola con otras regiones del mundo (El Sitio Avícola, 2016). Según la misma fuente, el volumen producido a nivel mundial de proteína de pollo podría sobrepasar los 100 millones de Tm, de las cuales América seguramente aporte el 44% (44,3 millones Tm de carne). En el 2019, según, El Sitio Avícola, (2016), la avicultura latinoamericana sobrepasó las expectativas de producción, llegando a 12.532,43 millones de pollos, tomando la base de registros de las empresas avícolas líderes de la región (Ruiz, 2020). Esta cantidad representa un sano crecimiento del 6,61% en comparación con el año 2018.

De los países latinoamericanos, Brasil, que es el mayor productor, de 2017 a 2018 tuvo un fuerte impacto en el crecimiento del total de la producción latinoamericana, registrando el 11% de incremento. De igual forma, otros grandes productores influyeron en los datos positivos de la industria. Argentina creció en 6,4% su producción de pollos de 2018 a 2019, Colombia en 4,07% y Perú en 3,82%. Venezuela (18%), Ecuador (3,4%), Costa Rica (6,7%), Panamá (2,2%) y Paraguay (3,3%) también vieron alzas productivas. No obstante, destaca el nulo

crecimiento de muchos e incluso la ligera disminución de Chile del 1,23% o de México de apenas 0,3% (Ruiz, 2020). El promedio latinoamericano de consumo de pollo es de 32,7 kg. Por encima de esta cifra están México, Colombia, República Dominicana, Panamá, Brasil, Bolivia, Argentina y Perú.

1.1. AVICULTURA EN ECUADOR.

La avicultura comercial en Ecuador, se inicia en 1957 pero desde 1970, esta actividad alcanza la importancia que mantiene, con el surgimiento de nuevas y cada vez más grandes empresas que se van ubicando en provincias como Pichincha, Guayas y Manabí (Rosales Tapia, 2017). Actualmente, la avicultura es una de las actividades con un mayor peso productivo dentro de la economía ecuatoriana. Dicha actividad se divide principalmente en dos sectores, como son: producción de carne de pollo y producción de huevos (Rosales Tapia, 2017).

Las actividades avícolas contribuyen actualmente con 13% del total Producto Interno Bruto Agropecuario (PIBA), principalmente con el segmento de productos de carne de pollo (Pérez, 2012). Esta, es una actividad de las que más se han incrementado en Ecuador dentro del sector agropecuario en los últimos años, debido a la gran demanda que tienen sus productos por parte de todos los estratos sociales de la población ecuatoriana. Este incremento se inició desde comienzos de 1997 por causa del fenómeno de El Niño, luego de la crisis económica de 1999-2000. En el Ecuador la avicultura ocupa el tercer lugar dentro de la producción agropecuaria, con un 12% del total de PIBA (Abreu Rodríguez, 2009). En base a la información tomada del Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca (SINAGAP, 2016), la producción mensual a nivel nacional asciende aproximadamente a 19,5 millones de pollos de engorde. La producción avícola a nivel nacional se da principalmente en tres regiones geográficas: Costa, Sierra y Oriente, excepto en la región insular; distribuyéndose en las principales provincias: Pichincha genera el 38%, Guayas 32%, El Oro 16%, Imbabura 9%, Manabí 8% y el resto del país un 21% (Rosales Tapia, 2017).

El sector avícola, contribuye con la seguridad alimentaria a través de la oferta de proteína animal de bajo costo, consumida por la mayor parte de la población, independientemente del nivel de ingresos de las familias. Anualmente se incrementa el consumo per cápita de carne de pollo y huevos, consumo que se extiende a nivel nacional y cada año se registran nuevas granjas avícolas en todas las provincias del país, es decir que la producción también crece de manera permanente a lo largo del año. El ciclo productivo de un pollo de engorde es de 42 días promedio, con peso promedio al mercado de 2.4 kilos (Corporación Nacional de Avicultores del Ecuador, CONAVE, 2016).

Desde finales de la década de los 90, como ya se ha mencionado, el consumo de pollo en Ecuador presenta un sostenido crecimiento; al iniciar la década del 90, el consumo per cápita fue de 7 kg/persona/año, mientras que según CONAVE (2020) dicho consumo en el 2019 fue de 30,43 kg/persona/año, lo que supone un crecimiento de 3,35% del consumo per cápita por año. Debido a este incremento continuo en la demanda de carne de pollo en Ecuador, es de gran importancia desarrollar estrategias destinadas a obtener una producción eficiente, ya que, de no mejorar la productividad avícola de manera acorde al incremento de su consumo, se haría necesario, recurrir a importaciones masivas de carne de pollo. Para ello, una de las principales problemáticas que afectan a las empresas avícolas, son las alteraciones gastrointestinales de los pollos, causadas en su mayor parte por habituales enterobacterias patógenas, que afectan directamente los índices de eficiencia y parámetros productivos en esta especie (Pan y Yu, 2014; Carrasco y col., 2019). Un buen estado de salud intestinal permite que los pollos de engorde alcancen el máximo rendimiento con el mínimo coste, evitando así pérdidas económicas para los productores, y consiguiendo por el contrario una producción más limpia, competitiva y eficiente (Canseco, 2012).

Tabla 1. Índice del consumo per cápita de carne de pollo (kg/año) en Ecuador.

Año	2016	2017	2018	2019	Crecimiento
Kg/persona	25.17	26.39	26.3	30,43	17%

Fuente: Corporación Nacional de avicultores (CONAVE), 2020.

Actualmente, la producción nacional anual de carne de pollo es de aproximadamente 281 millones de pollos, que producen 529 millones Tm. de carne anual (CONAVE, 2020). Estos pollos deben ser abastecidos en todos los insumos, por las empresas avícolas de Ecuador en sus distintas facetas. Este gran volumen en la producción avícola y la alta inversión en costos de producción que se genera, unido a las pérdidas que generan las diarreas inespecíficas o elevada mortalidad actual de estos, puede llegar a ser un problema de primera magnitud para el sector (CONAVE, 2020).

1.1.1. Avicultura en la provincia de Imbabura.

De acuerdo con el Instituto de Estadísticas y Censos del Ecuador, (INEC, 2012) en la actualidad existen aproximadamente 7,5 millones de pollos y gallinas en planteles avícolas en la provincia de Imbabura, alcanzando el sexto lugar del sector avícola a nivel nacional. Estas explotaciones avícolas presentan una distribución muy diferente entre los distintos cantones que forman la provincia de Imbabura, según se puede observar en la Figura 1.

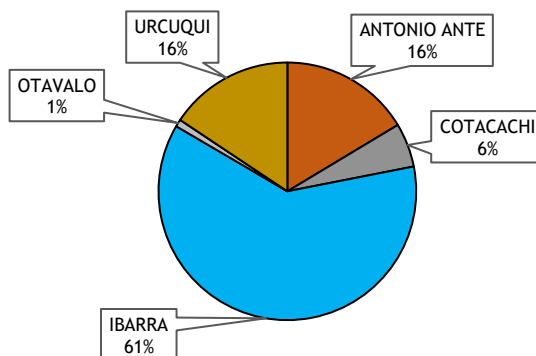


Figura 1. Porcentaje de producción de pollos broiler en los diferentes cantones de la provincia de Imbabura.

Fuente: Registro de granjas (Agrocalidad, 2016).

De todos los cantones que forman parte de la provincia, Ibarra es el cantón que posee el mayor porcentaje de producción de pollos broiler en la provincia de Imbabura, seguido de Antonio Ante y Urcuquí, según se observa en la Figura 1

1.2. PROCESO DE PRODUCCIÓN AVÍCOLA.

El término “Pollo”, es el nombre genérico que se le otorga a la hembra o al macho de pocos días de eclosionado de la especie *Gallus gallus domesticus*. Es también muy frecuente que a estos animales se les denomine pollos broiler o simplemente broilers, nombre que viene derivado del vocablo inglés que significa “parrilla o pollo para asar”. (Rosales Tapia, 2017). Estos pollos pertenecen a razas súper pesadas, producto de numerosos cruzamientos de estirpes especiales priorizando en la selección genética que alcancen: mayor tamaño, pesos altos, buena presentación física, resistentes a enfermedades, alta velocidad de crecimiento y alta conformación de masas musculares, principalmente pechuga, muslos, entre otros. (North Mack, 1990).

Inicialmente, los animales provenían de razas o variedades puras que poco a poco se fueron cruzando entre ellas para mejorar la productividad, por ello en la actualidad en la producción avícola, es más correcto hablar de razas sintéticas o líneas genéticas y no de razas (North Mack, 1990), debido a que son hibridadas genéticamente. La creación de las líneas broiler actuales está basada en el cruce de las características de diferentes razas, utilizando la raza *White Cornish* como padres y *New Hampshire* o *White Plymouth Rock* como madres. Las características típicas de conformación de un animal de carne son aportadas por el padre: alta velocidad de crecimiento, tórax ancho, buen rendimiento de canal o patas separadas. Por el contrario, en las madres se buscan las particularidades reproductivas como son buena fertilidad y alta producción de huevos (North Mack, 1990). Para conseguir el provecho del potencial genético garantizado de estas aves, según el manual de Ross (Aviagen, 2018), dependerá del acompañamiento por los granjeros de un adecuado ambiente, una dieta adecuada, prevención de enfermedades, el bienestar y buen manejo durante la producción, el transporte al matadero y el sacrificio.

Dado que la alimentación de los pollos constituye el mayor coste en la producción de carne avícola, la mayoría de las investigaciones ponen énfasis en la actividad microbiológica del intestino delgado de las aves, puesto que, la mayor parte de la absorción de nutrientes se realiza a nivel intestinal. Sumándose la actual tendencia a reducir el uso

de antibióticos, se buscan nuevas alternativas naturales para mejorar, el microbiota intestinal y controlar las bacterias patógenas (Miranda y col., 2008). De este modo, se ha demostrado que la transferencia de microbiota intestinal de aves adultas sanas a pollos recién nacidos acelera la maduración de la microflora intestinal de éstos. Esto es debido a que, dentro del aparato digestivo de los pollos, especialmente en el intestino, se encuentran bacterias que ayudan en la motilidad y absorción intestinal como *Lactobacillus* spp. *Streptococcus* spp. y *Enterobacterias*, las cuales a la vez actúan en la defensa del intestino a través del mecanismo de exclusión competitiva (Afrasibai y col., 2020; Al-Fatah 2020).

Quizás la enfermedad gastrointestinal que causa mayores pérdidas en la industria avícola es la colibacilosis aviar, la cual está ligada a la presencia de *Escherichia coli*. Su importancia radica en los altos porcentajes de mortalidad y en las pérdidas económicas que genera, reflejándose en la disminución de parámetros productivos y bienestar animal (Schiavone y col., 2020). Dentro de los tratamientos veterinarios utilizados para el control de dicha enfermedad se utilizan antibióticos comerciales como la enrofloxacin, sulfamidas+trimetropin, penicilinas, o cefalosporinas, entre otras. Estos antibióticos empleados en dosis preventivas han sido el principal método de control durante mucho tiempo, lo que ha generado resistencias en las cepas bacterianas y por ello su uso debe ser frecuente y en altas dosis lo que aumenta los costos de la producción (Miranda y col., 2008). El riesgo latente se produce porque el uso continuo de antibióticos o quimioterapéuticos es elevado tanto para la avicultura como para el consumidor final, ya que esta usanza ha generado resistencia de estos microorganismos a estas alternativas farmacéuticas, constituyéndose esta realidad en un grave problema de salud pública por la resistencia bacteriana ocasionada (Miranda y col., 2008).

Otras alternativas, no tanto como tratamiento terapéutico, sino más bien como tratamiento profiláctico, es el empleo de probióticos, buscando la más temprana colonización con microorganismos que pueden afectar beneficiosamente al rendimiento de los pollos, o alimentar a los pollos con aditivos alimenticios que estimulen el crecimiento de dichas bacterias (prebióticos). Mediante el uso de estos

agentes, se busca disminuir el uso de antibióticos y la cantidad de enterobacterias en pollos de engorde. (Popova, 2017). Los prebióticos pueden definirse como ingredientes digeribles que se encuentran en la dieta, los cuales producen efectos beneficiosos, al estimular el crecimiento selectivo y la acción de una o más especies de bacterias saprofitas benéficas en el tracto intestinal. Por el contrario, los probióticos pueden definirse como aquellos microorganismos vivos que afectan en forma positiva el desarrollo del microbiota del intestino. El efecto de la unión de un prebiótico y probiótico se ha definido como simbiótico, que es la interacción que existe entre estos aditivos dentro del intestino, logrando mejorar el crecimiento de bacterias benéficas intestinales. (López-Santamarina y col., 2020).

En la guía de buenas prácticas avícolas (Agrocalidad, 2013) se define el término Bioseguridad como

Conjunto de prácticas de manejo orientadas a prevenir enfermedades (causadas por la acción de microorganismos patógenos en las aves). Además, de brindar garantía al proceso bajo el cual los productos avícolas (carne de pollo y huevos) destinados para consumo humano fueron producidos.

En el manual (Cobb, 2019) se destaca que, para conservar efectivamente el programa de bioseguridad, es necesario implementar medidas de prevención en el que se considere los patógenos que atacan a los pollos de engorde, fuera de la zona. En ocasiones, las enfermedades pueden superar las medidas preventivas, cuando esto ocurre es necesario que los encargados de granja y galpones estén capacitados para reconocerlas y así tomar acciones de manera rápida (Cobb, 2019). Por lo tanto, una vez que la parvada ha sido infectada por alguna enfermedad es importante saber cuál es su agente causal para tomar las medidas específicas para iniciar el control del problema. De esta manera evitaremos obtener deficientes respuestas zootecnicas de productividad. Buitrago (2006), considera que una de las causas que generan altos porcentajes de mortalidad en pollos de engorde son las enfermedades causadas por enterobacterias. Según Aviagen, (2018), el

estado de humedad de la cama, predispone la ocurrencia de enfermedades entéricas (bacterianas y micóticas), aumenta los niveles de amoníaco y malos olores y provoca la proliferación de insectos. Según Quintana (2011), una cama húmeda, se convierte en el desencadenante para el desarrollo de pododermatitis. Esta patología y causa importante de decomisos totales o parciales de canales de pollo en las faenadoras, por lo que, de manera indirecta, una cama de mala calidad presupone una gran merma de rentabilidad para los intereses de la empresa. La humedad de la gallinaza aumenta cuando la microbiota intestinal de las aves es desequilibrada por bacterias, parásitos, hongos o toxinas (Quintana, 2011).

El manejo actual tan intensivo en avicultura, conduce a la susceptibilidad de desórdenes en las poblaciones bacterianas integrantes de la microbiota entérica que concomitantemente provocan descensos en factores clave en la productividad como son el índice de conversión de los alimentos, causando importantes descensos en la productividad de las explotaciones avícolas afectadas (Cobb, 2019).

La vacunación es un punto importante para mantener protegidos a los pollos de ciertos patógenos que se encuentran en la zona de producción a pesar de que sean susceptibles a un manejo inadecuado. El manual Ross (Aviagen, 2018), recomienda que los programas de vacunación se desarrollen bajo la consulta a expertos veterinarios que los lleven a cabo basados en los desafíos locales de los patógenos y la disponibilidad de las vacunas en el país.

1.2.1. Productividad Avícola.

La producción de pollos de engorde, es un negocio que demanda grandes volúmenes de producción para compensar la pequeña unidad de ganancia por ave, para ello hay que considerar a la multiplicidad de factores que inciden en el costo productivo, sin olvidar que cada factor ejerce influencias minúsculas, pero al combinarse todos, el resultado se vuelve sorprendente (North y Bell, 1990), Cuando estas prácticas son llevadas bajo un sistema de calidad, confieren un valor adicional de productividad y por ende un retorno económico adicional. La implementación del sistema de buenas prácticas de producción aumenta la rentabilidad de la operación avícola, lo que se

convierte en una estrategia de productividad y competitividad para enfrentar de mejor manera la competencia (Espinosa, 2017).

Estos sistemas, están basados en varios ejes, uno de ellos, emplea el levantamiento, seguimiento y análisis de datos generados del proceso productivo, por eso es imprescindible registrar la información que se genera dentro de las granjas. Según (Quintana, 2011), un sistema de registro es el conjunto de actividades realizadas con el fin de prevenir y controlar problemas en la manada avícola durante las diferentes etapas de su ciclo productivo. De los datos registrados se pueden aplicar fórmulas específicas expresadas en porcentajes, promedios, coeficientes, factores, etc. con los que se puede valorar el comportamiento de las parvadas y el mejoramiento de las mismas (North Mack, 1990); los principales Indicadores empleados en pollos de engorde son: % de mortalidad, % de viabilidad, Densidad de aves, Consumo de alimento (Tipo /pollo, diario, semanal y acumulado), Pesos Promedios (semanales y finales), Ganancia diaria de peso (GDP), Conversión alimenticia (CA), o el Factor de eficiencia productiva (IEE).

1.3. APARATO DIGESTIVO DE LAS AVES.

En este aparato vital para el desarrollo de la vida, se produce la digestión, proceso por el cual se fragmentan y transforman los nutrientes complejos en simples moléculas necesarias para ser absorbidas, por la absorción se produce el transporte de esas moléculas simples a través de la pared intestinal. Estos procesos resultan de reacciones bioquímicas producidas a lo largo del intestino, y que son necesarios para la correcta asimilación de los nutrientes por parte del organismo (Cunningham, 2014).

La mayoría de los ingredientes del alimento consumido por un pollo, deben ser transformados en su presentación, a través de reacciones químicas, bioquímicas y de otros tipos antes de ser utilizados por el ave. El aparato digestivo de las aves, es un conducto interno compuesto por varios órganos que va desde la boca hasta el ano. (North Mack, 1990). Este aparato en las aves presenta diferencias muy notables con respecto a las otras especies de animales superiores, como los mamíferos. Los distintos segmentos que conforman el sistema digestivo

son: (Figura 2) boca, esófago, buche, proventrículo, molleja, intestino delgado, intestino grueso que desemboca en la cloaca (Angulo Asensio, 2013).

Pico: Es el principal órgano prensil de las aves. Las aves carecen de dientes, por lo tanto, la masticación no se produce, el pico reemplaza a las mandíbulas, los labios y en parte a los carrillos de los mamíferos. Su base es ósea y está revestido por una vaina córnea de dureza variable o ranfoteca. El alimento permanece un corto tiempo en esta cavidad.

La lengua, tiene forma de estilete, su función es la aprehensión, selección y deglución del alimento. Además, este órgano secreta una pequeña cantidad de saliva, en la que se encuentra la enzima ptialina o amilasa, con la que se hidroliza el almidón convirtiéndolo en azúcares, aunque la comida se mantiene en esta sección por corto tiempo y esta actividad es limitada (North Mack, 1990).

El alimento pasa desde la boca hasta el buche, órgano que cumple la función de almacenamiento y remojado de los alimentos con agua y saliva proveniente de la boca. El contenido del buche tiene un pH de 5,5 (Ávila, 2005). El alimento permanece en el buche un cierto tiempo, en donde recibe algo de mucus y ácido láctico (North Mack, 1990).

Posteriormente, se encuentra una dilatación que recibe el nombre de proventrículo (estómago glandular); el cual es un órgano ovoide, donde se produce el jugo gástrico (Estrada, 2011). La pared del estómago glandular contiene un sinnúmero de glándulas desarrolladas, visibles macroscópicamente, que segregan pepsina, y ácido clorhídrico, los cuales contribuyen con la digestión de proteínas complejas, mediante la acción enzimática de la pepsina, y disminuyendo el pH hasta niveles situados entre 2,5 y 3,5 para ayudar a la fragmentación de proteínas (Angel y col., 2013).

A continuación, se encuentra la molleja destacada por disponer de una fuerte musculatura que le permitirá ejercer fuerte presión para comprimir el contenido que ingrese, asistida por la presencia de partículas groseras de carbonato cálcico arena, pequeñas piedras o grit insoluble que ayudarán a romper estructuras del alimento vegetal que ingieren (North Mack, 1990). Este órgano utiliza la contracción rítmica de dos músculos para aplastar y moler los diferentes alimentos en

presencia de un pH de 3,5, por lo que su interior es ácido (Ensminger, 1983).

El intestino delgado es un tubo corto, el alimento inicia su recorrido por el asa duodenal, en donde se desarrolla el proceso de absorción y digestión, el cual termina en las proporciones más bajas del mismo intestino. La porción principal del intestino es el duodeno que tiene una forma típica de asa, en su parte interna se ubica el páncreas, glándula que vacía su secreción de amilasa, lipasa y tripsina en este segmento. La siguiente es el yeyuno y termina con el íleon donde hay gran secreción enzimática (North Mack, 1990).

Intestino Grueso: en la unión con el intestino delgado, se encuentran los dos sacos ciegos en donde hay fermentación y algo de digestión de una pequeña cantidad de fibra utilizada por el ave (North Mack, 1990). El ciego izquierdo presenta un pH de 6,9, mientras que del ciego derecho es de 7,08 (Estrada, 2011).

Aunque el segmento del colon es muy corto (10 cm) aquí no se secretan enzimas, la digestión es continuación del proceso de la sección anterior. En este segmento se regula el contenido de agua relacionado con deshidratación y edema en los tejidos adyacentes: la deshidratación por pérdida de sodio y potasio o si es necesario retención de agua por elevado consumo de sal que produce edema (North Mack, 1990).

Cloaca: Es un órgano excretor, común para el sistema digestivo, urinario y reproductor, terminando externamente en el ano (Figura 2). De manera que, las heces y la orina se excretan juntas, presenta un pH de 3,5, por lo que su interior también es ácido (Ensminger, 1983).

Además de estas partes diferenciadas a lo largo del tracto digestivo, con funciones diferentes, también juegan un papel esencial en la digestión y posterior absorción de nutrientes algunos órganos de naturaleza glandular, que se encuentran comunicados con el aparato digestivo, como las que se describen a continuación:

Glándulas salivales: Los pollos poseen pocas glándulas salivales, por lo que la saliva es secretada en pequeñas cantidades (7-25 ml en 24 horas). La saliva tiene una coloración lechosa clara y un pH en torno a 6,5; en ella está presente la amilasa salival y una pequeña cantidad de lipasa, que ayudan a reblandecer el alimento (Estrada, 2011).

Páncreas (glándula endocrina y exocrina): Ubicado como ya se indicó en medio del asa duodenal (Figura 2) y secreta el jugo pancreático, necesario para la degradación de carbohidratos, proteínas y grasas.

Hígado: Su principal función es la de secretar la bilis: líquido viscoso de color amarillo-verdoso, que contiene ácidos biliares, no contiene enzimas, pero ayuda a la emulsificación de grasas (North Mack, 1990).

La velocidad de tránsito de los alimentos en las aves es muy rápida (2 a 3 horas), siendo menor en las horas nocturnas en las que no hay ingestión de alimentos (Angulo Asensio, 2013).

1.4. MORFOFISIOLOGÍA DEL INTESTINO DE LAS AVES.

El intestino es un órgano complejo por donde pasan obligadamente los nutrientes que son la base del el crecimiento corporal y el mantenimiento de las aves (Gauthier, 2015). En los animales no rumiantes el intestino delgado es el principal sector del tubo digestivo encargado de digerir y absorber los hidratos de carbono, lípidos y proteínas. Los carbohidratos se digieren por acción de enzimas como sacarasa, maltasa y lactasa, que los desdoblan en monosacáridos para facilitar la absorción (Ensminger, 1983). Según la misma fuente, la región de máxima absorción de los azúcares es el yeyuno. La glucosa y la galactosa se absorben mediante un mecanismo de transporte activo. Se comprobó, en este sentido tiene importancia la concentración de ion sodio en el contenido intestinal, para que facilite la rápida absorción de los azúcares, pero si esta concentración es baja, la absorción se retarda.

El tracto gastrointestinal, o tubo digestivo, proporciona al organismo los nutrientes, los electrolitos y el agua por medio de cinco funciones: motilidad, secreción, digestión, absorción y almacenamiento (Cunningham, 2014). Las secreciones del intestino delgado proporcionan agua, moco, inmunoglobulinas, iones bicarbonato y enzimas. Las secreciones endógenas permiten diluir el alimento del intestino, neutralizando también la acidez del mismo, mientras el moco y las inmunoglobulinas (IgA e IgG) se adhieren a la mucosa intestinal para protegerla de agentes físicos y bacterias (Angulo Asensio, 2013).

El intestino delgado es el conducto que se extiende desde la molleja hasta la región ceco-cólica, compuesto por los siguientes segmentos: Duodeno, la reacción del contenido del duodeno es siempre ácida, (pH de 5 a 6), es esta porción del intestino los jugos gástricos ejercen la mayor parte de su acción. Yeyuno inicia después del asa duodenal y va hasta la cicatriz del saco vitelino o conducto umbilical, es la parte más larga del intestino delgado. Formado por 10 asas pequeñas, situadas como una guirnalda y suspendidas de una parte del mesenterio (pH de 6,5 a 7). Íleon, continua en sentido caudal llegando hasta el vértice del ciego, delimitado por el sitio de conexión de los sacos ciegos, su anatomía es estirada y se acomoda en el centro de la cavidad abdominal (pH de 7 a 7,5).

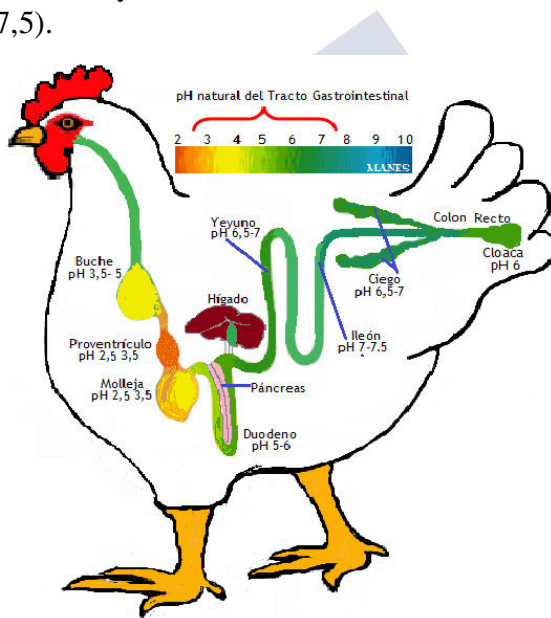


Figura 2. Regiones, segmentos, partes del aparato digestivo de la especie *Gallus gallus*. Fuente: Elaboración propia.

En el lumen o capa interna del intestino delgado hay una amplia red de vellosidades, midiendo cada una de ellas 0,5 a 1 mm de largo en estado normal. Cada vellosidad está compuesta de un vaso linfático llamado quilífero y varios vasos capilares (Figura 3). La superficie de la

vellosidad presenta una gran cantidad de microvellosidades que proveen una superficie de absorción adicional (Ensminger, 1983).

El intestino de todo ser vivo desempeña un rol importantísimo en la digestión y absorción de nutrientes. Histológicamente comprende varias capas: Mucosa, submucosa, muscular y serosa. La función de la mucosa del intestino delgado es facilitar el proceso de la digestión y absorción, la mucosa, a está formada: epitelio, lámina propia y muscular de la mucosa (Figura 3). La mucosa se caracteriza por la presencia de vellosidades y criptas (Bernabé y col., 2017) con lo que se aumenta la superficie intestinal, y a su vez, se consigue una mayor absorción de nutrientes, de esta forma se acrecienta la superficie de absorción (Megías y col., 2016).

Las vellosidades son proyecciones, y su longitud varía de acuerdo a la actividad fisiológica (Bernabé y col., 2017), están recubiertas con enterocitos maduros, y ocasionales células que secretan moco. Estas células viven por pocos días, mueren y pasan a conformar el contenido intestinal donde son digeridas. Su función es aumentar la superficie de absorción, de esta manera, a mayor número de células, mayor tamaño de las vellosidades, por consecuencia, mayor es el área de absorción de nutrientes (Bernabé y col., 2017).

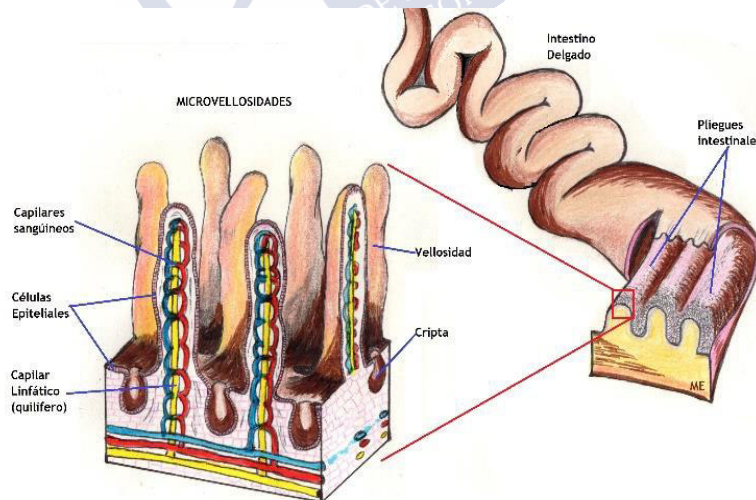


Figura 3. Estructura de las Vellosidades intestinales del pollo de engorde.
Fuente: Elaboración Propia

Cada vellosidad (Figura 3), está formada por un epitelio cilíndrico, en cuyo interior se encuentra alojado tejido conectivo laxo, en el cual se encuentran numerosas células del sistema inmune, motivo por el cual éste es el órgano del animal en el que se genera la mayor parte de la inmunidad. Las mencionadas estructuras se encuentran irrigadas por una importante red capilar, que permite conducir con gran eficiencia, hacia el torrente sanguíneo los nutrientes que han sido incorporados por las células epiteliales (Barrera y Barrera, 2018).

Hay varios factores que influyen en el estado de salud del intestino. Entre éstos, podemos mencionar factores físicos, como un defectuoso transporte de las aves, sobrepoblación en la estabulación, vacunaciones y cambios bruscos de temperatura (Yegani y Korver, 2008). También factores dependientes de la dieta, como un desbalance de la fórmula nutricional, contaminación microbiana en el alimento, mal manejo del grano y presencia de toxinas producidas por hongos (micotoxinas), pueden alterar la salud intestinal del pollo broiler. También puede influir, la presencia de microorganismos potencialmente patógenos, como parásitos, bacterias, virus, hongos o bien la ausencia o cantidad insuficiente de bacterias beneficiosas para la salud del hospedador, como especies de *Bifidobacterium* o *Lactobacillus*, que estimulan el desarrollo y contribuyen al correcto mantenimiento de la pared intestinal.

1.4.1. Microorganismos del intestino.

El intestino de las aves contiene flora microbiana de tipo saprófito, pero también puede albergar patógenos. En condiciones ideales, la microbiota saprófita, realiza una simbiosis entre el organismo superior que actúan como huésped, brindando a los microorganismos un entorno idóneo para su crecimiento y la microbiota ayuda al hospedador mediante la síntesis de nutrientes como proteínas, vitaminas, ácidos grasos de cadena corta, asimismo, juega un papel fundamental en la ruptura y fermentación de células vegetales. Además, cerca del 70% de las defensas inmunitarias se generan en el intestino, proceso en el que es crucial el papel de la microbiota intestinal. Cualquier alteración del equilibrio en la microbiota intestinal, comúnmente denominada disbiosis, induce pérdidas de microorganismos nativos, provocando que

microorganismos potencialmente patógenos puedan colonizar los nichos que dejan vacíos las bacterias benéficas (Gauthier, 2015).

La colonización del tracto gastrointestinal de las aves ocurre naturalmente en el momento de la eclosión, La producción intensiva de aves implementa prácticas de higiene muy estrictas que reducen fuertemente la carga microbiana en el ambiente de incubación para evitar la colonización por bacterias patógenas, y para que las aves recién nacidas adquieran su microbiota inicial en un ambiente artificial en la granja en lugar de la fuente materna natural (Carrasco y col., 2019). Otros autores han señalado también el hecho de que además de por factores externos y por la edad del animal, la población microbiana intestinal varía de un modo importante en función de la parte del tracto de la que estemos hablando. Según Pareja (2005), la microbiota intestinal de pollo incluye cientos de especies bacterianas dominadas a nivel de filo por Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria y Actinobacteria. Las comunidades microbianas difieren a través del tracto intestinal de los pollos con perfiles microbianos particulares detectados en el cultivo, molleja, íleon, ciego y colon de pollos de engorde (Carrasco y col., 2019). Las regiones del tracto gastrointestinal, tienen diferentes funciones que afectan la dinámica de la microbiota, lo que conduce entonces a encontrar diferencias en el tipo (Tabla 2), la composición y abundancia de bacterias, entre las diferentes regiones del aparato (Kers y col., 2018).

Tabla 2. Localización específica de bacterias más frecuentes en el tracto gastrointestinal.

Sección intestinal	Géneros bacterianos más abundantes
Buche	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i>
Proventrículo	<i>Clostridium</i> , <i>Lactobacillus</i>
Estomago muscular	<i>Bacteroides</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Enterobacter</i> <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Escherichia</i> ,
Yeyuno e íleon	<i>Staphylococcus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Eubacterium</i>
Ciego	<i>Bifidobacterium</i> , <i>Fusobacterium</i>

Fuente: Elaboración propia

Para controlar la problemática derivada de las patologías gastrointestinales de los pollos de engorde, es imprescindible el conocimiento sobre el estado sanitario de las parvadas, será determinante para poder elaborar estrategias y planes de prevención y/o tratamiento sanitario, protegiendo la salud pública de posibles consecuencias por la diseminación de bacterias zoonóticas.

Las enfermedades intestinales como: coccidiosis, síndrome de mala absorción, colibacilosis, distintas infecciones causadas por *Salmonella*, enteritis necrótica, entre otras son causantes de pérdidas significativas en producción y calidad del pollo broiler. Estas infecciones, además de afectar el tracto gastrointestinal, pueden invadir otros sistemas (Abreu Rodríguez, 2016; Lamas y col., 2018a). Además de las pérdidas económicas para el productor, también se debe tomar en consideración el riesgo latente que esto representa para la salud del consumidor (Silva, 2012).

También se debe recalcar el hecho de que la contaminación bacteriana en las canales de pollo, están determinadas por el tipo de poblaciones bacterianas en el segmento gastrointestinal de las aves en la etapa de producción, así como de las bacterias que se adicionan en etapas de faenamiento, antes del sacrificio y después del mismo (Lamas y col., 2018). Así pues, los consumidores pueden sufrir toxiinfecciones debido a la ingesta de carne contaminada con bacterias presentes en el tracto gastrointestinal de los pollos, siendo las más frecuentes *Campylobacter* spp., *Salmonella* y *E. coli* (Wang y col., 2014). Si estos agentes infecciosos han tenido antes de llegar al consumidor final un contacto habitual con agentes antimicrobianos, es más probable que atesoren una mayor resistencia a los mismos, por lo tanto, su tratamiento en los seres humanos sea más difícil.

1.4.2. Bacterias patógenas intestinales.

Los broilers, al igual que otras especies son susceptibles a sufrir enfermedades infecciosas, pudiendo ser de diversa naturaleza. El riesgo de contraer cualquier enfermedad es alto, pero puede ser prevenida con adecuada tecnología de explotación. Las bacterias se encuentran en la naturaleza formado parte del suelo, aire y agua; en microorganismos vivos, estas se encuentran en la piel, mucosas, intestino y la llamada

“flora normal” (Stanchi y col., 2007), mientras que las que son capaces de originar enfermedades en el hombre y los animales se denominan eubacterias (Stanchi y col., 2007), y pueden clasificarse según lo descrito en la Figura 4.

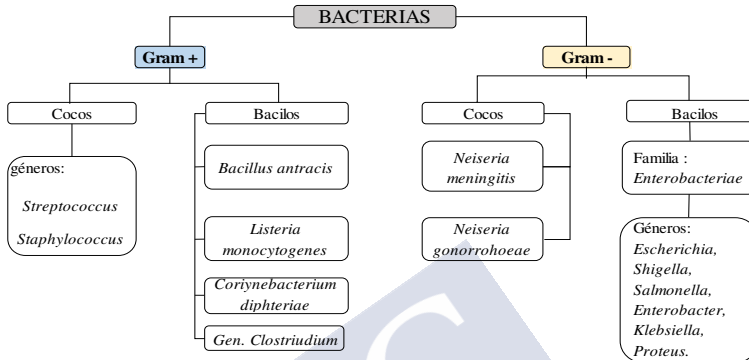


Figura 4. Clasificación de las bacterias. Fuente: Elaboración propia basado en Stanchi y col., 2007.

Las Enterobacterias, como su nombre lo indica, tienen importancia debido a su presencia en la microbiota intestinal, suelo y agua. Este grupo de microorganismos de comportamiento oportunista son responsables de numerosas infecciones, ya que además los principales patógenos en los broilers, también son responsables de muchas infecciones en seres humanos. Entre ellas, son responsables del 35% de las septicemias y el 70% de las infecciones intestinales y genitales (Abreu Rodríguez, 2012; Wang y col., 2014). Esto hace que además de su patogenicidad en las aves, su presencia posterior en las canales obtenidas de los broilers también sea un importante problema sanitario.

Tabla 3: Localizaciones de infecciones más frecuentes de Enterobacterias.

Localización	Enterobacterias más frecuentes, (genero)
Sistema nervioso central	<i>Escherichia</i>
Tracto respiratorio inferior	<i>Klebsiella, Enterobacter, Escherichia</i>
Torrente sanguíneo	<i>Escherichia, Klebsiella, Enterobacter</i>
Tracto digestivo	<i>Salmonella, Shigella, Escherichia, Yersinia</i>
Tracto urinario	<i>Escherichia, Proteus, Klebsiella, Morganella</i>

Fuente: Elaboración propia a basada en Stanchi y col., (2007).

La mayoría de los organismos de la familia Enterobacteriaceae son bacterias de tamaño grande, con 2 a 4 μm de longitud, presenta bordes paralelos y extremos redondeados; la forma puede variar desde grandes cocobacilos hasta bacilos, filamentosos, son catalasa positiva y oxidasa negativos, y pueden ser móviles por flagelos peritricos como no móviles, y no forman esporas (Ryan y Sherris, 2017). Todas las bacterias gramnegativas, en su estructura interna son similares, en la pared celular, membrana celular (Figura 5). Se las estudia en bases a los tipos de antígenos que poseen como son: somático (o), flagelar (h), y capsular (k).

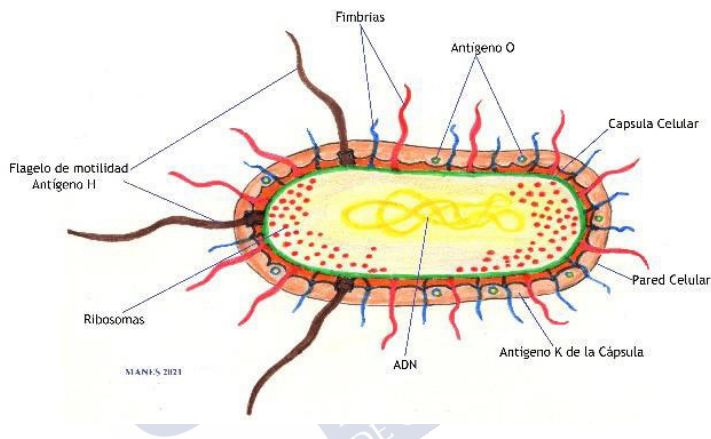


Figura 5. Estructura de una célula enterobacteriana. Elaboración propia.

Ryan y Sherris (2017), mencionan que “*la patogénesis de la enfermedad bacteriana es el resultado de un proceso multifactorial que depende del estado inmune del hospedero, la naturaleza de la especie bacteriana, los factores de virulencia y el número de organismos en la exposición inicial*”. En otra parte de su investigación, sostiene que las enterobacterias pueden influir en la salud a través de la modificación de la morfología visceral, la influencia en la nutrición, el desarrollo de enfermedades intestinales y de la respuesta inmune. Los principales agentes causantes de trastornos digestivos y septicémicos en las aves pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, siendo *Salmonella* spp. y *E. coli* las más frecuentes. En ambos casos pueden provocar altos índices de mortalidad, además de dejar supervivientes portadoras, tanto en

animales jóvenes como en adultos (Wang y col., 2014). Además de éstas, existen otros géneros y especies bacterianas que si bien causan de manera menos frecuente infecciones agudas en las aves, si pueden causarlos en ciertas circunstancias, además de poder vehiculados hacia el ser humano a través de la carne de pollo, como son *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Klebsiella*, *Campylobacter* y *Yersinia enterocolitica*, son bacterias patógenas que también atacan al tracto digestivo de las aves (Kessel y col., 2001).

1.4.2.1. *Salmonella* spp.

Dentro del género *Salmonella* se describen dos especies: *S. bongori* y *S. entérica*. Dentro de la especie *S. entérica* están incluidas seis subespecies: *S. entérica* que habita en el ser humano y animales homeotermos, y otras como *S. salamae*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. houtanae*, *S. diarizonae* y *S. indica* (Lamas y col., 2018a). Estas habitan en animales de sangre fría y el medio ambiente (Lamas y col., 2018c). En base a la información tomada de Stanchi y col., (2007), sabemos que la subespecie *S. entérica* es una bacteria gramnegativa anaerobia facultativa no formadora de esporas, que a su vez contiene 5 serovariedades principales especies propias de las aves: *S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. enteritidis*, *S. thyphimurium* y *S. arizonae*. Su morfología corresponde con bastones de 0.7 a 1.5 μm de ancho y 2.0 a 5 μm de largo, son móviles por flagelos excepto la *S. gallinarum* y la *S. pullorum* que son inmóviles.

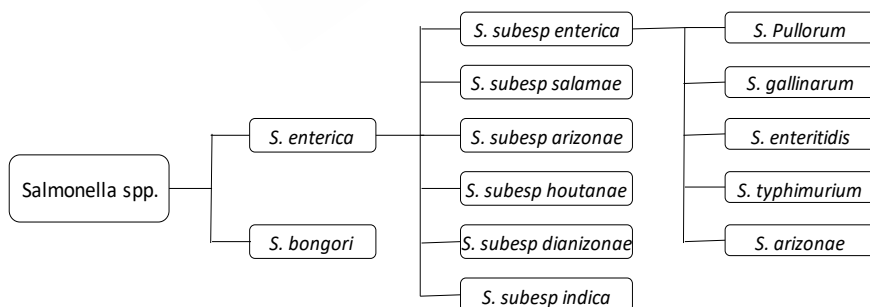


Figura 6. Taxonomía de *Salmonella* spp. Fuente: Elaboración propia a partir de Stanchi y col., (2007).

El género *Salmonella* causa salmonelosis tanto a animales como humanos, cursa con septicemia, enteritis aguda, subaguda y crónica, variando el grado de afección según la gravedad de los casos, ocasionando grandes pérdidas económicas (Lamas y col., 2016). La epidemiología de *Salmonella* es muy compleja debido a la extensión de distribución, el número creciente de serovariantes, el amplio rango de hospedadores y su patogénesis. Respecto a la avicultura, *Salmonella* no conforma la flora intestinal normal de las aves, si no, que éstas la adquieren del exterior a partir de insectos, roedores, aves silvestres y seres humanos (Lamas y col., 2018b). Al habitar en el tracto gastrointestinal de animales y humanos, las deyecciones dan como resultado la contaminación de agua, alimentos y medio ambiente. Los diferentes serotipos de la subespecie *S. enterica* pueden ocasionar diferentes procesos infecciosos en las aves. (Virbac, 2010), según se puede observar en la Tabla 4.

Tabla 4. Serotipos de *Salmonella spp* más comunes en aves.

Etiología	Enfermedad
<i>Salmonella pullorum</i>	Pullorosis aviar
<i>Salmonella gallinarum</i>	Tifoidea aviar
<i>Salmonella enteritidis</i>	Paratifoidea
<i>Salmonella typhimurium</i>	Paratifoidea
<i>Salmonella arizonae</i>	Arizonosis aviar

Fuente: Virbac, (2010).

Los serotipos de la subespecie *S. enterica*, *typhi* y *paratyphi* son capaces de causar infecciones graves en humanos, pero no suelen ser patógenas para los animales. Por el contrario, los serotipos *S. enteritidis* y *S. typhimurium* son zoonóticas, infectan tanto a personas como animales, con la gran diferencia, que principalmente en los pollos, producen infecciones asintomáticas, lo que las hace más peligrosas desde el punto de vista alimentario para el ser humano (Gutiérrez-Castillo y col., 2008). De hecho, ambos serotipos son los que más frecuentemente causan salmonelosis clínica en seres humanos, en concreto: *Typhimurium* (19.2%), *Enteritidis* (14.1%), *Newport* (9.3%), *Javiana* (5%), *Heidelberg* (4.9%), *Montevideo* (2.4%)” (Braña, 2013). En la región a la que pertenece Ecuador (América Latina y Caribe), la

salmonelosis en humanos es uno de los principales agentes causantes de toxiinfecciones de origen alimentario (Gutiérrez- Castillo y col., 2008).

En el trabajo desarrollado por Vinueza-Burgos y col. (2016), que proporciona datos científicos sobre la prevalencia de salmonella procedente de aves comerciales en Ecuador, el serotipo más frecuente fue *S. infantis* (83,9%) seguido de *S. enteritidis* (14,5%) y un mínimo de *S. corvallis* (1,6%).

Debido a la diferente capacidad de infectar a aves y personas, y sus diferentes cuadros clínicos, es esencial que, en el control avícola, además de poder detectar la posible presencia de Salmonella en los pollos, también pueda determinarse a qué especie, subespecie y serotipo pertenecen (Lamas y col., 2016).

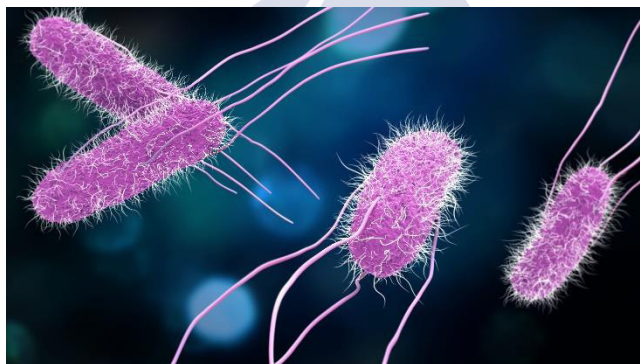


Figura 7. Imagen por microscopía electrónica de *Salmonella spp.*
Fuente: AdobeStock N° de licencia: 176894218

La *S. enteritidis*, no se multiplica habitualmente fuera del organismo, pero son capaces de sobrevivir tanto en el agua como en el suelo durante períodos largos. Está presente de manera habitual en el tracto intestinal de una amplia variedad de animales, que incluyen mamíferos, aves, reptiles y animales acuáticos (Lamas y col., 2018a).

1.4.2.2. *Escherichia coli*.

La especie *Escherichia coli* pertenece al orden de las Eubacterias, familia Enterobacteriaceae. mide entre 1 y 1.5 μm por 2 y

6 μm según las condiciones y pueden aparecer aisladas o en pares (Hu y col., 2020). Esta bacteria es habitante saprofita del intestino, sin embargo, algunos serotipos se han identificado como agentes causales de la diarrea en humanos. Clínicamente, la infección por *E. coli* causa deshidratación y pérdidas de electrolitos, colitis hemorrágica, absorción deficiente de alimentos, pérdida de peso e incluso la muerte (Belluco y col., 2016). En concreto, en el caso de la avicultura, *E. coli* es el agente causal de la colibacilosis aviar, enfermedad que ha dado lugar a elevados niveles de mortalidad y morbilidad en la industria avícola. Hedman y col., (2019) mencionan, que la mortalidad producida por este patógeno es baja cuando se administra la terapéutica de manera rápida y oportuna. Sin embargo, puede arruinar una granja por completo si no se aplican las medidas a tiempo.

La prevalencia de esta especie bacteriana es mayor en climas húmedos y cálidos, con las condiciones ambientales que contribuyen en la mejora de la supervivencia del microorganismo. Las fuentes de infección suelen ser el suelo y el agua, contaminados por las deyecciones de los animales contaminados. La bacteria es transmitida al animal por vía oral, a través del agua de bebida y condiciones predisponentes como: las materias primas de alimentos; la sobre densidad y la falta de medidas higiénicas (Belluco y col., 2016).

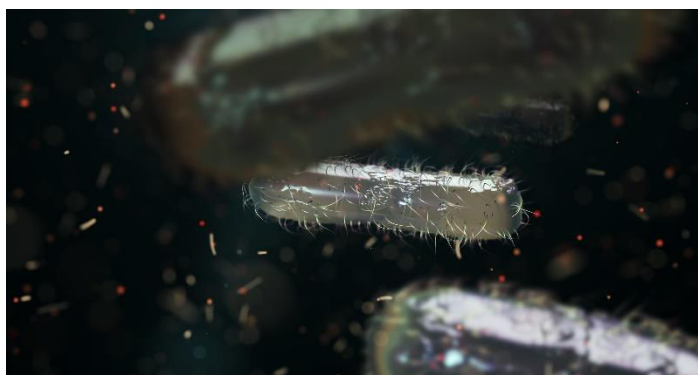


Figura 8. Imagen por microscopía electrónica de *Escherichia coli*.
Fuente: AdobeStock N° de licencia: 258750050

Específicamente, en pollos de engorde las infecciones con *E. coli* (Figura 8) tienen importancia económica debido a las pérdidas que provocan síntomas como el retraso en el crecimiento de los pollos, aumento en el índice de conversión alimenticia, aumento del porcentaje de mortalidad, de la cantidad de aves de descarte, y también de decomisos en el matadero como consecuencias de las lesiones que provocan (Hedman y col., 2019).

El primer paso para desarrollar la patogénesis es la capacidad de adherencia. La capacidad de esta bacteria para adherirse a los gangliósidos receptores de las microvellosidades del epitelio intestinal, está vinculada a la propiedad de expresar estructuras proteicas de adhesión (adhesinas) sobre las fimbrias. Las distintas adhesinas de *E. coli* son: F1, F2, F3, F4, F5, F6, F41 y F165) (Moser y col., 2018). Las cepas patógenas de esta enterobacteria causantes de algunas infecciones extraintestinales proceden de la flora intestinal. *E. coli* es un patógeno generalmente oportunista, que aprovecha los períodos en los que el hospedador presenta otras patologías concomitantes o descensos en su situación inmunológica para causar estas infecciones. No obstante, algunas cepas concretas de esta especie bacteriana que son portadores de factores de virulencia específicos, si son capaces de causar infección aún en individuos sanos (Figura 7).

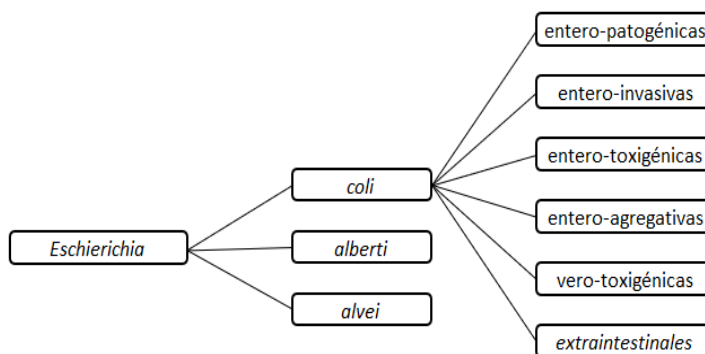


Figura 9. Clasificación de las diferentes actividades patógenas de *Escherichia coli*. Elaboración propia, a partir de Stanchi y col., (2007).

Cuando esta bacteria afecta a seres humanos, generalmente, ha alcanzado a éstos mediante transmisión vía fecal-oral de *E. coli*. Usualmente, los humanos afectados presentan diarrea que puede complicarse con otros síndromes como: fiebre, disentería, shock, y púrpura; dependiendo del serotipo causal de la bacteria. El periodo de incubación varía de 1 a 5 días, aunque lo más común es que se presente 12-72 horas (Gilbert, 2014). Uno de los principales aspectos que complica su patogenicidad es que, debido al uso indiscriminado de antibióticos en el sector primario, se han seleccionado cepas de *E. coli* con gran cantidad de resistencia a antibióticos (Stanchi y col., 2007).

De igual forma que en el caso de la *Salmonella* spp., la serotipificación de *E. coli*, resulta de gran interés clínico, ya que existe relación entre determinados serotipos O: K: H y su patogenicidad. La mayoría de toxinas, adhesinas y factores de resistencia a antibióticos son codificados en plásmidos y estos pueden transferirse de una bacteria a otra en determinadas condiciones (Stanchi y col., 2007).

Según Mora y col. (2013), los serotipos más frecuentes de *E. coli*, en España son: O2:H5, O2:H6, O18:H7, O78:H9 y O78: H. Además, las cepas del serotipo O18:H7: K1 Fimbrias S y FimAvMT78 *ibeA*, han sido aisladas de manera frecuente en España tanto procedente de aves con septicemia como a partir de seres humanos afectados con septicemia o meningitis. En Ecuador se han encontrado serotipos como O157 en algunos alimentos (Gómez-Duarte, 2014).

1.5. RESISTENCIA ANTIMICROBIANA.

El Ecuador, un país en vías de desarrollo, registra a las infecciones bacterianas como la tercera causa de morbilidad en el país (INEC, 2016). Según este instituto, en el 2014 se registró el mayor número de defunciones hospitalarias de los últimos 14 años; con lo que podemos deducir de que, en el país, mueren más personas en los hospitales, determinando como una de las causales al elevado índice de bacterias patógenas resistentes a los antimicrobianos.

Los antimicrobianos, medicamentos utilizados para tratar las infecciones bacterianas, pueden causar resistencia, producida cuando las bacterias mutan en respuesta al uso de estos fármacos. Son las bacterias, y no los seres humanos, ni animales, las que se vuelven

resistentes a estos fármacos, causando infecciones a sus hospedadores más difíciles de tratar (OMS, 2020).

La FAO, estima que 700.000 personas mueren por año debido a infecciones resistentes a los antimicrobianos (AMR, por sus siglas en inglés) y es incalculable el número de animales enfermos que no están respondiendo a tratamientos. La AMR entonces, es una amenaza global significativa para la salud pública, la seguridad alimentaria y la inocuidad de los alimentos, como también para la vida, la producción animal y el desarrollo agroeconómico (FAO, 2017).

La AMR describe un fenómeno natural por el cual microorganismos como bacterias, virus, parásitos y hongos se adaptan y ganan resistencia a los efectos de los fármacos antimicrobianos, como los antibióticos, que anteriormente eran eficaces en el tratamiento de infecciones (FAO, 2017). Cuanto mayor sea el número de antimicrobianos empleados, hay más probabilidad, que los microorganismos desarrollen resistencia, fenómeno que es agravado por el mal uso o empleo excesivo de antimicrobianos en caso de dosificación o frecuencia incorrectas, o duración de tratamiento insuficiente o excesiva.

En el 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó la lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos, incluyendo 12 familias de las bacterias más peligrosas para la salud humana especialmente. Este listado está dividido en tres categorías de acuerdo a la urgencia en que demandan nuevos antibióticos: prioridad crítica, alta o media. En el primer grupo tenemos entre otras a *Klebsiella*, *Escherichia* y *Proteus*. En cambio, en los niveles de los grupos segundo y tercero de la lista, están entre otras las causantes de intoxicaciones alimentarias como *Salmonella*. (Kieny, 2017)

En Ecuador, la avicultura como parte del sector agropecuario, ha sido desafiada al igual que los demás países de la región, para desarrollar un proceso productivo más limpio, amparados la guía Nacional de Buenas Prácticas Avícolas (Agrocalidad, 2013), y la Ley orgánica de sanidad agropecuaria, emitida en julio del 2017. Con lo que se inicia el retiro paulatino del empleo de los antibióticos como promotores de crecimiento, y la búsqueda de alternativas técnico-científicas de manejo, sanitarias, nutricionales y otras para el

tratamiento de las distintas patologías que afectan a las aves en las granjas de pollos parrilleros.

Hoy en día, hay algunas alternativas en las cuales se centran las investigaciones para dar respuesta a esta necesidad y realidad agropecuaria, como es el uso de probióticos, prebióticos, ácidos orgánicos, manano oligosacáridos o levaduras, ácidos orgánicos, entre otros. (Muñoz, 2004)

Por ello como una de estas opciones, se han hecho y se desarrollan, numerosos trabajos de investigación con los productos de las colmenas, de manera especial con el propóleo y apitoxina.

1.6. USO DE PROBIÓTICOS EN AVICULTURA.

Los probióticos se definen según la FAO/OMS como *“microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del consumidor”* (FAO, 2002). En las últimas décadas, la terapia probiótica se ha revelado como una estrategia no invasiva que puede reducir los síntomas patológicos y reducir la prevalencia de numerosas enfermedades, como son las de origen infeccioso, de un modo efectivo y con bajo coste (Aziz Mousabi y col., 2018). Además del mero efecto preventivo, los probióticos también han demostrado efectos positivos desde el punto de vista de la producción animal, tales como la mejora de la salud del sistema digestivo, incremento temprano en la inmunidad. (Manzano y col., 2012)

Para que una especie bacteriana pueda ser considerada como probiótica, debe reunir las siguientes condiciones: deben formar parte de la microbiota normal del intestino, deben ser capaces de adherirse al epitelio intestinal para superar el potencial barreras como el bajo pH gástrico, resistir la presencia de ácido biliar en el intestino, y la resistir también la competencia con otros microorganismos en el ruta intestinal (Fijan, 2014). Además, los probióticos deben ejercer sus posibles efectos positivos en el huésped. Adicionalmente, los agentes probióticos deben ser apropiados para los procesos industriales tecnológicamente y en condiciones normales de almacenamiento (Aziz Mousabi y col., 2018).

Aunque los mecanismos de acción específicos mediante los cuales los probióticos mejoran rendimiento y promueven la salud intestinal no se conocen con exactitud, se han propuesto varios (Vilà y col., 2010; Lee y col., 2010). Los dos mecanismos más importantes a través de los cuales, los probióticos ejercen efectos benéficos incluyen el equilibrio de la microflora intestinal y la regulación inmunológica. Los probióticos ayudan a establecer un entorno intestinal que favorece el crecimiento de especies bacterianas beneficiosas y reduce la colonización de dicho intestino por bacterias patógenas (exclusión competitiva) debido a las siguientes razones: (1) la creación de un ambiente hostil para las especies bacterianas nocivas (a través de producción de ácido láctico, ácidos grasos de cadena corta, y la reducción del pH); (2) competir por los nutrientes con bacterias no deseadas; (3) producción y secreción de sustancias producidas por los probióticos con capacidad de limitar el crecimiento de otras especies menos deseables (por ejemplo, las bacteriocinas) y (4) inhibición de la adherencia y translocación bacteriana (Ng y col., 2009; Brown, 2011).

Además de estos mecanismos, los probióticos también se sabe que optimizan la función intestinal de las aves y mamíferos manteniendo la homeostasis de las células epiteliales, promoviendo las respuestas citoprotectoras y la supervivencia celular (a través de la producción de citoquinas que mejoran la regeneración del epitelio e inhiben la apoptosis de células sanas), mejorando la función de barrera (mantenimiento de las uniones citoesqueléticas y epiteliales sin espacios de invasión), y mediante el aumento de la síntesis de la mucina (Ng y col., 2009; Brown, 2011).

También desempeñan un papel importante en la digestión y la retención de nutrientes mediante la producción de enzimas digestivas (en algunos casos complementarias a las que, es capaz de producir el hospedador (López-Santamarina y col., 2020) y de este modo mejoran el aprovechamiento de nutrientes que en otro caso serían indigeribles (Ciorba, 2012; Ng y col., 2009). Los probióticos en igual forma ejercen acciones beneficiosas reduciendo la concentración de aminos y amoníaco en el intestino, procedentes de la descomposición de los alimentos proteicos (Endesfelder y col., 2016). Otro importante mecanismo de acción de los probióticos incluye la modulación y la

regulación de las respuestas inmunes intestinales, reduciendo las citoquinas pro-inflamatorias, aumentando la secreción producción de IgA, y la promoción de respuestas inmunológicas contra los agentes patógenos (activación de los macrófagos, aumento de la producción de citoquinas por los linfocitos intraepiteliales) (Ng y col., 2009; Lee y col., 2010; Lee y col., 2011).

Los probióticos pueden contener una o más cepas de microorganismos y pueden administrarse solos o en combinación con otros aditivos en el alimento o el agua (Gadde y col., 2017). En avicultura existen muchas estrategias de aplicación de probióticos además de la tradicional mediante ingesta a través del pienso o el agua, como la pulverización sobre los pollos o la obtención de huevos embrionados que contengan dichos probióticos (Cox y Dalloul, 2015). Existe una amplia variedad de especies bacterianas (*Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Lactococcus*) y también algunas levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* han sido probados como probióticos en la avicultura con buenos resultados (Kabir, 2009, Abdelqader, A. 2014).

La mayoría de los trabajos de investigación realizada acerca del uso de probióticos en avicultura se ha dirigido a investigar los efectos de los probióticos en la reducción del número de microorganismos patógenos en el tracto gastrointestinal (Gadde y col., 2019). Sin embargo, también se han realizado trabajos dirigidos a investigar los efectos de los probióticos en el mejoramiento del crecimiento y el rendimiento de los pollos en enfermedad aparente.

Entre los resultados más relevantes publicados hasta la fecha, cabe señalar que la suplementación de las dietas avícolas con una sola cepa de *Lactobacillus* spp. (*L. casei*, *L. fermentum*, *L. bulgaricus*, *L. reuteri*) mostraron resultados positivos al respecto de la mejora del peso corporal, así como sobre la eficiencia de la alimentación en pollos de engorde (Samli y col., 2007; Apata, 2008; Nakphaichit y col., 2011). Resultados similares fueron obtenidos cuando a los pollos de engorde se les suplementó con mezclas de múltiples cepas de *Lactobacillus* spp. (Kalavathy y col., 2003; Mookiah y col., 2014).

Más allá de los *Lactobacillus*, que son con diferencia el género bacteriano más empleado en la avicultura, también se han publicado

resultados positivos tras la suplementación de los pollos con diversas especies pertenecientes al género *Bacillus* (*B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens*). En concreto, los resultados obtenidos respecto a la mejora de las tasas de crecimiento y descenso de la mortalidad pueden compararse a la de algunos promotores del crecimiento farmacológicos (Wang y Gu, 2010; Liu y col., 2012; Sen y col., 2012; Ahmed y col., 2014; Jeong y Kim, 2014; Park y Kim, 2014). Por su parte, la suplementación con otros géneros y especies también han demostrado mejoras en el incremento de peso diario y en la eficiencia de conversión del pienso, como *Enterococcus faecium* (Salim y col., 2007), *Clostridium butyricum*, ya sea sólo o combinado con *Enterococcus faecium* (Yang y col., 2012; Zhao y col., 2013; Liao y col., 2015), o *Rhodopseudomonas palustris* (Xu y col., 2014).

Como ya se ha mencionado anteriormente, no sólo especies bacterianas o sus mezclas pueden resultar útiles como agentes probióticos en avicultura, sino que también se han obtenidos resultados positivos mediante el empleo de levaduras, ya sea solas o mezcladas con agentes bacterianos. De este modo, existe numerosa bibliografía reciente que demuestra este hecho (Torshizi y col., 2010; Kim y col., 2012; Bai y col., 2013; Alimohamadi y col., 2014; Zhang y Kim, 2014). Además, un metaanálisis de ensayos de investigación controlados que se llevaron a cabo desde 1980 hasta 2012 realizado por Blajman y col., (2014), con el fin de investigar los efectos de los probióticos en el aumento de peso corporal y la eficiencia alimentaria en los pollos parrilleros, concluyó que la suplementación con probióticos aumentó la ganancia de peso corporal y mejoró la eficiencia alimenticia. En el mismo metaanálisis también se concluyó que la vía de administración que mostró unos mejores resultados fue a través del agua de bebida, y que no se encontraron diferencias estadísticamente relevantes entre el uso de una única especie probiótica con respecto a la combinación de varias especies.

No sólo se obtienen mejoras en el crecimiento y mejora en los índices de conversión de alimento mediante la administración de probióticos, sino que también se obtienen otro tipo de beneficios, como son las mejoras en la inmunidad, medida mediante parámetros como el incremento en los niveles de inmunoglobulinas en suero/plasma,

aumento de los títulos de anticuerpos protectores frente a agentes patógenos, y los cambios en el número de células inmunes (Lee y col., 2011; Bai y col., 2013; Ahmed y col., 2014).

La primera barrera que tenemos tanto los mamíferos como las aves contra los patógenos intestinales, y el lugar en donde se genera la mayor parte de las células que participan en la respuesta inmune es el epitelio intestinal, que además es la mayor superficie de contacto de nuestro cuerpo con el exterior (Roca, P., 2018). En ese sentido, es importante señalar que además de la mejora en los parámetros bio químicos relacionados con la respuesta inmune que anteriormente han sido citados, los intestinos de los pollos de engorde a los que se les administró probióticos mostraron un mejor desarrollo y un aumento de la altura de las vellosidades y la profundidad de la cripta en comparación con pollos a los que se les suministró la misma alimentación pero sin complementarla con probióticos (Lee y col., 2010, Lee y col., 2011; Kim y col., 2012; Sen y col., 2012). La suplementación con probióticos también moduló positivamente la microbiota intestinal y e incrementa la proporción relativa de bacterias tradicionalmente consideradas beneficiosas debido a su papel en la elaboración de ácidos grasos de cadena corta, como *Lactobacillus* spp. o *Bifidobacterium* spp. (Nakphaichit y col., 2011; Yang y col., 2012; Jeong y Kim, 2014; Mookiah y col., 2014; Zhang y Kim, 2014). Los ácidos grasos de cadena corta que producen estas especies bacterianas a partir de la fermentación de hidratos de carbono complejos que llegan a las últimas partes del intestino son principalmente ácido acético, propiónico y butírico, que además de representar por si mismos una fuente de energía para el hospedados, que en se estima entre el 5-10% del total de la energía aportada por la dieta (Roca, P. y col., 2018), juega un papel central en el mantenimiento de otras especies bacterianas y en el mantenimiento del epitelio colónico, del que constituyen la principal fuente de energía (Aziz Mousavi y col., 2018). Además de ello, dichos ácidos grasos de cadena corta de manera indirecta también contribuyen al aporte de nutrientes esenciales, como vitaminas (vitamina K y algunas vitaminas del complejo B, como biotina, cobalamina, ácido fólico, ácido nicotínico, riboflavina, piridoxina y tiamina) que son producidas por la microbiota intestinal y que sin el aporte energético

que les suponen los ácidos grasos de cadena corta no serían producidos en cantidades adecuadas (Abdou y col., 2016).

Aunque numerosas publicaciones muestran la mejora del rendimiento en diferentes especies avícolas como pollos broiler, gallinas comerciales y pavos, también existen trabajos publicados acerca del empleo de probióticos que mostraron un efecto limitado y variable en la promoción del crecimiento y en algunos casos ninguno (Lee y col., 2010; Waititu y col., 2014). Esta incoherencia en los resultados, en contraposición con el consenso general refrendado por el metaanálisis publicado por Blajman y col. (2014), generalmente se deben a las diferencias metodológicas como por ejemplo en el tipo y la dosis de la cepa utilizada, las variaciones de procesamiento, la administración el tiempo y el período, la dieta basal administrada o en condiciones ambientales (Gadde y col., 2017).

Es también importante señalar que no todas las especies bacterianas que potencialmente puedan ser consideradas como probióticos son aptas para ser ingeridas por vía oral y realizar su acción en las últimas etapas del intestino. Así pues, para que un microorganismo pueda ejercer su acción probiótica, debe ser capaz de soportar el procesamiento y almacenamiento, en el caso de ser administrado en el agua de bebida (la vía más eficaz, según lo expuesto anteriormente), debe poder disolverse y aguantar durante un día a la exposición solar o lumínica, sobrevivir en el ambiente ácido gástrico, ser capaces de adherirse al epitelio o a la mucosidad de los intestinos, producir compuestos antimicrobianos, y modular las respuestas inmunes (Cheng y col., 2014). Sin embargo, no todas las cepas exhiben todas las propiedades mencionadas y hay que tener cuidado de seleccionar las cepas o sus combinaciones que logren el máximo efecto beneficioso in vivo, o bien protegerlas para potenciar su supervivencia como la microencapsulación (Han y col., 2013).

1.7. LA APICULTURA.

La aparición de las abejas en la tierra data de aproximadamente setenta millones de años, en la era terciaria. Los primeros indicios de la utilización de los productos por parte de la humanidad, se remontan al periodo neolítico (4000 a 6000 años A.C.) períodos en los se cree que

la miel y el propóleo se utilizaban, como alimentos y con fines medicinales (Noriega, 2014). Las abejas juegan un papel fundamental en la polinización de las plantas, ya que constituyen aproximadamente el 90% de los visitantes de las flores (Biri, 1983).

Según (Rémy y col., 2012) La apicultura o el cultivo de abejas puede definirse como:

La actividad agropecuaria orientada a la crianza de abejas (del género *Apis*) y a prestarles los cuidados necesarios con el objeto de obtener los productos que ellas son capaces de elaborar, y recolectarlos, con el fin de satisfacer las necesidades que el hombre tiene de esos productos.

El conocimiento de la Apicultura tiene aplicación en la medicina humana y los más grandes adelantos útiles para la Medicina veterinaria y zootecnia son la consecuencia de investigaciones científicas con sus posteriores aplicaciones (Hernández Ayala y Rocha Ruiz, 2007).

1.7.1. Las Abejas.

No todas las abejas del género *Apis* son iguales, ya que si bien la especie *Apis mellifera* es la más habitual (Figura 10), también existen otras especies de abejas productoras de miel que son empleadas en apicultura, como son *Apis florea*, *Apis indica* y *Apis dorsala* (Biri, 1983).

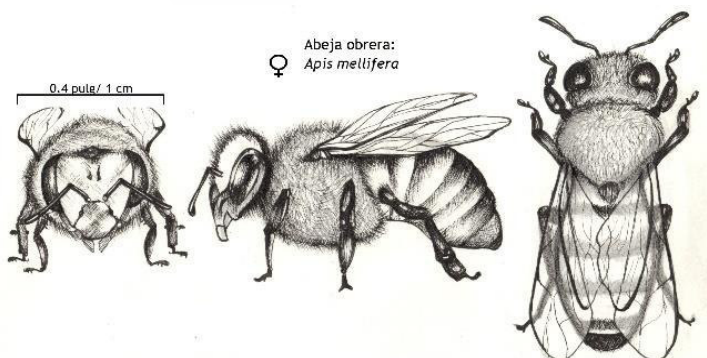


Figura 10. Representación macroscópica de una abeja *Apis mellifera*.
Fuente: (con permiso de publicación del ilustrador) en <https://www.instagram.com/p/CKeLFbypbiZ/>

Estos animales viven en colectividades denominadas enjambres o colmenas. La colmena, enjambre o familia, está formada solamente por una abeja reina (hembra), los zánganos (machos), y las abejas obreras (hembras) (Biri, 1983) (Figura 11). Estas castas se asocian a diferentes y definidas funciones en la colonia; cada una posee sus propios instintos respecto a las necesidades de la comunidad (Hernández Ayala y Rocha Ruiz, 2007).

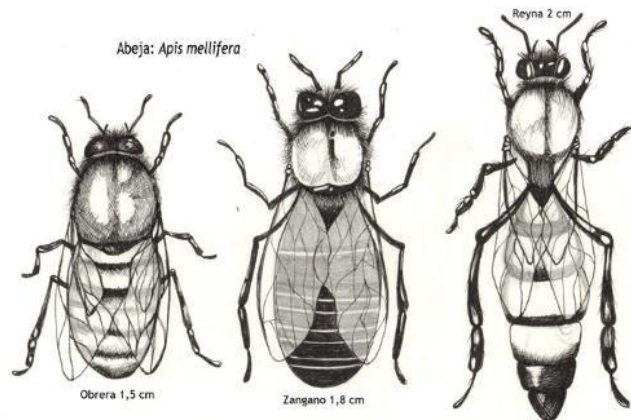


Figura 11. Familia Apícola. Fuente: (con permiso de publicación del ilustrador) en https://www.instagram.com/p/CKeKtn_pPOj/

Una colmena apícola está compuesta de una gran cantidad de abejas, normalmente una colonia contiene de diez a quince millares de abejas, pero en el verano su número aumenta alcanzando a 60000 o más (Biri, 1983; Mendizabal, 2005).

La reina, no interviene en la construcción de la colmena, ni en otras actividades de recolección o atención a las crías. Su única función en la colmena es la ovoposición de huevos tanto fértiles como infértiles. A partir de los huevos fértiles nacen las obreras. Si a partir del tercer día tras el nacimiento estas larvas de obreras son alimentadas con jalea real, se convertirán en futuras reinas gracias a este alimento (Sofiysky, 2002). En condiciones ideales del ambiente y de recursos, la capacidad de postura de una reina es de hasta 3.000 huevos/día. Morfológicamente, la reina tiene el cuerpo alargado, las patas también son más largas y parece tener las alas más cortas (Ros Piqueras, 2009).

Los machos, llamados también zánganos, nacen de huevos no fecundados en celdas más abultadas y grandes que las celdas de formación de obreras. Estos machos tienen por única función la de fecundar la reina, función que cumple uno sólo de los machos, pese a ser numerosos los zánganos de una familia (400 a 500). El cuerpo es más voluminoso que el de la obrera o de la reina. Los ojos son grandes y ocupan casi toda la cabeza, el extremo caudal del abdomen es redondo y cubierto por un penacho de pelos, carentes de aguijón (Ros Piqueras, 2009).

Las obreras, que componen en gran número a la familia, tienen los cometidos más diversos: el acopio de alimentos, la organización del nido, llamado también cámara de cría, el cuidado de sus larvas, la defensa de posibles ataques por parte de saqueadores o de insectos perturbadores; es decir, asegurar una existencia próspera de la familia. (Biri, 1983). Según Ros Piqueras (2009), las obreras tienen a su cargo la mayor parte de las labores de la colmena, entre las que se encuentran labores de limpieza, de cuidado y alimentación de las crías, de recolección, recepción y maduración del néctar, construcción de los panales y de defensa de la colonia. En estas labores diferenciadas, existen estirpes de obreras especializadas, que sólo realizan sus funciones específicas. La vida de las abejas es, pues, de tipo comunitario y existen dos castas: las reproductoras, que no desempeñan ningún trabajo, y las obreras, que morfológicamente son femeninas, pero con los órganos de reproducción atrofiados y de ahí que sólo ejerzan funciones vinculadas a la vida de relación (Biri, 1983).

1.7.2. Importancia de la Apicultura.

La apicultura es un sector ganadero, con características que la definen y diferencian del resto de actividades ganaderas, que cobra una gran importancia, tanto desde el punto de vista social, económico y medio ambiental (Plataforma Tecnológica Española de Sanidad Animal, 2016). El valor económico de la apicultura deriva de la producción de miel y de otros productos apícolas y, en especial, de su acción polinizadora que tiene repercusiones sobre la economía agrícola, porque a través de la polinización que las abejas realizan, fecundan muchas plantas autóctonas o cultivadas, aplicándose la famosa frase

atribuida a Albert Einstein: "*Si las abejas comenzaran a desaparecer, a la humanidad le quedaría pocos años de vida*", enviando un claro mensaje por la importancia de la polinización. Se aprovechan de ella todos los árboles frutales del entorno y otras plantas forrajeras.

La apicultura también contribuye a la producción de otros bienes como polen, propóleo, jalea real y cera, que son productos importantes para la industria alimentaria, farmacéutica, química, etc. (Plataforma Tecnológica Española de Sanidad Animal, 2016). La Apicultura representa una promisorio fuente de ingresos por los múltiples beneficios que se pueden obtener de los apiarios. Aunque la miel es el principal producto que proporciona la apicultura, también a partir de esta práctica se pueden obtener otros productos con gran relevancia económica, como son: cera, polen, propóleos, jalea real o el veneno de abeja (fuente de apitoxina). También pueden ser objeto de valorización comercial la venta de colmenas, reinas o los servicios de polinización proporcionados por apiarios móviles (Mendizabal, 2005).

La localización de las colmenas o apiarios aislados o las explotaciones apícolas deben cumplir algunas normativas específicas respecto a su localización, teniendo en cuenta aspectos como la distancia a poblaciones urbanas o rurales, caminos y carreteras, otro tipo de explotaciones ganaderas e incluso también a centros de cultivos agrícolas. Dicha normativa varía en función del país del que se trate e incluso de la región. En el caso concreto de Ecuador, es posible instalar pequeños apiarios en propiedades situadas cerca de bosques, cultivos de pastos y frutales. Hay que tomar en cuenta la flora apícola existente en un radio de 2-3 km alrededor del lugar donde se instalará el apiario. Para la instalación de los apiarios se debe mantener de 200 m de distancia a las viviendas más próximas (con excepción de la vivienda del dueño de los apiarios), alejadas de caminos transitados por personas, escuelas, estadios o explotaciones animales, y se debe mantener un cerramiento para evitar el ingreso de animales, colocando señalética preventiva del establecimiento de colmenas (Mendizabal, 2005).

Las regiones ideales ubicar un apiario, deben mantener temperaturas templadas, vientos suaves regulares y lluvias moderadas, pero que estén cercanas a una abundante flora apícola durante todo el año, compuestas de variedad floral, arbórea, cultivos, vegetación

natural, que provean néctar y polen a las abejas. De preferencia estar situada fuera del área urbana; Es ventajoso que haya fuentes de agua tranquila en las cercanías de su emplazamiento. Los mejores terrenos son los elevados, con buen drenaje, y apartados del ruido y sin mucha presencia de actividades humanas ni de maquinaria. Los rayos solares influyen de una manera muy importante en la vida de las abejas: El exceso de calor las torna agresivas, y la falta de sol de manera particular en invierno, baja la productividad (Rémy y col., 2012).

La superficie de terreno recomendable para la instalación de pequeños apiarios (10 colmenas) es de 50 m². También existen algunas restricciones específicas de protección medioambiental especial en reservas nacionales. El número ideal de colmenas es de 20 por apiario, pero se puede llegar a un máximo de 25. Es preferible ubicar los apiarios en claros rodeados por árboles que brinden sombra parcial que mejora la actividad de las abejas y facilita las actividades del apicultor. Los apiarios del mismo propietario, en sitios de excelente flora apícola, pueden estar distanciados entre 500 y 1000 m (Guerrini y col., 2009). La unidad de cría y producción de una colmena tipo Langstroth. (figura 12), está conformada por las siguientes partes: Caballete, piso, cámara de cría (con sus respectivos marcos), (cubrepiquera) rejilla excludora, alza melaria o cámara de producción (con sus respectivos marcos), entretapa y techo.



Figura 12. Colmena tipo Langstroth.
Fuente: AdobeStock N° de licencia: 346488079.

1.7.3. Productos que se obtienen de las abejas.

No cabe duda de que el mantenimiento resulta imprescindible para una mayor y mejor producción de miel. El mejoramiento de la calidad y la oferta diferenciada de los productos, han mejorado la demanda del consumidor, su valorización y su promoción en los mercados (Plataforma Tecnológica Española de Sanidad Animal, 2016).

Los productos generados por las actividades apícolas las detallamos en la Tabla 5.

Tabla 5. Origen de los productos de la colmena

Origen	Producto
Producidos por las abejas	cera, jalea real, reinas y apitoxina
Introducidos por las abejas	néctar que origina miel, polen y propóleo.

Fuente: (Ros Piqueras, 2009).

La cera es el material básico con el que las obreras construyen los alvéolos de la colmena. Es producida por las glándulas cereras de la parte ventral del abdomen de las obreras cuando tienen de 13 a 19 días de edad. La cera se produce inicialmente en forma líquida y posteriormente se endurece al contacto con el aire, formando escamas pequeñas de color blanco, estas son retiradas del abdomen por medio de las patas y llevadas a la boca, para ser amasadas y utilizadas en la elaboración de los panales (Vásquez y col., 2012). En forma general, la cera está compuesta de una mezcla de alcoholes, ácidos, hidrocarburos, éteres, aminoácidos y otros ácidos. La cera de abejas es empleada en la fabricación de cosméticos, productos farmacéuticos, laminas para panales, cerámica, betunes, ceras para piso, talabartería, impermeabilizantes, lubricantes, barnices pinturas y velas litúrgicas (Ros Piqueras, 2009).

Jalea Real: constituye la mezcla de secreciones de las glándulas hipofaríngeas y de la glándula mandibular de las abejas obreras nodrizas, (Vásquez y col., 2012). La jalea real, constituye el alimento de las larvas juveniles hasta el tercer día de vida, así como el alimento exclusivo de la reina durante toda su vida. Las materias primas que las abejas emplean para su elaboración, son el polen, el néctar y el agua. En su estado original se presenta de color blanco nacarado, concentrada en productos nitrogenados y con sabor ácido amargo. A la jalea real se le

atribuyen propiedades alimenticias y medicinales por ello la demandan y consumen las personas (Ros Piqueras, 2009).

Reinas: La reina de la colmena constituye el vehículo reproductivo de la colmena, pues es la única que ovoposita huevos: de los fértiles, se producirán las abejas obreras (huevos con el número completo de pares cromosómicos $n=32$), y de los infértiles surgirán los zánganos o también nuevas reinas (con la mitad de cromosomas $n=16$). Por tanto, de una única reina, depende toda la calidad genética de la colmena. Con el tiempo la reina va perdiendo vigor, por lo que es recomendable cambiarla cada dos años a fin de mantener la productividad reproductiva de la colmena (Vásquez y col., 2012). Las larvas que se vayan a destinar para la producción de reinas, conviene que sean seleccionadas en función de parámetros heredables como: índice de producción de miel, mansedumbre, producción melífera, características de construcción, En periodos de escasez floral, las reinas reducen la postura y la población de la colmena baja drásticamente hasta la nueva floración, en donde las pecoreadoras nuevamente ingresan néctar y polen, y la reina vuelve a normalizar la postura (Salas, 2005). Algunos proveedores de productos apícolas, ofrecen reinas: vírgenes, fecundadas o conformando ya el núcleo (Vásquez y col., 2012).

Veneno o apitoxina: es producido por las abejas obreras en las glándulas que tienen situadas en la parte posterior del último segmento abdominal. La apitoxina posee actividades que tienen potencial farmacológico, como antiartríticas, antialérgicas, bactericidas, hemolíticas, anticoagulantes y tónicas (Ros Piqueras, 2009), y recientemente se le han descubierto también propiedades antimicrobianas (Arteaga y col., 2019). Es vasodilatador, fluidifica la sangre al ser anticoagulante, se le reconocen propiedades en casos de reumatismo, en la actualidad es motivo de muchas investigaciones en todo el mundo (Pascoal y col., 2019). En pollos de engorde, la apitoxina influye en la biosíntesis de corticosteroide. con lo que se acelera la hidrólisis de carbohidratos y lipólisis de grasas, mejorando el performance y la respuesta al permanente desafío del intensivo proceso productivo de las aves (Guerra y col., 2018).

La miel: constituye uno de los primeros alimentos del ser humano. El hombre según la historia comenzó a consumir la miel de las abejas

hace por lo menos 20 siglos AC. Desde entonces, la miel es considerada como el primer edulcorante usado por el ser humano y solo en el siglo XIX esta fue sustituida por el azúcar como el edulcorante más consumido en el mundo (Scott, 2001). Es una sustancia dulce elaborada del néctar de las flores o de secreciones extra florales recolectado por las abejas, que luego combinan con sustancias específicas como: enzimas, minerales y otras, y lo transforman en carbohidrato para almacenarla en los panales, y sellarla con cera (opercular). (Vásquez y col., 2012). La miel posee una presentación viscosa, relativamente ácida y su color varía desde clara a oscura (Scott, 2001). Según esta misma fuente, tiene propiedades que ayudan a la salud, como: aumenta la resistencia del organismo, fortalece los bronquios, es antipirética, antiséptica, sedativa, antianémica, digestiva y laxante. La miel se compone esencialmente de azúcares, predominantemente glucosa y fructosa además de otros como sacarosa, maltosa, melecitosa y otros oligosacáridos. Además, contiene algunas proteínas, enzimas, ciertos ácidos orgánicos, minerales, así como vestigios de hongos, algas, levaduras y otras partículas sólidas (Suasnávar y col., 2015).

El polen: constituye la parte masculina de las flores, este producto es recolectado por las abejas obreras pecoreadoras, que lo colectan y lo transportan a la colmena, para depositarlo dentro de las celdas que rodean la cámara de cría. Posteriormente, lo convierten en papilla para alimentar larvas de obreras y zánganos de más de tres días, también es el alimento para los adultos, pues es una excelente fuente de proteínas, vitaminas y minerales. Contiene 25% de proteínas (albuminosas), vitaminas A, B, D, E y K, minerales, enzimas, pigmentos naturales, carbohidratos y aceites esenciales. El polen, comercialmente, se emplea en el sector de alimentación, cosmética y de terapéutica, puesto que se usa para algunas situaciones o afecciones como alimentación de niños, antiinflamatorio o potenciador del sistema inmune (Scott, 2001).

1.7.3.1. El propóleo.

El término proviene del griego propolis que significa, pro = antes o en defensa de y polis = ciudad, es decir antes o delante de la ciudad, en este caso, de la colmena (Ros Piqueras, 2009).

El propóleo es una sustancia aromática, resinosa, de sabor amargo, de consistencia cerosa, cuya temperatura de fusión oscila de los 60-69 °C; es insoluble en agua, pero es soluble en éter, en alcohol caliente, amoníaco, esencia de trementina y en potasa. (Biri, 1983). El propóleo es un material resinoso recolectado por las abejas con sus mandíbulas (*Apis mellifera* L.), principalmente de brotes de hojas, botones florales, tallos y grietas en la corteza de varias especies de árboles. Se transporta a la colmena y se mezcla con cera de abejas para formar materiales adhesivos fuertes (Souza y col., 2019).

Tabla 6. Métodos de Recolección del propóleo

Tipo	Método	Ventaja/desventaja
Raspado:	Realizado con la palanca o espátula, retirando la sustancia depositada entre los cuadros, la subtapa y cajas, y en la piquera.	La calidad es baja por presentar alta contaminación con polvo y materias extrañas como madera y pintura; además, tiene mala granulometría
Marco de madera	Colocando cuñas entre la tapa interna y la última cámara, de tal manera que las abejas rellenen con propóleo el espacio abierto.	Presenta desventajas, por contaminación con polvo y pintura.
Mallas de nylon o plástico:	Las abejas tienden a cerrar los espacios de la malla, rellenándolas con propóleo.	Hay que extremar los cuidados cuando se manipula la malla o la tapa durante las revisiones.
Tramprópolis	Tapa interna adaptada, para dejar rendijas que las abejas van rellenando es, de fácil instalación y colecta.	Protege contra enemigos naturales, y, mantiene al propóleo libre de polvo y otros contaminantes.

Fuente: Vásquez y col., (2012).

La resina aromática que las abejas recogen para elaborar el propóleos primero es de color claro y de consistencia blanda; sin embargo, después de su utilización, al envejecer, se vuelve más oscura y dura (Biri, 1983). Arrate (2008) refiere que sus características morfológicas varían de acuerdo a las condiciones circundantes a la colmena, como son clima o flora apícola, debido a estas situaciones, el color puede variar fácilmente. Su densidad es superior a la de la cera de abejas. A una temperatura aproximada de 15 °C es un material muy duro

y a temperaturas superiores se ablanda y se vuelve pegajoso. La fracción de resinas y bálsamos es la que agrupa la mayoría de compuestos con la actividad biológica característica del propóleo, principalmente contiene compuestos fenólicos derivados del reino vegetal y con capacidades farmacológicas demostradas (Arrate, 2008). En su artículo, Vásquez y col., (2012) refieren los cuatro tipos de colecta o recolección del propóleo que se pueden realizar, y que pueden consultarse en la Tabla 6.

La composición química del propóleo es compleja (Tabla 7) y varía según la fuente vegetal de donde provenga, pero cualquier tipo de propóleo puede estar compuesto según varios autores que coinciden en mencionar la siguiente composición.

Estudios más profundos han demostrado, que los componentes principales de las resinas y bálsamos son flavonoides (más de 25%) que son derivados de flavonas, polifenoles y éteres metílicos. En los vegetales, los flavonoides están unidos a los glucósidos y en forma libre en el propóleo. Son liberados por las enzimas de la saliva de las obreras. Los flavonoides libres poseen considerables propiedades antibacterianas. A parte de ellas, las mismas propiedades poseen varios ácidos orgánicos, terpenos, aldehídos, éteres, alcoholes y fenoles del propóleo (Sofiysky, 2002).

Tabla 7. Composición promedio de sustancias que forman parte del propóleo

Compuesto	%
Resinas y bálsamos	50-60%
Ceras	25-30 %
Aceites Volátiles esenciales	5-10 %
Polen	5%
Sustancias orgánicas y minerales	5%

Fuente: Sofiysky, 2002; Arrate, 2008; Ros Piqueras, 2009

Debido a su contenido en numerosos principios activos, el extracto alcohólico obtenido a partir del propóleo, o mejor conocida como tintura de propóleo, ha mostrado efectos sobre la salud humana, como son los efectos inmunoestimulantes. Además, también se han encontrado evidencias de actividades, como son las acciones

antioxidante, antimicrobiana, cicatrizante, analgésica, anestésica, antiinflamatoria, antifúngica, entre otras (Arrate, 2008).

La creciente preocupación por mejorar la salud humana, ha hecho que la comunidad científica centre su atención en alternativas funcionales que contribuyan a conseguir la prevención y reforzar el riesgo de las enfermedades. El beneficio de estos productos en particular, reside en su estructura química, y por tanto el estudio, la identificación y posterior extracción de componentes del propóleo proporciona un instrumento de mucha utilidad, que permite la elaboración de productos en base a su elevada concentración en compuestos biológicamente activos.

El propóleo, se emplea para sellar herméticamente las hendiduras de la colmena para fijar los bastidores, para reforzar las celdas, para reducir la abertura de la colmena, para cubrir o sea propolizar animales de índole diversa que hayan entrado en la colmena y hayan sido muertos por las abejas guardianas, e impedir la generación de infecciones dentro de la colmena (Biri, 1983; Cuesta-Rubio y col., 2017). El propóleo consta de una mezcla de sustancias producidas por las abejas empleando exudados o partes de las plantas, que se unen a la cera de abejas y a las secreciones salivales de la abeja obrera ricas en enzimas. El propóleo no es sólo un material de construcción para las colmenas, sino que es el "arma química" más importante que utilizan las abejas para mantener un ambiente interno aséptico en las colmenas. Su potencial como agente antimicrobiano tiene justificado uso medicinal desde hace siglos (Bankova y col., 2014). El propóleo ha sido utilizado desde la antigüedad en la medicina tradicional (sus primeros usos datan del año 300 antes de Cristo) (Anjum y col., 2019) y varios estudios han demostrado su ventaja como antiinflamatorio, antiulceroso, antitumoral, inmunoestimulante, hepatoprotector, antibacteriano, antimicótico y antiparasitario (Bankova y col., 2014; Catchpole y col., 2015). Hoy en día, se encuentra como ingrediente activo en suplementos dietéticos y formulaciones cosméticas (Anjum y col., 2019; Farooqui y Farooqui, 2012).

A pesar de todos sus beneficios, el propóleo tiene la desventaja de tener una composición química muy variable, que depende de la vegetación alrededor de la colmena y de la estacionalidad (Cuesta-

Rubio y col., 2017). Por este motivo, en función de la zona de procedencia, vegetación y estación del año, el propóleo presenta una composición muy diferente que condiciona de un modo importante su calidad. Generalmente, el contenido en flavonoides suele considerarse como el factor más importante que condiciona dicha calidad, y por consiguiente su precio. Sin embargo, existe otra amplia gama de compuestos que pueden estar presentes en el propóleo, como son los triterpenoides, las benzofenonas preniladas y los ácidos orgánicos, que también condicionan de un modo importante su actividad biológica (Cuesta-Rubio y col., 2017).

Para su comercialización, debe diluirse en disolventes polares, ya que es insoluble en agua. El más habitual es con mucha diferencia el etanol (Anjum y col., 2019). Su consumo se ha potenciado en los últimos años, llegando a ser considerado en algunos países como “alimento funcional” (Anjum y col., 2019).

En lo que respecta a su actividad antimicrobiana, el propóleo ha demostrado presentar actividad contra algunos microorganismos potencialmente patógenos tanto de las aves como de los humanos como *Enterococcus* spp., *E. coli* y *S. aureus* (Martín y Pileggi, 2004; Silici y Kutluca, 2005; Kuropatnicki y col., 2013; Kasiotis y col., 2017). También se ha puesto de manifiesto que los extractos etanólicos de propóleo presentan mejor efecto antimicrobiano contra gram-positivas que contra las gram-negativas (Wagh, 2013; Martinotti y Ranzato, 2015; Harfouch y col., 2016). El modo de acción antimicrobiana del propóleo se debe a la interacción de los compuestos fenólicos que contiene con otros compuestos como la pinocembrina, la galangina y la pinobanksina (Wagh, 2013). Análogamente, la actividad antibacteriana tiene lugar debido a otros compuestos activos, como los compuestos aromáticos (ácido cafeico) y los flavonoides (Parolia y col., 2010). Además, el propóleo actúa como agente bactericida, para detener la división de la célula bacteriana, destruir la pared celular, el citoplasma bacteriano (Parolia y col., 2010) y detener la síntesis de proteínas (Machado y col., 2017).

1.8. PRODUCCIÓN APÍCOLA EN ECUADOR.

La apicultura en Ecuador se inicia en Cuenca con especímenes traídas desde Francia, en el año de 1870, desde donde se propagaron a todo el país (Cabrera, 2018). La demanda interna del consumo de miel y otros productos tomaron mucho valor económico gracias a las propiedades organolépticas de la miel, como endulzante natural y a su contenido en compuestos potencialmente beneficiosos para la salud humana. La gran aceptación entre los consumidores de los productos obtenidos de la apicultura, permitieron que la actividad apícola se expanda rápidamente en Ecuador, presentándose las primeras apícolas privadas en Guayaquil y posteriormente en Loja, Manabí y Quito (Granda Ojeda, 2017).

Las primeras abejas que llegaron a Ecuador, fueron las abejas sin aguijón, denominadas Meliponas, y fueron cultivadas por los pobladores indígenas y también por los primeros mestizos. La posterior llegada a Ecuador de las estirpes de abejas europeas, causó un impacto muy negativo en la supervivencia de las abejas nativas, a las que consiguieron desplazar de grandes zonas del país debido a su mayor tamaño y la formación de colmenas con un mayor número de individuos. Tradicionalmente se ha empleado en la apicultura ecuatoriana, la denominada abeja italiana (*Apis mellifera* var. *ligustica*), hasta que, en la década de los años 70 del siglo XX, ingresó a Ecuador la abeja africana (*Apis mellifera* var. *adansoni*), que actualmente es la que cuenta con mayor presencia en Ecuador (Vivas Espinosa, 2015).

El 90% de los apicultores manejan abejas de manera no profesional, solamente un 10% vive de la apicultura, la mayor parte de apicultores se dedican a producir miel y en nivel muy bajito los otros productos de la colmena, repartiendo la generación de productos en la siguiente proporción miel de abeja 85%, propóleo 6 %, cera de abejas 5%, polen 3%, jalea real 1% y apitoxina 0,1% (Cabrera, 2018).

En Ecuador, según datos del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca (MAGAP), el consumo de miel de abeja se registra en 601 Tm por año, cifra que resume el incremento del sector. Por su variedad de ecosistemas, Ecuador ofrece múltiples espacios en los que se desarrolla esta actividad, la misma que puede encontrarse desde los 80 hasta los 3.400 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m) (El telégrafo, 2017).

La apicultura en nuestro país es una actividad aun deficitaria para el mercado objetivo, ya que la producción total nacional no cubre la demanda interna. Esta circunstancia puede ser imputada a varios factores, como son una falta de desarrollo de la actividad apícola, falta de apoyo del sector estatal, una débil organización de productores apícolas o elevada tasa de deforestación.

Por todo ello, la producción de miel en el Ecuador no es suficiente, cubriendo sólo el 60% del consumo del país (Vivas Espinosa, 2015). Existe además una fuerte competencia con la miel importada de China, Argentina o Uruguay al igual que con las que ingresan clandestinamente de Colombia o Perú. A esto se añaden otras mieles adulteradas, que incluso atacan contra la salud de los consumidores (Líderes, 2018).

Se estima que en el país no existen más de 2000 apicultores, los que están establecidos tienen 25 colmenas por apicultor en promedio, con una población nacional de no más 40 a 50 mil colmenas. La máxima cantidad de colmenas que tienen los apicultores grandes en Ecuador es de 600 colmenas (Vivas Espinosa, 2015). La productividad apícola en alcanza, en promedio, 10,2 kg de miel por colmena y por año (Líderes, 2018). La región sierra, concentra la mayor cantidad de productores, ubicando a Pichincha como una de las provincias de mayor producción (Granda Ojeda, 2017).

1.8.1. Apicultura en Imbabura

Imbabura es una provincia, con la mayor parte de la población considerada como mestiza tomando en cuenta que posee alta población indígena en el sector rural, el censo de población y vivienda del 2010 registró 398.244 habitantes (INEC, 2010) y una proyección de crecimiento de 470.129 para el 2019 (Gobierno de Imbabura, 2016). En la provincia, los apiarios se encuentran distribuidas en todos los cantones copando todos los pisos altitudinales comprendidos entre los 70 m hasta 3.100 m de altitud. La mayor concentración de productores se encuentra localizada en los cantones Cotacachi, Ibarra y Otavalo. La producción de miel y los demás productos, es influenciada directamente por el comportamiento del clima y de la floración, el 59%

de productores registran el mayor volumen de producción en el período de septiembre a diciembre (Fuertes Romo, 2017).

Agrocalidad en el 2016, refiere según el catastro o registro de apicultores que, en la provincia existen un total de 1.926 colmenas en producción, de las que el 48,49% pertenecen a los productores de Cotacachi y el 36,09% a productores de Ibarra. La mayor parte de los apicultores vende miel y tan sólo 3 productores ofertan jalea real en la provincia. El propóleo y polen se comercializan dentro y fuera de la provincia a varios intermediarios. Los establecimientos dedicados a la comercialización de productos apícolas en la provincia, tienen a la miel y al propóleo como los productos de mayor salida (Fuertes Romo, 2017).

1.8.2. Flora Apícola.

Flora apícola es el conjunto de especies vegetales, a partir de cuyas flores las abejas obtienen néctar y polen. Esta definición se dirige a la flora compuesta por las plantas visitadas por abejas para obtener polen, resinas o néctar (De la Torre y col., 2008). Las principales familias nectaríferas y poliníferas conocidas en el mundo son: Fabaceae, Lamiaceae, Brassicaceae, Poaceae y Asteraceae. Pues son muy apetecibles por las abejas por su gran cantidad de néctar y alta concentración de azúcares, sobre el 50%.

Ecuador es un país que tiene un gran potencial para la producción apícola gracias a la biodiversidad climática y su abundancia y diversidad de flora. El conocimiento de la flora apícola, de cada región en particular, la época, duración de su floración y de su valor como fuente de néctar, de polen o ambas sustancias a la vez, es indispensable para conseguir mejores resultados en la producción apícola. Además, dicho conocimiento aporta al apicultor una información esencial de cara a establecer las pautas de manejo de sus colmenares y ubicaciones ideales (Cabrera, 2018). En la producción apícola influyen gran cantidad de factores diferentes relacionados con el clima, como las condiciones de humedad ambiental, la presión atmosférica, las temperaturas medias y las más extremas, o la pluviometría. Estos factores además de condicionar la actividad de las abejas en sí también

condicionan de un modo muy importante la cantidad y variedad de flora vegetal.

En Ecuador, las abejas son polinizadores naturales muy eficaces y eficientes, gracias a sus características físicas y biológicas (Granda Ojeda, 2017), especialmente en zonas templadas y en casi la mayor parte de la región interandina, la miel proviene principalmente de especies vegetales foráneas, como son el eucalipto (*Eucalyptus glóbulus*), la alfalfa (*Medicago sativa*), los cítricos (*Citrus* sp), el aguacate (*Persea americana*), la mora (*Morus* sp) y (*Rubus* sp), o el maíz (*Zea mays*). En la zona costera, las especies vegetales que habitualmente son empleadas como fuentes de polen son el laurel (*Laurus nobilis*), o el banano (*Musa paradisiaca*). Entre las especies vegetales prateses podemos citar el trébol (*Trifolium* sp), el diente de león (*Taraxacum officinale*), el llantén (*Plantago major*). En zonas de monte bajo y rastrojos, abundan las especies crucíferas como el nabo (*Brassica rapa*) y rábano (*Raphanus sativus*), así como una gran cantidad de vegetación silvestre, entre ellas la chilca (*Baccharis salicifolia*), o la ñachag (*Bidens humilis*) (Granda Ojeda, 2017). Cabrera, (2018) menciona algunas otras especies vegetales presentes en Ecuador que pueden ser fuente habitual de polen para las abejas como el cacao (*Theobroma cacao*), achotillo (*Nepheleum lappaceum*), café (*Coffea arábica*), guaba (*Inga feuilleei*), capulí (*Muntingia calabura*) y manzana (*Malus domestica*).

1.8.2.1. Flora apícola en la provincia de Imbabura.

La provincia de Imbabura es una región con gran presencia de espacios boscosos que posee una climatología suave, aspectos ambos que son muy favorables para la producción apícola. Según investigaciones recientes realizadas por la Universidad Tecnológica Equinoccial del Ecuador, en la región interandina se encuentra el 80% de los apicultores del país, concentrándose el 25% de la producción en las provincias de Pichincha e Imbabura. Además de la miel, derivada de la producción apícola también se obtienen otros productos para ofertar como el propóleo (Cuesta-Rubio y col., 2017).

La descripción más cercana que se presenta en la región, corresponde a la caracterización ambiental de la provincia de Imbabura realizada por

la Dirección del Gestión Ambiental de la prefectura de Imbabura, que describe la flora más representativa de la provincia agrupada en función de los ecosistemas, los mismos que se agrupan en unidades mucho más amplias: páramo, bosque montano alto, matorral alto andino (Gobierno Provincial de Imbabura, 2018).

Según el trabajo de Fuertes Romo (2017), se refieren especies apícolas en Imbabura como son: chaparro, puma maqui, eucalipto, aguacate, arrayan, capulí, guaba, zabaleta, aguacate, guarango, laurel, cholán, aliso, algarrobo, chilca. frutales limón, mandarina, naranja, girasol, mora, y entre las plantas pequeñas alfalfa, trébol, mostaza, matico, tipo, iso, flores silvestres, entre otras.



2. OBJETIVOS

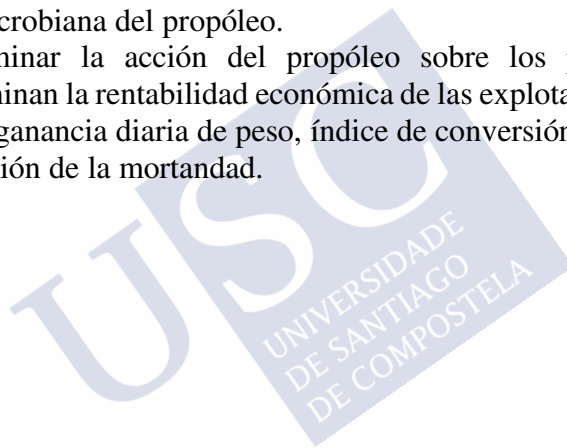
La presente tesis doctoral tiene como finalidad, estudiar, después de la caracterización química del propóleo producido en la provincia de Imbabura, la acción bactericida y/o bacteriostática de esta resina apícola, sobre las bacterias patógenas habituales del tracto gastrointestinal de los pollos de engorde en la provincia. Para ello se combinarán técnicas de campo con técnicas in vitro, para finalmente estudiar sus efectos sobre manadas de aves en diferentes localizaciones, de diferentes tamaños, altitudes y demás circunstancias que mejoren su actividad.

Como objetivos concretos a evaluar, se plantearon los siguientes:

- 1) Determinar la composición cualitativa del propóleo de cada uno de los cinco cantones de la provincia de Imbabura.
- 2) Establecer in vitro la dosis bactericida de los diferentes propóleos de Imbabura contra bacterias patógenas más representativas de pollos de engorde de la provincia de Imbabura.
- 3) Analizar la acción bacteriostática o bactericida del propóleo en pollos de engorde expuestos experimentalmente a las enterobacterias patógenos más prevalentes en la provincia de Imbabura.
- 4) Comparar la acción de los antibióticos habitualmente empleados como promotores de crecimiento en la región, contra la acción antimicrobiana del propóleo.
- 5) Determinar la acción del propóleo sobre los parámetros que determinan la rentabilidad económica de las explotaciones avícolas, como ganancia diaria de peso, índice de conversión del alimento, o reducción de la mortandad.

Como objetivos concretos a evaluar, se plantearon los siguientes:

- 6) Determinar la composición cualitativa del propóleo de cada uno de los cinco cantones de la provincia de Imbabura.
- 7) Establecer in vitro la dosis bactericida de los diferentes propóleos de Imbabura contra bacterias patógenas más representativas de pollos de engorde de la provincia de Imbabura.
- 8) Analizar la acción bacteriostática o bactericida del propóleo en pollos de engorde expuestos experimentalmente a las enterobacterias patógenas más prevalentes en la provincia de Imbabura.
- 9) Comparar la acción de los antibióticos habitualmente empleados como promotores de crecimiento en la región, contra la acción antimicrobiana del propóleo.
- 10) Determinar la acción del propóleo sobre los parámetros que determinan la rentabilidad económica de las explotaciones avícolas, como ganancia diaria de peso, índice de conversión del alimento, o reducción de la mortandad.



3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. DESCRIPCIÓN Y LOCALIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.

La provincia de Imbabura se encuentra ubicada en la zona 1 del Ecuador (Zona Norte), en la información tomada del GAD provincial de Imbabura. Esta provincia cuenta con una superficie de 4.353 Km², localizada entre las coordenadas: 00° 07 y 00° 52 latitud norte; 77° 48´ y 79° 12´ longitud oeste. A su vez, la provincia de Imbabura está organizada administrativamente en 6 cantones diferentes, denominados Ibarra, Antonio Ante, Cotacachi, Otavalo, Pimampiro y San Miguel de Urcuquí (Gobierno Provincial de Imbabura, 2016).

En las inmediaciones de la provincia, se recogieron, por una parte: A) Muestras de propóleo, que fueron caracterizadas en su composición química y se establecieron comparaciones entre ellos, a fin de determinar cuáles fueron los más adecuados para ser utilizado en los distintos ensayos posteriores, y B) Muestras de hisopados cloacales de pollos de engorde, para determinar las bacterias entéricas patógenas de mayor prevalencia en la industria avícola de la provincia.

3.2. DETERMINACIÓN CANTONAL DE LA COMPOSICIÓN DE PROPÓLEOS OBTENIDOS EN LA PROVINCIA DE IMBABURA.

La recolección de las muestras de propóleo fue realizada mediante el método de raspado con la palanca o espátula retirando el propóleo depositado, entre los cuadros de las tapas, en la subtapa y marcos superiores de las colmenas, siguiendo el procedimiento que se muestra en la Figura 13.



13. Procedimiento de recolección de propóleo por raspado con palanca.

La colecta de propóleos fue realizada entre los meses post invierno de abril a julio del año 2016, tomando como base el catastro de apicultores de la provincia, proporcionado por (Agrocalidad, 2016). El muestreo se hizo teniendo en cuenta el volumen de producción de cada uno de los cantones que forman parte de la provincia de Imbabura, como ya se mencionó, a de raspado directo con espátula limpia y libre de sustancias contaminantes, (INEN, 2015) de la parte superior de las colmenas (tapas y marcos), De cada una de las colmenas pertenecientes al mismo apiario se tomaron pequeñas cantidades, hasta completar un total de 150 - 300 g de muestra por apiario.

De los seis cantones, fueron recolectadas 28 muestras, en base a la proporción de producción apícola en cada cantón (Tabla 8), se empacaron y marcaron debidamente y fueron conducidas a laboratorio, en donde se realizaron los análisis descritos en la Tabla 8.

Tabla 8. Distribución de las muestras de propóleos recolectados en los diferentes cantones de la provincia de Imbabura.

Cantón	Colmenas /cantón %	Apicultores /cantón %	N° muestras	% Muestreo
Antonio Ante	5%	7%	2	7%
Cotacachi	51%	50%	14	50%
Ibarra	21%	18%	6	21%
Otavalo	12%	10%	2	7%
Pimampiro	1%	3%	2	7%
Urcuquí	10%	13%	2	7%
Total	100%	100%	28	100%

Fuente: Agrocalidad (2016), Catastro Apícola de Imbabura.

3.2.1. Preparación de los extractos en laboratorio e identificación de sus características químicas.

Las muestras fueron conducidas a los laboratorios de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA) de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador sede Ibarra (PUCESI), en donde se realizaron los análisis principales de caracterización química repitiendo cada análisis por triplicado, siguiendo los métodos descritos en la Norma NTE INEN 2794, (INEN, 2015) los mismos que se describen rápidamente en la Tabla 9, e ilustrados en la Figura 14.

Tabla 9. Métodos empleados para la caracterización química de los propóleos recolectados.

Determinación	Procedimiento empleado	Fórmula de cálculo
Porcentaje de Humedad	Mediante procedimiento termogravimétrico con una muestra de 5 gr de propóleo, se realizó por método de secado en estufa a 105 °C por 150 minutos y luego hasta peso constante, se procedió a realizar el cálculo	$H = (M1 - M2) \times 100 / M1$ <p>H=% contenido de humedad, en fracción de masa. M2= g masa del crisol con la muestra desecada. M= g masa del crisol con la muestra inicial. M1= peso del crisol más muestra húmeda</p>
Porcentaje Cenizas	Calcinamiento de 1 g de muestra durante 180 min a 550 °C, luego se llevó a peso constante.	$C = \left[\frac{m_c - m_{550}}{m - m_{550}} \right] \times 100$ <p>100C = (Mc/M) x100 C= es contenido de cenizas, en fracción de masa expresada en porcentaje. Mc= g masa del crisol con la muestra desecada. M= g masa del crisol con la muestra inicial.</p>
Porcentaje Ceras (Sustancias Extraíbles en hexano)	Gravimetría del residuo obtenido empleando éter de petróleo (50 °C) mediante extracción en equipo Soxhlet, durante 8 h, luego se destiló el solvente y se procedió al secado del extracto en estufa a 105 °C hasta peso constante.	$SE = \left[\frac{(Bc1 - Bc0)}{m} \right] \times 100$ <p>SE contenido de sustancias extraíbles en n-hexano, en fracción de masa expresado en porcentaje. Bc1= masa del balón con sustancias extraíbles (seco), en g. Bc0 = masa del balón vacío (seco), en g. M= masa de la muestra, en g.</p>
Porcentaje de impurezas mecánicas	A través de un equipo Soxhlet, se pesó 2,5 g de propóleo poniendo en el cartucho la muestra, se colocó alcohol y se ingresó al extractor de grasa a 210 °C	$IM = \left[\frac{(P1 - P)}{m} \right] \times 100$ <p>IM contenido de impurezas mecánicas, en fracción de masa expresada en porcentaje. P1= masa del cartucho (o el papel) seco, en g. P= g de masa del cartucho (o el papel) vacío seco. m= masa de la muestra, en g.</p>
Solubilidad o sustancias extraíbles en etanol	Se colocó en el balón del extractor Soxhlet un volumen adecuado de etanol, se pesó 1 g de propóleo desgrasado, y se le añadieron 10 mL de alcohol etílico (96% v/v); en agitación, se filtró a vacío en papel Whatman El residuo sólido remanente se secó a temperatura	$R = \left[\frac{(BR1 - BR0)}{m} \right] \times 20$ <p>contenido de resinas, en fracción de masa expresada en porcentaje BR1= g masa del balón con resinas (secas).</p>

Índice de oxidación	<p>ambiente en desecador de vidrio hasta peso constante, que corresponde al material insoluble en etanol.</p> <p>En un matraz Erlenmeyer se disolvieron 0,20 g de propóleos en 5,0 mL de alcohol etílico y 100 mL de agua destilada. La solución se agitó y filtró. Una alícuota de 10 mL de filtrado se aforó a 100 mL con agua destilada. A 2,0 mL de esta solución, se adicionó 1,0 mL de ácido sulfúrico al 20% y 1 gota de solución de permanganato de potasio 0,10 N.</p>	<p>B_{R0}= masa del balón vacío (seco), en g. m= masa de la muestra, en g.</p> <p>Índice de oxidación. Se mide el tiempo de decoloración de un volumen de 0,05 mL de solución de permanganato de potasio ($KMnO_4$) 0,1 N, agregado a 2 mL de una suspensión acuosa de propóleos.</p>
Porcentaje de Fenoles	<p>Para determinar el porcentaje de fenoles se siguió el método publicado por Cruzado y col., (2013). Para el análisis se utilizó las muestras liofilizadas M1, M2, M3 y M4..</p>	<p>La determinación del contenido en fenoles totales se realizó mediante la comparación con una recta patrón realizada con ácido gálico, mediante la fórmula Porcentaje de fenoles = Absorbancia + 0,0839/0,1212. La lectura del resultado en mg / L en la ventana de la escala Kit de prueba de fenoles PL -1.</p>
Porcentaje de Flavonoides	<p>Para la curva de calibración se prepararon soluciones de 2 μg/mL, 4 μg/mL, 6 μg/mL, 8 μg/mL y 10 μg/mL de quercetina, respectivamente.</p> <p>En seis matraces aforados de 25,0 mL se colocaron 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL y 2,5 mL de la solución patrón de quercetina y se dejó uno como blanco. Se agregaron 0,5 mL de la solución de tricloruro de aluminio a cada una de ellas y al blanco. Se enrasó a 25 mL con metanol. Se dejó 30 min en la oscuridad, y se leyeron las absorbancias a 425 nm.</p> <p>Se preparó un blanco con 0,1 mL de alcohol etílico y 0,5 mL de solución.</p>	<p>La ecuación General</p> $Fit = \frac{Abs}{b} \times \frac{Vs}{Vt} \times \frac{Vc}{10000 \times M}$ $F1 = \frac{Abs}{b} \times \frac{2,5}{M}$ <p>F1 contenido de flavonoides totales de propóleos, en gramos por cien gramos.</p> <p>El resultado obtenido en la ecuación indica el contenido de flavonoides totales, en fracción de masa de propóleos en porcentaje, expresado como su equivalente en quercetina dihidratada.</p> <p>b= pendiente de la recta M= masa de muestra.</p>



Figura 14. Procedimientos para la caracterización de propóleo: de derecha a izquierda, preparación de muestras, determinación de ceras, extracción de solubles, determinación de grasa, índice de oxidación, determinación de fenoles.

Al momento de la recolección de propóleo en los apiarios, se realizó la georreferenciación respectiva, y se procedió a la toma de datos informativos complementarios, como son: cantidad de producción de las colmenas, razas de abejas, enfermedades más comunes padecidas por las abejas en las últimas temporadas. En la (Tabla 10), se presentan las principales especies apícolas de la provincia, de acuerdo con la información referida por los apicultores entrevistados en los apiarios.

Tabla 10. Principales especies de la flora apícola en la provincia de Imbabura*.

Fuentes de néctar y polen		Fuentes de Resinas, néctar y polen	
Nombre común	**Nombre Científico	Nombre común	**Nombre Científico
Frutilla	<i>Fragaria</i>	Algarrobo	<i>Prosopis pallida</i>
Mora	<i>Rubus sp</i>	Eucalipto	<i>Eucalyptus globulus</i>
Alfalfa	<i>Medicago sativa</i>	Faique	<i>Acacia macracantha</i>
Trébol	<i>Trifolium Repens L.</i>	Zapote	<i>Capparis angulata</i>
Girasol	<i>Helianthus annuus</i>	Vichayo	<i>Capparis ovalifolia</i>
Maíz	<i>Zea mays</i>	Pájaro Bobo	<i>Tesalia integrifolia</i>
Caña azúcar	<i>Saccharum officinarum</i>	Chilco	<i>Bacharis Lanciolata</i>
Esparrago	<i>Asparagus officinalis</i>	Chaparro	<i>Quercus coccifera</i>
Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	Pumamaqui	<i>Oreopanax ecuadorensis</i>
Cacao	<i>Theobroma cacao</i>	Zabaleta	<i>Erythrina velutina</i>
Manzana	<i>Malus domestica</i>	Cholan	<i>Tecoma stans</i>

Achotillo	<i>Nephelium lappaceum</i>	Laurel	<i>Laurus nobilis</i>
		Arrayan	<i>Myrcianthes hallii</i>
		Aliso	<i>Alnus acuminata</i>
		Guarango	<i>Caesalpinia spinosa</i>
		Mostaza	<i>Brassica nigra</i>
		Mosquera	<i>Croton elegans</i>
		Guabillo	<i>Guabillo eugenia sp.</i>
		Aguacate	<i>Persea americana</i>
		Capulí	<i>Muntingia calabura</i>
		Guaba	<i>Inga feuilleei</i>
		Limón	<i>Citrus latifolio</i>
		Mandarina	<i>Citrus reticulata</i>
		Café	<i>Coffea arabica</i>
		Tomate Árbol	<i>Solanum betaceum</i>
		Durazno	<i>Prunus pérsica</i>

Fuente: *Entrevista con Apicultores de la provincia, 2017. Las principales especies de cultivos naturales o introducidas en la Provincia de Imbabura, de los cuales las abejas recolectan néctar, polen y resinas. **Nombres científicos tomados de (De la Torre y col., 2008).

3.3. DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE PRINCIPALES ENTEROBACTERIAS EN POLLOS DE LA PROVINCIA DE IMBABURA.

La obtención de las muestras se realizó mediante métodos de muestreo no probabilísticos. Según Hernández (2014), en estudios exploratorios, el muestreo probabilístico resulta excesivamente costoso, recomendando acudir a métodos no probabilísticos. Por lo tanto, y debido a que, en los planteles estudiados, las aves se encuentran en un ecosistema de manejo ambiental, sanitario y nutricional similar, de acuerdo con las políticas de las distintas empresas o avicultores involucrados, se procedió a tomar dos muestras cloacales mediante hisopos Quikswab por cada granja de hasta 50.000 pollos, cuatro para las granjas de entre 50.000 y 100.000 aves y seis hisopos el muestreo en las granjas de más de 100.000 pollos.

El hisopado se realizó en base al catastro oficial de granjas avícolas registrado por (Agrocalidad, 2018a), la capacidad instalada de producción por cantón se muestra en la Figura 15, encontrándose la mayor en los tres cantones en los que se procedió a hacer la recolección con los hisopos.

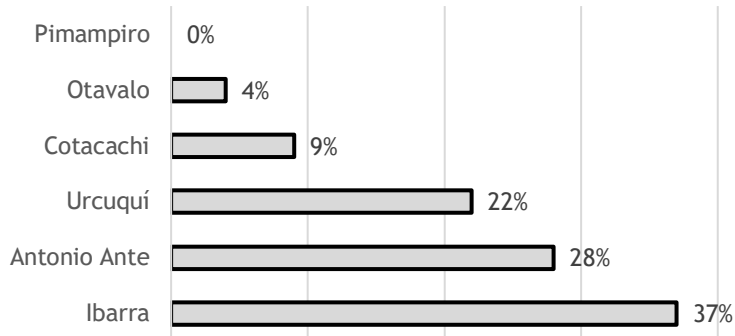


Figura 15. Densidad de producción por Cantones sobre el total de la provincia de Imbabura. Fuente: Agrocalidad (2018). Registro de Planteles avícolas de Imbabura.

En concreto, fueron empleadas para la realización de este estudio un total de 34 granjas o explotaciones avícolas, cuyos detalles de localización, altitud y cantidad de aves producidas, puede observarse en la Tabla 11.

Tabla 11. Localización, georreferenciación, altitud y Cantidad de producción Avícola en estudio.

Cantón	Parroquia	Latitud	Longitud	Altitud m.s.n.m	Nº aves
Antonio Ante	Chaltura	0° 22'42.85"N	78° 10'3.93"O	2016	80000
Antonio Ante	Chaltura	0° 22'8.98"N	78° 11'6.02"O	2116	11000
Antonio Ante	Chaltura	0° 21'14.11"N	78° 13'31.44"O	2370	70000
Antonio Ante	SAN ROQUE	0° 19'2.18"N	78° 14'17.31"O	2365	50000
Antonio Ante	SAN ROQUE	0° 19'28.82"N	78° 13'58.04"O	2372	36000
Antonio Ante	SAN ROQUE	0° 17'9.33"N	78° 14'10.18"O	2543	15000
Ibarra	Lita	0° 50'39.33"N	78° 24'46.82"O	610	120000
Ibarra	Aloburo	0° 23'41.58"N	78° 4'53.70"O	2345	20000
Ibarra	Caranqui	0° 20'49.12"N	78° 10'40.66"O	2374	25000
Ibarra	Caranqui	0° 18'46.23"N	78° 8'7.94"O	2388	38000
Ibarra	La Carolina	0° 37'13.80"N	78° 8'34.69"O	1398	150000

Ibarra	La Carolina	0° 47'37.89"N	78° 8'14.64"O	1900	80000
Ibarra	Lita	0° 49'9.61"N	78° 19'45.04"O	772	300000
Ibarra	Sagrario	0° 25'43.51"N	78° 3'7.28"O	1930	35000
Ibarra	Sagrario	0° 21'28.55"N	78° 8'45.93"O	2145	33000
Ibarra	Salinas	0° 30'41.9"N	78° 07'19.5"W	1568	60000
Ibarra	Salinas	0° 30'40.43"N	78° 7'19.29"O	1569	65000
Ibarra	Salinas	0° 30'51.4"N	78° 07'30.6"W	1574	60000
Ibarra	Salinas	0° 30'1.21"N	78° 7'8.80"O	1584	50000
Ibarra	Salinas	0° 28'18.43"N	78° 7'19.42"O	1669	240000
Ibarra	Salinas	0° 27'51.51"N	78° 7'22.53"O	1679	40000
Ibarra	Salinas	0° 22'27.99"N	78° 15'31.16"O	2373	60000
Ibarra	San Vicente de P	0° 28'45.10"N	78° 0'56.21"O	1614	60000
Urcuquí	Tumbabiro	0° 28'14.6"N	78° 10'17.1"O	1890	50000
Urcuquí	San Francisco	0° 27'9.20"N	78° 13'27.52"O	2342	50000
Urcuquí	Tumbabiro	0° 28'35.53"N	78° 10'51.90"O	1925	80000
Urcuquí	Tumbabiro	0° 28'3.19"N	78° 11'7.00"O	2021	30000
Urcuquí	Tumbabiro	0° 28'3.19"N	78° 11'7.00"O	2021	60000
Urcuquí	Tumbabiro	0° 28'03.5"N	78° 11'19.9"W	2050	40000
Urcuquí	Tumbabiro	0° 28'03.5"N	78° 11'19.9"W	2050	30000
Urcuquí	Tumbabiro	0° 26'12.5"N	78° 11'43.2"W	2200	25000
Urcuquí	Urcuquí	0° 23'26.46"N	78° 11'49.29"O	2420	50000

Fuente: Datos propios tomados al momento de hacer el muestreo.

Con el fin de realizar la toma de muestras, se visitó cada una de las granjas avícolas al momento en que los pollos se encontraron en la última semana productiva (semana 6 para granjas de clima cálido y 7 para granjas ubicadas en clima templado). En cada una de las visitas se realizó una toma de muestras mediante hisopado cloacal en machos y otra en hembras. Estas muestras se colocaron en termo con gel refrigerante y fueron trasladadas al laboratorio de microbiología de la ECAA (Figura 16).



Figura 16. Actividades realizadas para la determinación de prevalencias, 1) toma de muestras. 2) Hisopos con caldo nutritivo. 3) Siembra en cajas con los distintos agares, 4) placas Petri inoculadas previo a cultivo. 5) Crecimiento bacteriano, recuento de UFC, 6) insumos para extracción de ADN por PCR.

Fuente: Elaboración propia.

Además, en granja se tomó información complementaria, la georreferenciación y los datos informativos mediante entrevista al administrador o responsable de cada una de estas explotaciones, incluyéndose: edad, raza, sexo, cantidad de aves, causas de algunos problemas evidentes en toda la fase productiva, porcentaje de mortalidad y nivel de bioseguridad, para reforzar el análisis de los resultados posteriores.

3.3.1. Procesamiento de las muestras fecales de pollo y determinaciones microbiológicas.

Para esta actividad de determinación de las bacterias más prevalentes en la provincia, se trabajó en base al conteo de unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g), empleando placas de Petri en base a los medios de cultivo preparados según las instrucciones técnicas del respectivo fabricante como se observa en la Tabla 12.

Tabla 12. Medios de cultivos empleados para los análisis microbiológicos de las muestras cloacales de pollos.

Medio de cultivo	concentración	Grupos bacterianos analizados
VRB agar	39,5 g / L	Coliformes totales
SS agar	60,0 g / L	<i>Salmonella spp.</i> y <i>Shigella spp.</i>
MacConkey agar	50,0 g / L	<i>Escherichia coli</i>
Yersinia Selective agar	59,5 g / L	<i>Yersinia enterocolitica</i> y <i>Aeromonas spp.</i>
Methylene agar EMB	37,5 g / L	<i>Escherichia coli</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> y <i>Proteus penneri</i>

VRBA: Violet Red Bile Agar; EMB: Eosin Methylene Blue; SS: Salmonella-Shigella.

Para el análisis de las muestras de hisopados cloacales, se procedió según las técnicas regulares de laboratorio, (U.S. Food and Drug Administration, FDA, 2020). Una vez preparados y atemperados los medios de cultivo a 45°C en un baño termostático, dentro de una cámara de flujo laminar, se distribuyó 15 mL de medio de cultivo en placas Petri estériles, las placas una vez preparadas, se dejaron solidificar manteniéndolas a temperatura ambiente durante 24h en ambiente estéril, posteriormente, se procedió a la siembra de las muestras en superficie, en las placas de agar específico para cada grupo o especie de las bacterianas investigadas, tomando 1 mL del líquido de los hisopos, se dispersó directamente sobre la placa de agar solidificada (Figura 17).



Figura 17. Muestreo, preparación, siembra y cultivo de enterobacterias.

Finalmente, las placas fueron incubadas en estufa por 48 horas, según las condiciones óptimas para crecimiento bacteriano (*Yersinia*, a 37°C, y para el recuento de coliformes totales, *E. coli*, *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*, a 42°C), todos los resultados obtenidos se expresaron en UFC/mL. Los hisopos originales se mantuvieron en congelación a -

22°C durante el período de incubación. En aquellos casos en los que se obtuvo un recuento superior a las 300 UFC por placa, se consideró el resultado como muy numerosa para contar (MNC). Para estos casos, se descongeló la muestra mantenida en congelación y se procedió a la siembra de diluciones de 1 mL de muestra en tubos de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril, y se repitió la siembra tomando 1 mL a partir de la 3°, 4° y 5° dilución.

3.3.2. Aislamiento de colonias de enterobacterias intestinales habituales en pollos de engorde.

Para el aislamiento bacteriano, en primer lugar, se procedió a la identificación de las colonias investigadas, mediante la observación de la morfología del cultivo bacteriano obtenido, teniendo en cuenta parámetros como el color, tamaño, bordes y presencia de halos específicos de las colonias descritos para cada uno de los medios de cultivo. Una vez seleccionadas las colonias objetivo, en aquellas explotaciones avícolas que mostraron presencia de *E. coli* y *Salmonella* spp., se seleccionaron tres colonias de cada grupo investigado por cada explotación avícola incluida en el estudio para su aislamiento y la realización de pruebas posteriores. Las colonias seleccionadas fueron sembradas tomando con el asa estéril, e inoculando en tubos de 5 mL preparados con caldo de cultivo de formulación según los criterios de la FDA (2020) esterilizados 121°C en un autoclave, cubiertos por un tapón de algodón a 1,5 atmósferas de presión durante 15 min.

3.4. IDENTIFICACIÓN DE *Salmonella* SPP. Y *Escherichia coli*.

La identificación de las cepas seleccionadas y aisladas se llevó a cabo mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), siguiendo el método de la comparación de Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP).

PCR: Para este fin, a las cepas aisladas de manera individual se les extrajo el Ácido Desoxirribonucleico (ADN), mediante el kit de extracción de ADN Ultra Clean® Microbial DNA Isolation Kit. Una vez extraído el ADN, se procedió a la amplificación del gen ADNr 16S, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se usaron cebadores universales para el dominio de bacterias, 907r (926r) y P3

(341f). El volumen total del PCR fue de 25 μ l, para obtener una concentración ideal de ADN de 10 nmol/ μ l.

Las reacciones de amplificación fueron diseñadas con los siguientes parámetros: incubación inicial a 94 °C durante 3 min, seguidas por 35 ciclos a la misma temperatura de incubación, con duración de 30 segundos y una incubación final de 72 °C durante 1,5 min. Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis sumergida en un gel de agarosa al 0,8%; se usó un sistema tampón tris borato, se mantuvo a voltaje constante de

120 V y se visualizó por inmersión del gel, después de la corrida en solución tampón con bromuro de etidio (10 μ g/mL) (Figura 18).

La separación de las fracciones de ADN amplificadas se realizó en gel de agarosa. Una vez que el gel estuvo cristalino, se colocó 5 μ l de Diamond Nucleic Acid Dye, para que las bandas puedan ser identificadas en el transiluminador UV Lab Net™ Inc. Por último, se procedió a calibrar el ajustador de gel, se esperó hasta su solidificación.

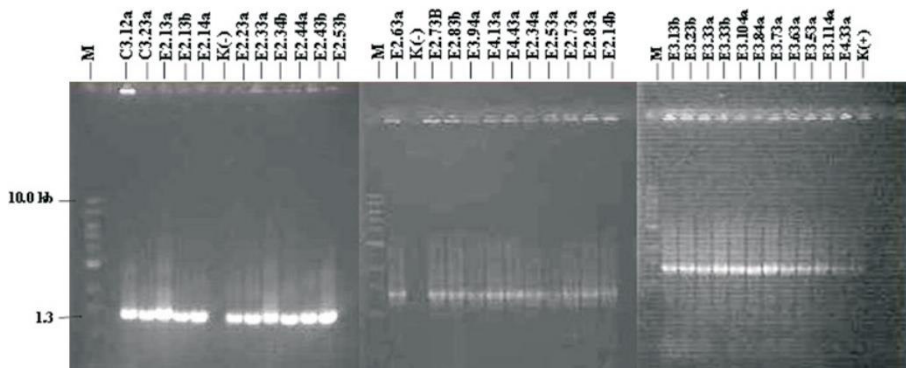


Figura 18. Electroforesis de la amplificación del gen 16S para Escherichia coli.

Para la visualización de la amplificación del gen ADNr 16S en el gel de agarosa, (Figura 18) se inoculó en los canales del gel de agarosa 4 μ L de los productos de la amplificación de la PCR y se sometió el mismo, a una corriente en la cámara de electroforesis de 90V (Voltios) por un período de 45 min, siendo el proceso monitorizado para su comparación posterior con un marcador de 100 pares de bases (Figura 19).

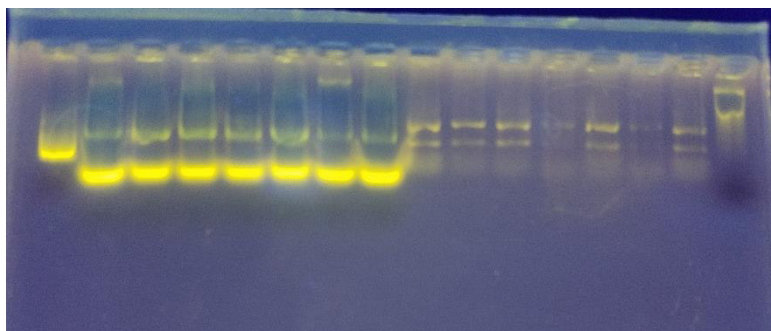


Figura 19. Visualización del gen 16S para *Escherichia coli*.

RFLP: Para ello se utilizó la enzima de restricción Anza™ 11 EcoRI, en tubos de 1 mL se colocó 2 μ L de Anza™ 10X Red Buffer más 1 μ L del producto obtenido en la PCR; se añadió 1 μ L de la enzima de restricción Anza™ y finalmente se le añadieron 16 μ L de agua libre de nucleasas; se agitó la solución creada en un vórtex para mezclar todos los reactivos y se dejaron actuar las enzimas de restricción en baño María a 37°C durante 15 min. se preparó agarosa al 1% en la que se obtuvo los fragmentos originados por la actividad de las enzimas de restricción. Para la visualización de la acción de las enzimas de restricción sobre el gen ADNr 16S en el gel de agarosa, se tomó 4 μ L de los productos del RFLP con 0,4 μ L de Anza™ 10X Buffer y se sometió electroforesis a 90 V, durante un período de 45 min. Los productos de la separación obtenida se observaron en el transiluminador UV Lab Net™ Inc., para comprobar el tamaño de los cortes realizados por las enzimas en el producto de PCR, en relación con el marcador de 100 pares de bases.

3.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PROPÓLEOS OBTENIDOS EN LA PROVINCIA DE IMBABURA.

La actividad antibacteriana de un producto se mide (Figura 20) por dos tipos de métodos: A) El cuantitativo, determinando la mínima cantidad necesaria para inhibir el crecimiento de un organismo control, valor conocido también como concentración mínima inhibitoria (CMI) (Madigan y col., 2009), y B) el cualitativo, procedimiento empleado para determinar la actividad antimicrobiana, a través de la difusión en agar o método de Kirby Bauer, o más conocido como antibiograma

porque se emplea muy comúnmente, en especial para determinar la sensibilidad de las bacterias a agentes antimicrobianos.

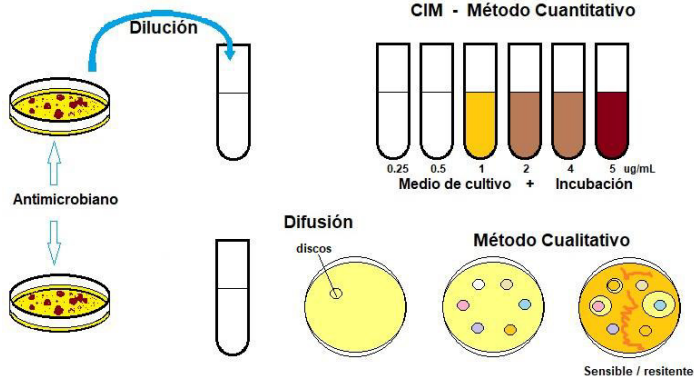


Figura 20. Métodos para determinar la actividad antimicrobiana. Elaboración propia a partir de Madigan y col. (2009).

Para este estudio se utilizó EEP o tintura de propóleo al 20% obtenido de los diferentes cantones de la provincia de Imbabura, los cuales se disolvieron en etanol ajustado al 96%, y se mantuvieron en movimiento diez días en el agitador N-Biotec, se pasaron por filtrado para retirar las impurezas y se reservaron en frascos ámbar debidamente etiquetados. Se empleó esta concentración debido a que en varias investigaciones se encuentran concentraciones empleadas que van desde 5% hasta 50%. Empleando discos de 0,6 cm que fueron codificados e impregnados respectivamente en la tintura de cada cantón en los que se pudo después medir los halos de inhibición causados por el efecto propóleo y se compararon los resultados obtenidos con los producidos por discos de antimicrobianos con diferentes mecanismos de acción, como son enrofloxacina, sulfamidas+trimetoprim, lincomicina, tetraciclina, cloranfenicol y neomicina.

Las cepas bacterianas contra las que se estudió la actividad antimicrobiana del propóleo fueron aisladas previamente en la fase de determinación de los agentes patógenos de las explotaciones avícolas. confirmadas como positivas: *E. coli* y *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. y *Shigella* spp.

3.5.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida.

La determinación de la CMI del propóleo frente a las bacterias enteropatógenos de pollos de la provincia, se realizó siguiendo el método de dilución en tubo empleando la escala McFarland 0,5 (Ortez y Rankin, 2005). Para ello, se emplearon concentraciones crecientes de 1, 2, 4, 6, 8 y 10% de propóleo (al 20% de concentración). El propóleo utilizado, fue procedente de tres apiarios del cantón Cotacachi, de los cuales se realizó una mezcla a partes iguales. En cada tubo se depositaron cantidades decrecientes de caldo de cultivo; a esta solución, se inoculó 100 μ L de una concentración de inóculo de cada una de las bacterias en estudio, en suspensión salina, (equivalente a 1×10^{10}

UFC/mL). Este procedimiento se realizó en tubos de ensayo de 10 mL, seriados del #1 al #8. Los tubos #1, control con 10 ml de alcohol 70% y #2, vial fueron empleados para la comparación. En los tubos del #3 al # 8 el volumen de caldo nutritivo y propóleo fue inversamente proporcional el uno del otro, según el esquema expuesto en la Figura 21.

Para determinar la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB), se empleó el método de comparación por tubos seriados del #1 al #8. Al tener los tubos con todos los componentes, los colocamos en la estufa a 37°C durante 24 h, determinando luego la/las concentraciones donde existió o no crecimiento microbiano, acto seguido se realizó el control mediante comparación de turbidez utilizando la escala de McFarland la cual permite determinar la cantidad de bacterias existentes en las diferentes concentraciones probadas (Ortez y Rankin, 2005).

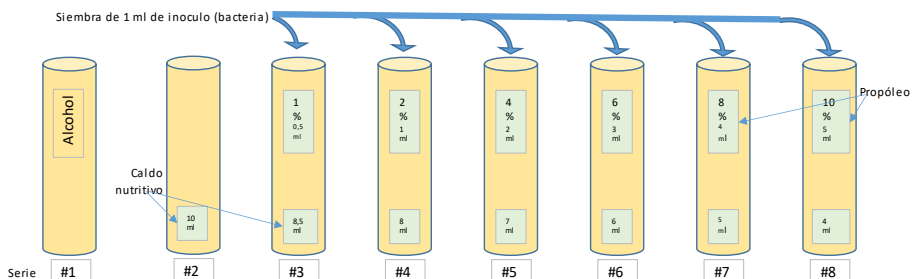


Figura 21. Esquema de realización de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) por difusión en tubo. Elaboración propia

Después de 24 h de incubación, se procedió a registrar la turbidez aparente o existente en cada tubo inoculado, considerando que hay crecimiento en todos los que se aprecie turbidez, aunque no sea tan intensa como en el tubo control. En los tubos en que no se observa turbidez, se considera que no hubo crecimiento. La CMI, de un antibiótico frente a una determinada bacteria, sería la solución más diluida de aquellos tubos en donde no se observó crecimiento.

3.5.2. Difusión en Agar.

Para este estudio, se realizaron tres repeticiones de las siembras en agar nutritivo, de cada una de las bacterias prevalentes, se colocaron los discos impregnados con cada una de las tinturas cantonales; en igual forma se prepararon los medios de cultivo en agar nutritivo para incorporar en ellas los discos respectivos de los productos comerciales, las placas fueron incubadas a 37°C realizando la revisión continua a las 24, 48 y 72 h para determinar el comportamiento inhibitorio de los productos en estudio, se tomaron medidas y se registró los resultados.

Detalladamente para el ensayo se realizaron tres repeticiones de las siembras de cada una de las bacterias en agar nutritivo, se colocaron seis discos impregnados con cada una de las tinturas cantonales, para incubación posterior; las placas fueron colocadas en la estufa a 37°C realizando la revisión constante a las 24, 48 y 72 h para determinar el comportamiento inhibitorio de los propóleos, cuando se identificó la presencia del halo de inhibición de las UFC, se procedió a tomar medidas del mismo con un calibrador y se registraron los resultados (López Tevez y Torres, 2006) (Tabla 13).

Tabla 13. Propóleos y bacterias confrontados.

Origen de la tintura de propóleo	Bacterias en estudio
Ibarra	<i>Escherichia coli</i>
Cotacachi	<i>Salmonella spp</i>
Otavaló	<i>Shigella spp</i>
Urcuquí	<i>Yersinia spp</i>
Pimampiro	
Antonio Ante	

Posteriormente, se realizó la comprobación de la actividad anterior, a fin de confirmar que la inhibición de la bacteria y formación de los halos

de mayor tamaño se debió a la acción de las características antimicrobianas de las tinturas, y no al porcentaje etanólico de las mismas. Para esta actividad, se seleccionaron las tres tinturas de propóleos que presentaron los mayores contenidos de flavonoides y de estos se realizó una única dilución, se lo contrastó en tres repeticiones, con etanol al 96% de concentración. Las placas fueron colocadas en la estufa a 37°C realizando con revisiones constantes a las 24, 48 horas, para determinar el efecto inhibitorio de las soluciones en confrontación, se procedió a tomar medidas con un calibrador universal y se registraron los resultados.

En este ensayo se contrapuso la actividad de las tinturas de propóleo de los diferentes cantones de la provincia de Imbabura vs los antibióticos comerciales elegidos, bajo igualdad de condiciones de cultivo y lecturas. Los productos empleados se detallan en la Tabla 14.

Tabla 14. Orígenes del propóleo empleado en las pruebas de inhibición y antibacterianos empleados usualmente en la región.

Origen de la tintura de propóleo	Antibióticos Comerciales
Ibarra	(E) enrofloxacina
Cotacachi	(SXT) sulfa+trimetroprin
Otavalo	(MY) lincomicina
Urcuquí	(TE) tetraciclina
Pimampiro	(C) cloranfenicol
Antonio Ante	(N) neomicina

3.6. DETERMINACIÓN DE LA ACCIÓN INMUNOESTIMULANTE DEL PROPÓLEO.

Para la investigación de la actividad inmunoestimulante de los propóleos obtenidos sobre los pollos expuestos a la infección por *E. coli*, se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con tres tratamientos más un testigo, y tres repeticiones de cada uno. En total, fueron utilizadas 12 unidades experimentales, conformadas por 10 pollos de raza Cobb 500 cada una de ellas (120 pollos). Las unidades experimentales que se emplearon en este estudio fueron distribuidas dentro de la explotación avícola, con divisiones de malla metálica, cada jaula tuvo dimensiones de 0,95 m de largo por 0,85 m de ancho. Cada

unidad experimental contó con un comedero de tolva y un bebedero manual. Las condiciones ambientales de las diferentes unidades experimentales se adecuaron desde el inicio de los ensayos para que todas estén influenciadas por similares condiciones ambientales y de manejo. Las dosis de propóleo empleadas en el agua de bebida se realizaron según lo descrito en la Tabla 15.

Tabla 15. Dosis de propóleo empleadas para el estudio de la acción inmunoestimulante.

Tratamiento	Dosis propóleo (al 20%) /L agua
T1	2,0 mL (0,4 mg/L de agua)
T2	3,5 mL (0,7 mg/L de agua)
T3	5,0 mL (1 mg/L de agua)
T4	0 mL (Testigo)

Se recibieron las aves en torno a 48 h tras su nacimiento, y se criaron todos juntos hasta la tercera semana. Al día 22 de edad, los pollos fueron separados al azar tomando 5 hembras y 5 machos por cada unidad experimental. La infección experimental con *E. coli* se realizó al día 24 de edad, mediante la introducción por vía bucal de una única dosis de 1 ml. por cada ave, del cultivo previamente preparado y reservado a una concentración de $3,5 \times 10^6$ UFC. El ensayo se realizó desde los 24 a 44 días de edad. Tras la inoculación experimental con *E. coli*, las actividades que fueron registradas fueron las siguientes:

- Registro de temperatura cloacal. (diaria)
- Escore de diarreas: (a) Heces normales, b) Blandas, c) Pastosas, d) Semilíquidas, e) Líquidas.
- Recuentos cloacales de *E. coli* al día 28, para determinar preñimiento y prevalencia.
- Pesos corporales (al inicio del ensayo y luego cada semana).

El alimento empleado (para fase de crecimiento y engorde) se formuló al mínimo costo para cubrir los requerimientos nutricionales de esta línea genética y se elaboró en la planta de balanceados de la ECAA sin la adición de antibióticos o promotores de crecimiento para

todas las unidades, el mismo que se administró pesándolo según tabla común de consumo para todas las jaulas. (Figura 22).



Figura 22. Actividades para ensayo de EEP como inmunoestimulador. Fuente: Elaboración propia.

3.7. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PROPÓLEO COMO PROMOTOR DE CRECIMIENTO E INMUNOESTIMULANTE.

Para valorar adecuadamente la actividad de la tintura de propóleo en la prevención de la salud de los pollos de engorde, se comparó su efecto en los mencionados animales frente el efecto obtenido con el APC bacitracina de zinc como tratamiento control. Para ello se utilizaron 120 pollos de raza Cobb 500, de un día de edad. Estos se repartieron siguiendo un diseño experimental completamente al azar, (DCA) empleando tres tratamientos más el grupo control (No recibió propóleo ni antibiótico) y tres repeticiones de cada uno de los tratamientos designados, en total fueron 12 unidades experimentales, conformadas por 10 pollos cada una. Las unidades experimentales que se emplearon en este estudio fueron distribuidas dentro del galpón, separadas en jaulas divididas por malla metálica, cada jaula tuvo dimensiones de 0,95 m de largo por 0,85 m de ancho. Cada unidad experimental contó con un comedero de tolva y un bebedero manual. Las condiciones ambientales de las diferentes unidades experimentales se adecuaron para evitar sesgos o variaciones individuales de las condiciones

ambientales y de manejo, buscando que todas estén influenciadas por el mismo entorno físico. Los tratamientos empleados se detallan en la Tabla 16.

Tabla 16. Dosis de propóleo empleadas como promotor de crecimiento.

Tratamiento	Producto empleado
T1	Propóleo en agua (20%) 2 mL/L
T2	Propóleo en agua (20%) 3,5 mL/L
T3	Alimento con bacitracina de zinc 350 gr/Tm
T4	Sin medicación

Se recibieron todas las aves al día de nacidos y recibieron todas las actividades de manejo como temperatura, humedad, ventilación, ampliación de espacio, programas profilácticos, etc. todos juntos hasta la tercera semana. Al día 22 de edad, los pollos fueron separados ubicando al azar 5 machos y 5 hembras en cada unidad experimental. El ensayo se realizó desde los 24 hasta 44 días de edad. Las actividades que se siguieron con mayor énfasis durante el estudio del efecto inmunoestimulante fueron las siguientes:

- Consumo de alimento.
- Pesos corporales (al inicio del ensayo y luego cada semana).
- Recuentos cloacales de *E. coli* al día 28, para determinar infectividad tras la inoculación y prevalencia.
- Porcentaje de mortalidad.
- Morfometría de órganos linfoides (al final del ensayo) sacrificando dos animales por cada sección en los cuales se registró: Peso de Bazo, Bursa, Timo y el peso y longitud del intestino (desde la unión con la molleja hasta la unión ileocecal).
- Hisopado cloacal para determinar la exclusión competitiva bacteriana.
- Toma de Muestra intestinal para medición de vellosidades.

El alimento empleado es el requeridos para fases de crecimiento y engorde, se formuló y elaboró según los requerimientos nutricionales de la línea genética COBB 500 y solamente se modificó el concentrado para los pollos bajo tratamiento 3, adicionando bacitracina de zinc. los

demás tratamientos recibieron alimento sin antibióticos promotores de crecimiento. Esta ración, se dirigió bajo Tabla de alimentación, aclarando que todas las repeticiones recibieron diariamente la misma cantidad de alimento (Figura 23).



Figura 23. Actividades para ensayo de EEP como promotor de crecimiento e inmunoestimulador: 1) Izquierda: muestras intestinales para determinar exclusión competitiva; 2) Centro: datos morfométricos de los órganos linfoides; 3) Derecha: medición de longitud intestinal y toma de fragmento para determinar longitud de vellosidades intestinales. Fuente: Elaboración propia.

3.8. ESTUDIO DEL EFECTO DEL PROPÓLEO SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE LOS POLLOS.

En este ensayo, se comparó por un lado la acción de la tintura de propóleo frente a dos probióticos comerciales, de los cuales T1 basa su acción en la presencia de *Lactobacillus acidophilus* y el T2 en la mezcla de *Lactobacillus rhamnosus* y *Enterococcus faecium* más el grupo control que no recibió ningún producto. Y por otro se contrastó con dosificaciones de bacitracina de zinc como promotor de crecimiento y EEP al 20%. El protocolo de dosis empleadas en los diferentes grupos en investigación puede observarse en la Tabla 17.

Para el efecto, se trabajó con 216 pollos línea Ross 308, de primer día de edad, mantenidos en jaulas a nivel de piso hasta los 21 días de edad. Para la investigación se utilizó un diseño de bloques completamente al azar, (DBCA) con arreglo factorial $A \times B \times 3$. Las unidades experimentales que se emplearon en este estudio fueron

distribuidas con divisiones de malla metálica dentro del galpón, para cada unidad se destinó un área de 0,80 m² dotada de un comedero de tolva y un bebedero de volteo. en total fueron 27 unidades experimentales, conformadas por 8 Ross 308 pollos cada una. (216 pollos en total).

Tabla 17. Tratamientos y Dosis de propóleo empleadas. en ensayo como prebiótico y simbiótico.

Tratamiento	Dosis propóleo/ probióticos
T1	Agua + <i>Lactobacillus acidophilus</i> en concentración de 1×10^7 UFC en dosis de 3 mL/L de agua
T2	Agua + <i>Lactobacillus rhamnosus</i> y <i>Enterococcus faecium</i>) en concentración de 1×10^9 UFC cada una en dosis de 1 g/L
T3	Agua sin medicar
D1	Agua + tintura de propóleo 3 mL / L de agua + Alimento sin promotor
D2	Agua + Alimento con promotor (bacitracina de zinc 350 g/Tm)
D3	Agua sin medicar + Alimento sin promotor

Se recibieron todas las aves en un período máximo de 24 horas tras su nacimiento y se repartieron al azar 4 machos y 4 hembras en cada unidad experimental. El ensayo se realizó desde el 1^{er} de recibimiento hasta el 21^{avo} día de edad. Las aves recibieron un

El alimento empleado fue formulado y elaborado en la ECAA, con el requerimiento de alimento inicial para pollos de la línea genética Ross 308, adicionando la bacitracina de zinc al alimento que se suministró a las unidades que recibieron el tratamiento D2, las demás recibieron alimento sin crecimiento, La dieta se administró a voluntad, y el consumo diario se determinó, por la diferencia entre el alimento administrado, menos el sobrante al día siguiente.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE PROPÓLEOS PROCEDENTES DE LOS DIFERENTES CANTONES DE LA PROVINCIA DE IMBABURA.

La composición fitoquímica de los productos procedentes de las colmenas es variable en función de muchos y diferentes factores, como es la época del año, los cambios en la climatología o la floración de diferentes especies vegetales, o del número y estado de abejas que formen parte de dicha colmena (Bankova y col., 2014). Al igual que los demás productos, la composición de los propóleos es bastante compleja y variada, ya que depende de la flora local en el sitio de la colección y de las condiciones geográficas y climáticas donde se elabora el producto (Vargas, y col., 2013). Esta característica composición además depende de la preferencia de la abeja por un determinado tipo de flores, según su color, aroma, forma y floración (Bankova 2005). Como norma general, el propóleo está compuesto por sustancias pegajosas y balsámicas (50%), ceras (30%), aceites esenciales y aromáticos (10%), polen (5%) y otros (5%) (L. Souza et al. 2019). Las abejas recolectan el polen y las resinas en un perímetro de 1 a 5,5 Km alrededor de la colmena, por lo que la densidad y el tipo de vegetación en los alrededores de la colmena es de especial importancia (Beekman y Ratnieks, 2000).

Durante varias décadas, la composición química y las propiedades del propóleo se han estudiado muy exhaustivamente, y se han publicado datos en numerosos documentos científicos en todo el mundo. Entre 1945 y 2018, se publicaron más de 4.400 publicaciones sobre el propóleo en la Web of Science (Thompson Reuters, Philadelphia, USA). La composición química del propóleos es inconstante y cambia según la región geográfica, el clima, las condiciones ambientales y la temporada de cosecha (López y col., 2014; Pobiega y col., 2019a).

Hasta ahora se han encontrado más de 420 compuestos químicos identificados en muestras de propóleos procedentes de diversas regiones geográficas del mundo (Milojković-Opsenica y col., 2016). Actualmente se presta considerable atención no sólo a la composición del propóleo, sino también al contenido y la actividad de los compuestos bioactivos del propóleo, principalmente compuestos fenólicos y flavonoides (Andrade y col., 2017).

La composición de los propóleos obtenidos en los diferentes cantones de la provincia de Imbabura puede consultarse en la Tabla 18.



Tabla 18. Resultados del análisis químico de propóleos de la provincia de Imbabura recolectados por el método de raspado.

Cantón	% Humedad	% Cenizas	% Impurezas	% Ceras	% Solubilidad en Etanol	Índice de Oxidación	% Fenoles	% Flavonoides
Antonio Ante	17,7±3,88 ^a	3,64±1,6 ^b	21,32±4,69 ^b	19,3 ±3,19 ^a	34,33±1,91 ^{a,b}	13,50±3,56 ^{a,b}	6,02±0,05 ^a	0,83± 0,45 ^b
Cotacachi	7,67±3,49 ^b	4,60±1,78 ^{a,b}	20,90±4,95 ^b	20,10±4,76 ^a	34,20±4,00 ^{a,b}	15,33±5,16 ^{a,b}	4,80±1,26 ^b	1,80±0,41 ^a
Ibarra	6,10±1,28 ^{b,c}	3,20±1,42 ^b	29,00±3,39 ^{a,b}	23,50±8,76 ^a	38,10±7,22 ^a	22,30±7,62 ^a	5,11±1,09 ^b	1,50±0,26 ^a
Otavalo	10,90±4,25 ^b	5,60±0,98 ^a	29,20±4,94 ^{a,b}	21,70± 4,72 ^a	35,83±2,48 ^{a,b}	9,00±6,84 ^b	2,76±0,01 ^c	0,76±0,01
Pimampiro	15,10±3,26 ^a	5,00±1,53 ^a	13,50±8,35 ^c	22,70±4,90 ^a	37,08±6,21 ^a	22,83±3,87 ^a	4,66±1,03 ^b	1,34±0,49 ^{a,b}
Urcuquí	7,20±0,61 ^b	4,41±1,24 ^b	37,30±11,13 ^a	13,84±2,45 ^b	29,17±3,06 ^b	26,00±6,06 ^a	6,33±1,51 ^a	1,23±0,79 ^{a,b}
Promedio	11,21	3,83	22,75	22,72	35,79	18,16	4,45	1,12
* N. INEN	10% max	5 % max	25 % max	35 % max	35 % min	22 seg	5 % min	1 % min
**N. MAB	10 % max	5 % max	40 % max	25 % max	35 % min	22 seg	5% min	0,5 % min

* Norma INEN 2794: Reglamento técnico para la fijación de identidad y calidad de propóleos del Servicio Ecuatoriano de Normalización.

**Reglamento técnico para la fijación de identidad y calidad de propóleos del Ministerio de Agricultura de Brasil (MAB).

^{a,b}: Los valores diferentes en la misma columna muestran valores estadísticamente diferentes.

En general, el propóleo tiene numerosos efectos favorables sobre la salud humana (Azemin y col., 2017). Las propiedades beneficiosas para la salud del propóleo se derivan de su composición química, que determina su versatilidad farmacológica, incluidas las propiedades antimicrobianas y antivirales, propiedades antioxidantes (Azemin y col., 2017), hepatoprotectoras (Paulino y col., 2014), anticancerígenas propiedades antiinflamatorias y citostáticas (Kismet y col., 2017), así como propiedades inmunoestimulantes y antialérgicas (Yasar y col., 2016). La riqueza de sus componentes bioactivos determina su aplicación en la medicina y la odontología, así como en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria (Pobiega y col., 2019a). La calidad del propóleo depende de numerosos parámetros dentro de su composición (Azemin y col., 2017).

Como se puede comprobar en la Tabla 18, los resultados obtenidos muestran diferencias significativas en los propóleos procedentes de los diferentes cantones de la provincia de Imbabura. Los resultados finales en cuanto a promedio de humedad relativa, mostraron un promedio general de 11,21% frente al 10% recomendado por la norma vigente, posiblemente, porque para su facilidad de raspado y procesamiento fueron congelados para luego ser rallados manualmente.

El propóleo es uno de medios directos utilizados por las abejas para garantizar la asepsia de la colmena, que, junto con sus condiciones de temperatura y humedad, puede mantenerse como el ambiente idóneo o caso contrario convertirse en un ambiente prolífero para el desarrollo de virus y bacterias (Arrate, 2008). La actividad el agua y la humedad son los parámetros que permiten determinar la conservación, propagación microbiana y aparición de reacciones químicas de los productos (Devequi-Nunes y col., 2018). Por ello, como se puede deducir, mayores contenidos en humedad relativa son inversamente perjudiciales para la calidad del propóleo. Los niveles más altos de la misma se encontraron en los cantones de Antonio Ante (17,7%) y Pimampiro (15,1%), seguidos de Otavalo (10,9%). Los menores valores fueron encontrados especialmente en Ibarra (6,1%), seguidos de Urcuquí (7,2%) y Cotacachi (7,67%). Otros trabajos anteriores mostraron resultados en la humedad relativa del propóleo muy variables, como el realizado por Lacalle (2008) en muestras

procedentes del País Vasco (España), en el que más de la mitad de los propóleos incluidos en el estudio mostraron niveles de humedad relativa superiores al 10%. Otros trabajos (Silva y col., 2006) demostraron que la pluviometría no ejerce una importante influencia de lluvia sobre los valores de humedad, sino que otros factores como la diversidad de plantas pecoreadas por las abejas para recolectar resina influye mucho más. También el tipo de recolección influye en el grado de humedad. Así como demostró Viloría y col. (2012), la recolección mediante el método de raspado (realizado en este trabajo), aporta mayor cantidad de humedad al propóleo con respecto al propóleo recolectado mediante malla, pudiendo ejercer una variación de incluso un 2% de humedad adicional mediante el método de raspado.

Con respecto al contenido en cenizas, el resultado promedio determinado para la provincia (3,83%) indicó que el propóleo en este sentido se mantiene en concordancia con la normativa de referencia (5%). Los mayores niveles se encontraron en Otavalo (5,6%), Pimampiro (5%) y Cotacachi (4,6%). En dichos casos los resultados fueron estadísticamente mayores que los encontrados en Antonio Ante (3,64%), Ibarra (3,2%), Urcuquí (4,41%) y Cotacachi (4,6%). La determinación del porcentaje de cenizas para las muestras de propóleo, reviste su importancia, debido a que un mayor contenido en cenizas está asociado con las propiedades terapéuticas del producto (Chaillou y col., 2004), ya que puede indicar la existencia de un alto contenido de impurezas mecánicas como madera, tierra, fragmentos vegetales, insectos, entre otros, o una posible adulteración del material bruto mediante la adición de impurezas (Funari y Ferro, 2006)

Resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo fueron reportados por Viloría y col., (2012) en su trabajo realizado en la región del Cauca Colombiano, en donde obtuvo un valor promedio de cenizas del 3%. Además, en aquel trabajo, los autores observaron que no hubo diferencias en el contenido de cenizas entre los propóleos colectados en diferentes periodos del año. Los resultados obtenidos en el presente trabajo también resultaron compatibles por los publicados por Silva y col., (2006), quienes indicaron porcentajes por debajo de 1,7% para muestras de Paraíba (Brasil) evaluadas en diferentes periodos de colección. Otros autores, como Sousa y col., (2007), encontraron en

muestras de propóleo en Brasil niveles de cenizas muy superiores a los encontrados en el presente trabajo, cercanos al 10,9%.

Con respecto al porcentaje total de impurezas, el valor medio obtenido en el presente estudio para los propóleos de la provincia fue el 22,75%, dentro del parámetro permitido por la norma nacional ecuatoriana (25%). Los niveles de impurezas pueden ser influenciados por factores como el tipo de colecta, el método de recolección del propóleo y la presencia en las colmenas de materiales no deseables como insectos invasores, residuos de madera, pintura u oxido de las colmenas. Este tipo de impurezas se desprenden en mayor proporción cuando se emplea el método de raspado para la recolección (Viloria y col., 2012).

El menor porcentaje de impurezas fue encontrado en Pimampiro (13,5%), mientras que el mayor fue el encontrado en el cantón de Urucuquí (37,3%). El resto de los cantones se situaron en valores de impurezas intermedios, no mostrando diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Figura 24).

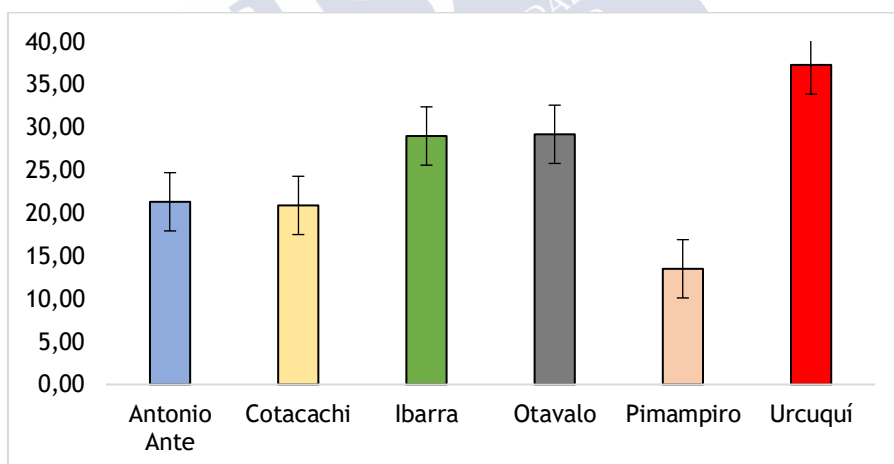


Figura 24. Distribución del Porcentaje de impurezas en los propóleos recolectados en los diferentes cantones de la provincia de Imbabura.

Valores similares a los obtenidos en la presente investigación fueron publicados por Chaillou y col., (2004) en la provincia de Santiago del

Estero, Argentina, donde el % de impurezas promedio se encontró en el 24,1%.

El resultado obtenido respecto a la concentración en porcentaje de ceras marcó el valor promedio para la provincia de 22,72%, menor que el valor máximo establecido por la norma nacional ecuatoriana, que es un 35%. En el caso del contenido en ceras, todos los propóleos analizados en el presente trabajo mostraron resultados acordes con ambas normativas (35% máximo y 25% máximo, respectivamente). Un alto contenido de ceras en el propóleo es desfavorable porque en esta fracción no se encuentran presentes los compuestos fenólicos, que son los metabolitos secundarios a los cuales se asocia la actividad biológica (Funari y Ferro, 2006; Martínez y col., 2012). Los contenidos elevados en cera en el propóleo se atribuyen a que las abejas durante la propolización mezclan resinas colectadas con ceras para tapar los orificios de los marcos en la colmena (Pobiega y col., 2019b).

En cuanto a los resultados obtenidos en el presente trabajo, únicamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el % de ceras en el caso del cantón de Urcuquí (13,84%), mostrando el resto de los cantones valores estadísticamente semejantes en torno al 20%. Según Viloria y col., (2012), el porcentaje de ceras en el propóleo extraído mediante raspado es mayor que el propóleo obtenido mediante el método de malla. Aun así, los propóleos analizados mostraron porcentaje de ceras inferiores a los obtenidos por otros autores en Colombia como Martínez y col., (2012) o Palomino y col., (2009), aunque fueron mayores que los publicados por Agra da Silva y col., (2006), en Paraíba, Brasil, que encontraron valores entre el 12,2-15,6% en las muestras colectadas en invierno, y 8,5-23,0% para las cosechadas en época de verano.

Estos resultados sugieren que las abejas aumentaron la producción de ceras en época de verano debido a la escasez de fuentes resinosas, propio de este periodo (Agra da Silva y col., 2006).

El cantón de Urcuquí fue también el que mostró un propóleo de menor solubilidad en etanol, en concreto 29,17%, mientras que el valor promedio de la provincia fue del 35,79%. En lo que respecta a la solubilidad en etanol (35% mínimo en ambas normas), sólo en el caso del propóleo procedente del cantón de Urcuquí (29,17%), los resultados

no fueron acordes con ambas normativas. Este hecho sugiere una relación entre el contenido en ceras del propóleo y su solubilidad en etanol. La fracción de material no extractable (o insoluble) en etanol es una de las características físicas visibles y no deseadas en el propóleo; un contenido elevado disminuye la calidad del propóleo crudo (Viloria y col., 2012). Estos mismos autores, detectaron un efecto significativo del método de cosecha sobre la variable material insoluble, siendo la media de componentes insolubles en el propóleo obtenido mediante el método de malla (81,68%) superior al obtenido mediante el método de raspado en un 16,84%. Por el contrario, los mayores valores de solubilidad en etanol fueron obtenidos en los cantones de Ibarra (38,1%) y Pimampiro (37,08%). El resto de los cantones mostraron valores intermedios.

El índice de oxidación promedio del propóleo en la provincia de Imbabura fue de 18,16 s, superando los valores máximos de referencia establecidos en las normativas de referencia en los cantones de Urucuquí (26%), Pimampiro (22,83%) e Ibarra (22,3%). Mientras que el menor índice de oxidación fue el hallado en el propóleo recolectado en el cantón de Otavalo (9%). Generalmente, el índice de oxidación varía en sentido inverso al contenido en compuestos fenólicos y flavonoides del propóleo, ya que estos tienen acción antioxidante, si bien existen otros componentes del mismo que pueden ejercer una acción antioxidante (Martínez col., 2009). El índice de oxidación es uno de los parámetros más variables en el propóleo, ya que autores han obtenido resultados en la misma región que variaron entre 5,44 a 37,93 s (Martínez y col., 2009), entre 2 y 51 s (Bastos y col., 2011), e incluso entre 1,6 a 117 s (Grosso y Principal, 2007).

En lo que referente al contenido en componentes potencialmente bioactivos (fenoles y flavonoides), el contenido en fenoles fue significativamente mayor en los cantones de Urucuquí (6,33%) y Antonio Ante (6,02%), siendo especialmente bajo en el caso del propóleo recolectado en el cantón de Otavalo (2,76%). Este mismo cantón fue el que aportó un propóleo con un menor contenido en flavonoides (0,76%), mientras que los cantones de Cotacachi (1,8%), Ibarra (1,5), Pimampiro (1,34%) y Urucuquí (1,23%) fueron los que mostraron los propóleos con mayores contenidos en flavonoides. Como

ya se ha mencionado, las variaciones en el contenido en fenoles y flavonoides pueden tener muchos orígenes, como el diferente origen botánico del propóleo, el año de cosecha, el origen geográfico, así como las condiciones ambientales y la variación estacional (Bankova 2005; Gargouri y col., 2019). En un estudio realizado en el estado de Paraná, en Brasil, por Eyng y col., (2015), la concentración de polifenoles y flavonoides totales encontrados en el propóleo fue de 357,71 mg/L y 112,72 mg/L, respectivamente, mucho más alto que el presente estudio.

Respecto a la comparación con las dos normas de calidad del propóleo (Norma INEN 2794 de Ecuador y norma del Ministerio de Agricultura de Brasil, MAB), algunos de los propóleos recolectados mostraron valores que se sitúan fuera de los rangos establecidos en dichas normativas. Así, en el caso de la humedad (10% máximo en ambas normas), los propóleos procedentes de Antonio Ante, Pimampiro y Otavalo superaron este nivel de referencia. En el caso del contenido en cenizas (5% máximo en ambas normas), el propóleo procedente de Otavalo superó claramente el valor umbral (5,6%). En el caso del % de impurezas (25% máximo en la norma INEN 2794 y 40% en la norma MAB), todos los propóleos resultaron conformes con respecto a la norma brasileña, mientras que los propóleos procedentes de Urucuquí (37,3%) y Otavalo (29,2%), superaron la norma Ecuatoriana INEN 2794.

En lo que respecta al índice de oxidación, los propóleos procedentes de Pimampiro (22,83%) y especialmente el procedente de Urucuquí (26%) superaron el valor umbral en ambas normativas (22 s).

En lo que se refiere al contenido en fenoles, los propóleos procedentes de Otavalo (2,76), Pimampiro (4,66%) y Cotacachi (4,8%), no alcanzaron el valor umbral establecido en ambas normativas (5% mínimo), y finalmente en el caso del contenido en flavonoides, si bien todos los propóleos investigados cumplieron con lo establecido en la norma MAB, (0,5% mínimo), dos de ellos no cumplieron con la norma INEN 2794 (1% mínimo). En concreto fueron los recolectados en Otavalo (0,76%) y Antonio Ante (0,83%).

Por lo tanto, si evaluamos en conjunto todos los resultados obtenidos, podemos deducir que únicamente el propóleo procedente del

cantón de Ibarra cumple con ambas normas de calidad en todos los parámetros investigados.

4.2. DETERMINACIÓN DE LA PREVALENCIA DE LAS PRINCIPALES ENTEROBACTERIAS PATÓGENAS EN LAS EXPLOTACIONES DE POLLOS DE ENGORDE DE LA PROVINCIA DE IMBABURA.

Como breve contexto se puede indicar que en el cantón de Ibarra se produce el 68% de pollos y en los otros dos cantones el 32% restante de la población avícola en estudio. En los cantones de Ibarra y Urcuquí se encuentran las empresas avícolas más grandes y organizadas con mejor bioseguridad, posiblemente por esta razón la prevalencia de *Salmonella* es más baja que en Antonio Ante. El 65% de la producción se realiza bajo los 2000 msnm y el restante 35% en clima frío sobre 2000 msnm.

En la Tabla 19 podemos observar la prevalencia y la contaminación promedio de las principales enterobacterias patógenas en las granjas avícolas situadas en los diferentes cantones de la provincia de Imbabura.

Las especies y géneros investigados fueron elegidos por su condición de enterobacterias y por su elevada importancia como históricos causantes de brotes alimentarios provocados por el consumo de carne de pollo. En este sentido, *E. coli* es el marcador de contaminación fecal alimentaria más utilizado en el mundo (Armas-Freire y col., 2015; Belluco y col., 2016). Además, esta bacteria presenta la particularidad de acumular un buen número de genes de resistencia a antibióticos, que luego puede transferir a los seres humanos, hecho que se da principalmente en las pequeñas explotaciones avícolas (Belluco y col., 2016; Crecencio y col., 2020).

Salmonella spp. por su parte, es el género bacteriano que causa a nivel mundial una mayor cantidad de hospitalizaciones por infecciones alimentarias (Lamas y col., 2018a). La carne de ave y los huevos representan una de las principales fuentes de infección por *Salmonella* en la cadena de suministro de alimentos (Foley y col., 2011; Cosby y col., 2015). En su investigación, Alcocer y col. (2006) observó que el 89,8% de las cepas de *Salmonella* aisladas de pollos fueron *S.*

enteriditis, relacionada con el consumo de productos avícolas contaminados.

Las aves se consideran los mayores reservorios de *Salmonella* (Alcocer y col., 2006). En el estudio de Vinueza-Burgos y col., (2016) realizado en granjas de engorde de pollos, determinaron el 31.2% de positividad para *Salmonella*. Este género bacteriano ha sido además muy frecuentemente aislado a partir de explotaciones avícolas de la zona central de Ecuador, por lo que es especialmente importante en este país (Sánchez-Salazar y col., 2019).

Yersinia, y especialmente su especie *Y. enterocolítica*, es un género de especial importancia para la seguridad de los consumidores porque es capaz de un crecimiento significativo en alimentos bajo temperaturas de refrigeración, como es el caso del pollo, en los que no existe evidencia macroscópica de deterioro (Cápita y col., 2002). Este patógeno se distribuye ampliamente por todo el entorno aislándose de leche cruda, aguas contaminadas o residuales, suelo, mariscos y muchos animales como pollos y cerdos. (Momtaz y col., 2013), Estos autores en su trabajo concluyen que la presencia *Y. enterocolitica* en carne de pollos, los convierte en portadores que pueden excretar el microorganismo al medio ambiente, además de, evidentemente, contaminar las canales durante el proceso de sacrificio y faenamiento de los pollos.

El género *Shigella* spp. está muy relacionado con *Salmonella*, de hecho, existen normativas sanitarias alimentarias en las que requiere la ausencia de los dos microorganismos de manera conjunta para que se permita la comercialización de un alimento. Es mucho menos frecuente que este género bacteriano cause brotes en personas producidas por el consumo de carne pollo o de huevos (Omara y col., 2017), sin embargo, se ha demostrado que este género tiene la capacidad de infectar pollos, y en consecuencia podría infectar a los humanos causando shigelosis derivada del consumo de carne de pollo (Shi y col., 2014). En Quito, en muestras tomadas de casos clínicos de shigelosis hospitalarios, se han identificado como especies causantes de los casos clínicos: *Shigella flexneri* (64,6%), *Shigella sonnei* (29,1%), y *Shigella boydii* (6,3%) (Villacrés col., 2017).

En general, en la mayor parte de los casos investigados se encontró presencia bastante habitual en las muestras recogidas en las explotaciones respecto a *E. coli* (83,3% en Ibarra y los casos en Antonio Ante y 78,8 % en Urcuquí), y *Salmonella* spp. (85,7% de los casos en Antonio Ante e Ibarra, y 77,8% en Urcuquí), mientras que la presencia de *Shigella* spp. y de *Yersinia* spp, fue poco habitual y anecdótica (cada una, sólo se encontró en una explotación de Antonio Ante y en una de Urcuquí, es decir 16,7% y 11,1% respectivamente).

Además, se evidencia, que, a menor altitud o mejores condiciones ambientales como temperatura, humedad relativa, hay mayor prevalencia de *E. coli* y *Salmonella*. Esto podría aseverarse con el promedio de prevalencia tanto de *E. coli* como de *Salmonella* resultó ser significativamente más elevado en las explotaciones situadas por debajo de los 2000 msnm (2,06 log₁₀ UFC/g y 2,04 log₁₀ UFC/g, respectivamente) contra 1,73 log₁₀ UFC/g y 1,94 log₁₀ UFC/g para las mismas bacterias en las explotaciones situadas sobre los 2000 msnm. Al contrario, se comportaron *Shigella* spp., que mostró recuentos medios superiores en aquellas explotaciones avícolas situadas a altitudes superiores a 2000 msnm (1,5 log₁₀ UFC/g), que en las situadas a menor altitud (0,92 log₁₀ UFC/g), y para *Yersinia* spp., género para el cual no se encontró presencia en las explotaciones situadas a menor altitud, sino únicamente en dos granjas ubicadas sobre los 2400 msnm (Tabla 19).

Tabla 19. Resultados del análisis microbiológico (log₁₀ UFC/g) en las explotaciones avícolas en la provincia de Imbabura, según los cantones testados.

Cantón	Ibarra (n=17)	Antonio Ante (n=6)	Urcuquí (n=9)
Altitud (msnm)	1.734,82 ± 517,20	2.297,00 ± 193,81	2.102,11 ± 181,36
Cantidad de Aves	84.470,59 ± 77905,48	43.666,67 ± 28288,98	46.111,11 ± 17280,37
<i>E. coli</i>	1,96 ± 0,51	1,84 ± 0,17	1,24 ± 0,83
<i>Salmonela</i> spp.	1,98 ± 0,28	1,66 ± 0,96	1,54 ± 0,93
<i>Shigella</i> spp.	ND	0,23 ± 0,56	0,75 ± 0,83
<i>Yersinia</i> spp.	ND	0,33 ± 0,81	0,18 ± 0,55

ND: No detectada en ninguna muestra.

En los casos estudiados, la altitud promedio a la que se encontraron las explotaciones no mostró diferencias estadísticamente significativas, mientras que, en caso del número de animales por cantón, mostró que en general el número de aves por explotación avícola en el cantón de Ibarra fue significativamente superior a los de Antonio Ante y Urcuquí. Posiblemente este valor, explique el hecho de que, al ser explotaciones de mayor tamaño, y por consiguiente en las que es a priori normal esperar mayores controles higiénicos y políticas de bioseguridad más efectivas en la prevención de infecciones, no se detectase la presencia de *Shigella* spp. y *Yersinia* spp.

No obstante, en el caso de las dos enterobacterias en las que se encontró, presencia más habitual, *E. coli*, los recuentos promedio fueron más bajos en las explotaciones localizadas en el cantón de Urcuquí, a las situadas en el cantón de Antonio Ante, el comportamiento, fue contrario en *Salmonella* spp., a pesar de ser explotaciones de un tamaño similar. Las explotaciones situadas en el cantón de Ibarra, mostraron recuentos intermedios que no arrojaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los otros dos. (Figura 25).

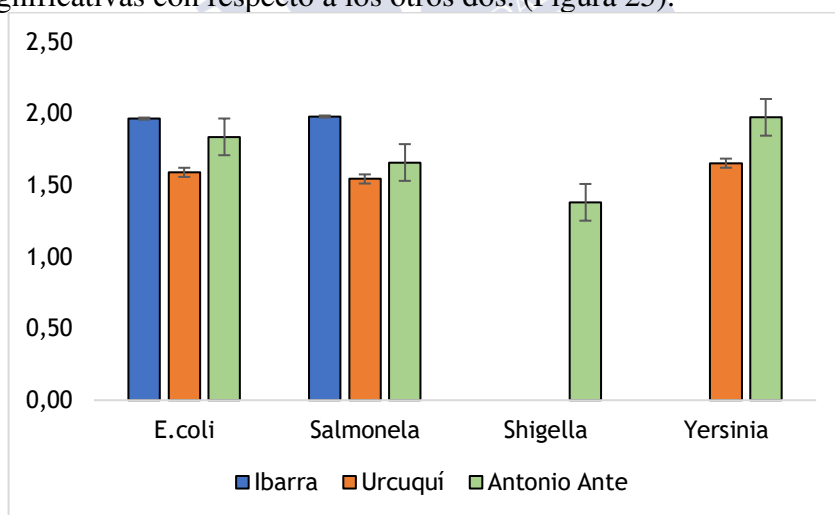


Figura 25. Prevalencia de bacterias enteropatógenos en las explotaciones avícolas en los diferentes cantones de la provincia de Imbabura (\log_{10} UFC/g).

En general, la presencia de *E. coli* fue muy habitual, habiéndose aislado prácticamente en la totalidad de las explotaciones muestreadas. Estos resultados son coincidentes con otros trabajos previos realizados en Ecuador (Armas-Freire y col., 2015; Belluco y col., 2016; Crecencio y col., 2020). Evidentemente, la situación microbiológica de las explotaciones avícolas está muy relacionada con factores como son la situación geográfica, el tamaño de la explotación, la climatología, las prácticas higiénicas y de manejo de la empresa o el tipo de aves que se estén criando (Yegani y Korver, 2008). Por ese motivo, la comparación con resultados de la misma zona geográfica es más relevante que, la comparación con resultados procedentes de otros países con sistemas de cría, situación sanitaria y climática diferente.

En lo que respecta a la presencia de *Salmonella* spp., al igual que en *E. coli*, fueron encontradas en la mayor parte de las explotaciones muestreadas, en concreto en 90,6% de los casos. Existen trabajos previos acerca de la presencia de *Salmonella* en explotaciones avícolas de Ecuador (Alcocer y col., 2006; Quiroz, 2016; Vinueza-Burgos y col., 2016; Casart y col., 2018; Sánchez-Salazar y col., 2019).

Hay que tener en cuenta que en Ecuador una gran parte de la cadena de producción de pollos de engorde (en torno al 90%) es propiedad de empresas integradas que no sólo tienen granjas de pollos de engorde sino también plantas de piensos, criaderos, mataderos y, en algunos casos, supermercados (Vinueza-Burgos y col., 2019). Este hecho hace que las explotaciones avícolas pertenezcan a propietarios o sociedades comunes, o produzcan en base a grandes integraciones avícolas, por ello es normal que gran parte de las mismas presenten prevalencias microbianas semejantes. Además, en los sistemas ecuatorianos de producción avícola, los antimicrobianos aún se utilizan generalizadamente, como promotores del crecimiento, profilácticos y terapéuticos. Este tipo de prácticas puede ejercer una presión selectiva para la *Salmonella* resistente a los antimicrobianos de interés en la salud pública (Aarestrup y col., 1998). Como refiere (Souza y col., 2010) en su estudio, no encontraron cepas que hubiesen alcanzado el nivel de ser consideradas resistentes a fluoroquinolonas, pero se observó un aumento ocho veces mayor en la concentración inhibidora de ciprofloxacina.

Trabajos anteriores encontraron prevalencias de *salmonella* en explotaciones avícolas de Ecuador muy variables, aunque mucho más bajas que las obtenidas en el presente trabajo, como es el caso del 5% obtenido por Vinueza-Burgos y col., (2016), o el 12% obtenido por Casart y col., (2018). Resultados más parecidos a los obtenidos en el presente trabajo fueron publicados en países cercanos a Ecuador, como es el caso del 65% obtenido en Colombia (Donado-Godoy y col., 2012) o el 24,4% publicado en Uruguay (Betancor y col., 2010).

En lo que respecta a los otros dos géneros investigados, su prevalencia fue considerablemente menor (18,8% en total en el caso de *Shigella* y 6,3% en el caso de *Yersinia*). Tras buscar en la literatura científica, no existen precedentes de investigaciones acerca de la prevalencia de ambos géneros en explotaciones avícolas en Ecuador. En lo que respecta a *Shigella*, en el estudio realizado en Quito por Villacrés y col., (2017), se registraron tres especies: *S. flexneri* (64.6 %), *S. sonnei* (29.1 %), y *S. boydii* (6.3 %), en 79 muestras clínicas obtenidas de personas. Este género bacteriano es un patógenos que no ha sido relacionados con el pollo hasta hace poco, ya que el primer reporte de shigellosis en pollos data del año 2004 (Xu y col., 2004), caracterizado por una disentería sanguinolenta y purulenta. Un trabajo realizado posteriormente por el mismo equipo investigador realizó un estudio epidemiológico en las bandadas de aves de corral en China, en el que encontraron una seroprevalencia de *Shigella* de entre un 28,3%-33,7%, lo que sugiere que la *Shigella* es un importante agente causante de disentería en pollos en China (Shi y col., 2014). También se han encontrado casos de shigelosis aviar en un estudio realizado en Ghana, en donde se encontró un 6,9% de prevalencia en aves importadas (Sackey y col., 2001).

En cuanto se conoce respecto a *Yersinia*, especialmente *Y. enterocolitica*, es una importante causa de gastroenteritis en los humanos. La incidencia de *Yersinia* spp. ha sido bien determinado en muchos países en una amplia variedad de productos alimenticios, incluida la carne de ave (Cápita y col., 2002). Sin embargo, hay muy poca información publicada acerca de la prevalencia de este patógeno en explotaciones avícolas y más bien se enfocan a la presencia en la canal de pollo. No obstante, algunos trabajos anteriores han demostrado

su presencia en un 65% de canales de pollo en España (Capita y col., 2002). Más recientemente, Peng y col. (2018) encontraron una prevalencia de 4,8% de *Y. Enterocolitica* en carne de pollo en China, lo que ya es más acorde con los resultados encontrados en el presente trabajo.

4.3. IDENTIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE LAS ENTEROBACTERIAS.

Tras la determinación específica y la secuenciación, se determinó que en los planteles avícolas de cantón Ibarra existen dos serotipos de *Salmonella* spp., dos de *E. coli* y dos de *Shigella* spp., los cuales se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Serotipos Identificados de las enterobacterias aisladas y remitidas del cantón Ibarra.

Serotipo	Número de pares de base región V3	Porcentaje de similitud	ID Secuencia
<i>Escherichia coli</i> YKUT1708	402	100%	MF356959.1
<i>Escherichia coli</i> YKUT1707	361	100%	MF356955.1
<i>Salmonella typhimurium</i>	1540	100%	X80681.1
<i>Salmonella</i> serovar Newport	4898059	100%	CP016012.1
<i>Shigella</i> sp. clone CAN 067R	865	100%	JN423801.1
<i>Shigella</i> sp. strain WHQ-9	1441	100%	KY492059.1

Por lo tanto, la secuenciación realizada confirmó los resultados de la identificación realizados mediante PCR. Además, en la investigación realizada por Helberg y col., (2012), se determinó que la amplificación del gen 16S para *Salmonella* entérica genera de 300 a 497 pb para la región V3.

4.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PROPÓLEOS DE IMBABURA.

Una vez caracterizado el propóleo, y determinado el grado de contaminación por Enterobacterias en las explotaciones avícolas en la provincia de Imbabura, lo siguiente fue determinar si EEP al 20% posee actividad antimicrobiana contra los géneros y especies bacterianas investigadas: *E. coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. y *Shigella* spp. Para este fin se realizaron ensayos con el extracto etanólico de Propóleo (EEP) o tintura de propóleo preparada y reservada de cada, con discos

impregnados en cada producto seleccionado, en los que se pudo después medir los halos de inhibición causados por el efecto propóleo y se compararon los resultados obtenidos con los producidos por discos de antimicrobianos con diferentes mecanismos de acción, como son enrofloxacina, sulfa+trimetoprim, lincomicina, tetraciclina, cloranfenicol y neomicina.

Como ya se ha mencionado con anterioridad, el propóleo posee una amplia gama de actividades biológicas gracias a su contenido en sustancias como las flavonas, los flavonoles, la flavanona y los dihidroflavonoides, así como los derivados de los fenilpropanoides (Pobiega y col., 2019a). Entre dichas actividades biológicas destacan sus efectos antibacterianos, antifúngicos, antivirales, antiparasitarios, antioxidantes, anticancerígenos, antiinflamatorios, antiulcerosos y anti diabéticos (Al-Ani y col., 2018).

Numerosos ensayos se han realizado hasta la fecha con el fin de estudiar la actividad del propolis en la inhibición de patógenos en matrices alimentarias (Pobiega y col., 2019b). En los mencionados trabajos, el rango en el cual se ha ensayado su actividad varía de manera muy importante, desde el 0,1% sobre el total del alimento ensayado por Duman y Özpolat (2015) en pescado o Yang y col., (2017) en mandarinas hasta el 10% ensayado en frutas por Ali y col., (2015) o Candir y col., (2009). En la mayor parte de los casos, la concentración más empleada y que demuestra tener acción antimicrobiana ante la mayor parte de los agentes microbianos ensayados es entre un 2-5% (Pobiega y col., 2019a).

4.4.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida.



Figura 26: Resultados de la CMI, de las bacterias *Salmonella* spp. (izquierda), *E. coli* (centro) y *Yersinia* spp. (derecha).

Con esta prueba de dilución en caldo nutritivo, podemos observar que el aspecto turbio se observó en las pruebas de *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Yersinia* spp., en los tubos 4 con la concentración de 600 µg/ml de EEP, determinando así la CMI, y a partir del tubo 5 la máxima turbidez confirmando para estos patógenos que, si hubo la CMB, para la concentración más alta, se constató claramente la inhibición y sedimentación en la concentración de 6% de propóleo con respecto a las bacterias, tal y como puede observar en la Figura 26. Mientras que el comportamiento de **Shigella**, fue diferente, se necesitó mayor concentración de propóleo, 800 µg/ml, para determinar la CMI (Figura 27).

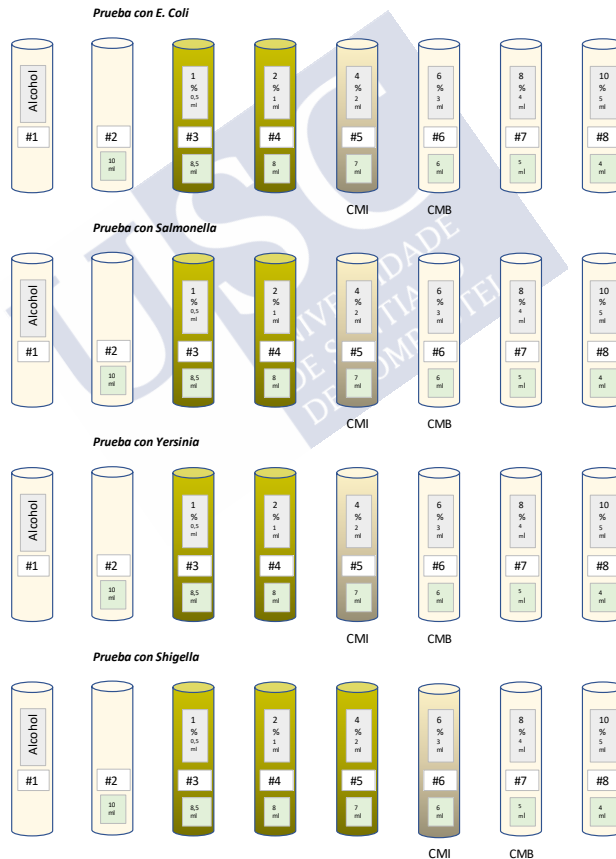


Figura 27. Esquema de determinación de las CMI del EEP en tubos de caldo nutritivo, frente a *E. coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., y *Shigella* spp.

En resumen, podemos ver en la Tabla 21, la determinación de CMI y CMB para las distintas bacterias en estudio.

Tabla 21. Concentración de propóleo para obtener la CMI y CMB de las enterobacterias.

Bacteria	Concentración de propóleo en $\mu\text{g/ml}$				
<i>E. coli</i>	CMI 400	$\mu\text{g/ml}$	CBM 600	$\mu\text{g/ml}$	
<i>Salmonela</i>	CMI 400	$\mu\text{g/ml}$	CBM 600	$\mu\text{g/ml}$	
<i>Yersinia</i>	CMI 400	$\mu\text{g/ml}$	CBM 600	$\mu\text{g/ml}$	
<i>Shigella</i>	CMI 600	$\mu\text{g/ml}$	CBM 800	$\mu\text{g/ml}$	

CMI: Concentración mínima inhibitoria; CMB: Concentración mínima bactericida.

4.4.2. Difusión en Agar.

Una vez realizada la prueba de difusión en caldo, se realizó una prueba de difusión en disco empleando tintura de propóleo al 20% de cada uno de los cantones. Los resultados obtenidos pueden comprobarse en la Tabla 22.

Tabla 22. Resultados de las pruebas de difusión en disco de tintura de propóleo frente a las 4 enterobacterias investigadas.

Origen propóleo	<i>Salmonella</i> spp.	<i>E. coli</i>	<i>Shigella</i> spp.	<i>Yersinia</i> spp.
Ibarra	0,00	*0,45 \pm 0,08	0,00	0,00
Cotacachi	0,00	*0,72 \pm 0,03	0,00	0,00
Otavalo	0,00	*0,70 \pm 0,04	0,00	0,00
Urcuquí	0,00	*0,69 \pm 0,11	0,00	0,00
Pimampiro	0,00	*0,79 \pm 0,12	0,00	0,00
Antonio Ante	0,00	*0,44 \pm 0,09	0,00	0,00

*Diámetro promedio del halo de inhibición.

A la primera lectura, 22 horas después de la incubación, los EEP de la provincia de Imbabura solamente inhibieron a *E. coli*, las demás bacterias se mostraron resistentes a todas las tinturas de los distintos cantones, después del 2^{do} contaje de las 48 horas, los halos descendieron en un promedio de 76% de diámetro. En la Figura 28 podemos observar la curva de inhibición de los distintos EEP y los contajes respectivos, para *E. coli*.

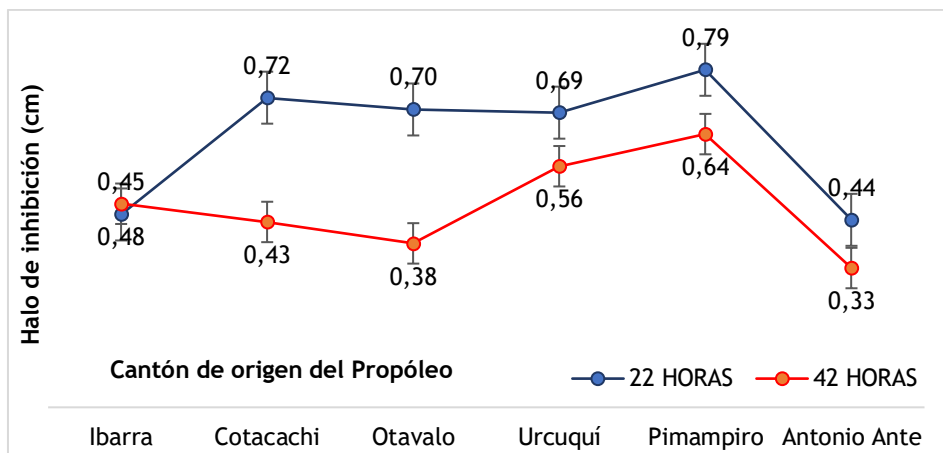


Figura 28. Efecto del propóleo sobre *E. coli* aislados de los diferentes cantones de la provincia de Imbabura, a las 22 y 42 horas.

Los antibióticos comerciales en especial enrofloxacina, mostraron eficacia inhibitoria frente a *Salmonella* spp., *E. coli* y *Shigella* spp., seguida por neomicina con menor eficacia. *Yersinia* tiene un comportamiento de mayor resistencia a los seis antibióticos seleccionados para el ensayo. Otros presentaron una efectividad intermedia, como la tetraciclina y el cloranfenicol, mientras que la combinación de sulfamidas+trimetoprim mostró una menor efectividad en el control de estos patógenos (Tabla 23).

Tabla 23. Promedio halos de inhibición (mm) de antimicrobianos comerciales frente a las enterobacterias aisladas en la provincia de Imbabura.

Código - Antibiótico	<i>Salmonella</i>		<i>E. coli</i>		<i>Shigella</i>		<i>Yersinia</i>	
	H	I	H	I	H	I	H	I
E-Enrofloxacina	2,74 ± 0,06	S	3,11 ± 0,21	S	3,3 ± 0,3	S	0,93 ± 0,75	S
SXT-Sulfa+trimetoprin	0,04 ± 0,06	R	0,00	R	0,00	R	0,00	R
MY-Lincomicina	0,34 ± 0,27	R	0,00	R	0,00	R	0,00	R
TE-Tetraciclina	1,01 ± 0,12	S	0,25 ± 0,27	R	0,86 ± 0,07	S	0,00	R
C-Cloranfenicol	0,83 ± 0,67	S	0,04 ± 0,06	R	0,64 ± 0,9	S	0,00	R
N-Neomicina	1,72 ± 0,13	S	1,22 ± 0,05	S	1,33 ± 0,03	S	0,61 ± 0,49	S

H: Diámetro promedio del halo de inhibición en cm; I: interpretación: S= sensible; R= resistente, en base a CLSI (2002).

Varios de los EEP estudiados contra *E. coli*, mostraron mayor efecto inhibitorio que algunos de los antibióticos comerciales. En contraposición con las pruebas realizadas en caldo, en la prueba de difusión en agar sólo se pudo comprobar actividad inhibitoria frente a *E. coli*, mientras que frente a las otras tres enterobacterias no se encontró evidencia de inhibición (Figura 29). Los antibióticos comerciales en especial la enrofloxacin, es la que mantienen a las bacterias de *Salmonella* spp., *E. coli* y *Shigella* spp. controladas según su actividad antimicrobiana, seguida por neomicina con menor eficacia. *Yersinia* spp. tiene un comportamiento de mayor resistencia a los seis antibióticos seleccionados para el ensayo. El principio activo sulfamidaz+trimetoprim fue el que menor resultado inhibitor presentó para el control de estos patógenos.

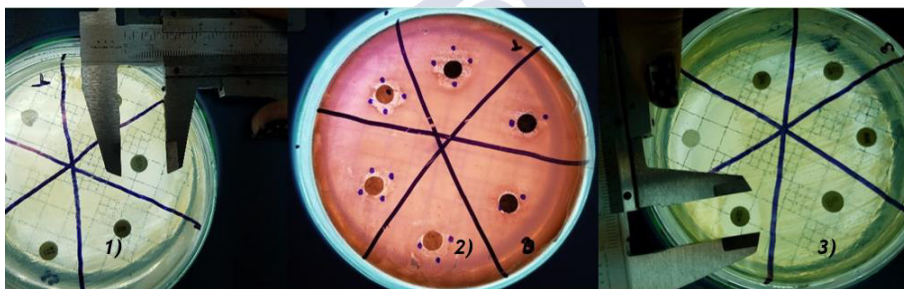


Figura 29. Método de difusión en placa, 1) Medición de halos de inhibición, 2) Halos de inhibición de los discos impregnados en propóleo, 3) Halos de inhibición con antibióticos comerciales.

La mayor parte de las cepas de enterobacterias incluidas en el estudio resultaron resistentes a los antibióticos investigados, con la excepción de la enrofloxacin y la neomicina, a las que todas las cepas seleccionadas resultaron positivas. Estos resultados son compatibles con los publicados en trabajos recientes realizados en Ecuador, como el publicado por Vinuesa-Burgos y col. (2019), en el que demostraron que el 97% de las cepas de *Salmonella* aisladas en explotaciones avícolas y mataderos de pollos en Ecuador resultaron ser resistentes, al menos a un antibiótico de un panel de 10 ensayados. No obstante, en dichos trabajos se encontró una gran resistencia por parte de *Salmonella* a quinolonas como el ácido nalidíxico y la ciprofloxacina, lo que no

concuera con los resultados obtenidos en este trabajo. Es natural que las tasas de resistencia a antimicrobianos estén estrechamente relacionadas con el uso de los mismos que se realice en un área geográfica y del origen de las cepas estudiadas. Por este motivo, la comparación de los resultados con los de otros países con normativas y estatus sanitarios muy diferentes no resulta muy conveniente.

Con respecto a *E. coli*, un trabajo reciente (Moser y col., 2017) realizado en pequeñas explotaciones avícolas en zonas rurales de Ecuador, también encontró en *E. coli* elevada prevalencia a antimicrobianos, superior al 80% por ejemplo en al caso de la tetraciclina, las sulfamidas, y cercanos al 30% en el caso del cloranfenicol. Con respecto a *Yersinia*, en la cual sólo se encontró susceptibilidad a la enrofloxacin, siendo resistente a todos los demás antimicrobianos ensayados, un reciente trabajo realizado en China (Peng y col., 2018), también encontró resistencias frecuentes a algunos de los antimicrobianos incluidos en el presente estudio, como un 26,9% de resistencia a la combinación sulfamidas-trimetoprim y un 15,4% de resistencia a la ciprofloxacina, equivalente a la enrofloxacin.

Finalmente, con respecto a los aislamientos de *Shigella* spp., también se han encontrado elevadas prevalencias de resistencia a algunos de los antimicrobianos incluidos en el presente estudio en trabajos anteriores, como el caso de Wang y col., (2019), que encontró un 78,3% de resistencias a tetraciclina, un 57,4% de resistencia al cloranfenicol o un 2,3% de resistencia a levofloxacina, lo que es coherente con el resultado de sensibilidad a la enrofloxacin encontrado en el presente trabajo. Rahimi y col. (2017) encontró un 92,3% de *Shigella* resistentes a la tetraciclina en cepas aisladas de carnes y productos cárnicos en Irán, mientras que Nüesch-Inderbinen y col. (2017) encontró en cepas aisladas en Suiza un 78,5% de cepas multirresistentes a antibióticos, y Khan y col. (2014) en Nepal encontraron un 95% de resistencias al ácido nalidíxico y un 46% de resistencia a la ciprofloxacina. Como se puede comprobar, la resistencia de *Shigella* spp. a los antimicrobianos más empleados en avicultura es relativamente habitual en diferentes partes del mundo. La resistencia obtenida por Villacrés y col. (2017), en el estudio realizado por ellos, fue a tetraciclina (96,2%), ampicilina (94,9%), trimetoprima/sulfametoxazol (86,1%) y cloranfenicol

(84,8%). No registraron aislados de *Shigella* con resistencia a ciprofloxacina, azitromicina ni a ceftriaxona.

4.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOESTIMULANTE DE LOS PROPÓLEOS OBTENIDOS EN LA PROVINCIA DE IMBABURA.

El propóleo ha sido evaluado en diferentes especies animales, demostrando poseer propiedades inmunoestimulantes, antioxidantes, antibacteriales, entre otras. Por lo tanto, el propóleo es una sustancia que puede ser incluida para fortalecer el sistema inmunológico, confiriendo resistencia a enfermedades y mejorando el rendimiento productivo, características que lo clasifican como aditivo natural funcional (Muñoz Rodríguez y col., 2011).

Existen precedentes del uso del propóleo como inmunoestimulante a fin de prevenir el estrés oxidativo causado por *E. coli* tanto en gallinas ponedoras (Abbas y col., 2020), como en pollos de engorde (Daneshmand y col., 2015; Gheisari y col., 2017; Sahin y Ozturk, 2018), dada su capacidad de neutralizar los efectos de las endotoxinas producidas por *E. coli* (Abbas y col., 2020). Dichas investigaciones se han centrado en la acción del propóleo como estimulador de la producción de inmunoglobulinas (Ig) como IgM, IgA, e IgY, que son el principal sistema de defensa en el cuerpo del animal.

Se determinó en este ensayo la capacidad inmunoestimulante del EEP, investigando tres diferentes dosis que ofertaron concentraciones de: 400, 700 y 1000 mg de la resina por cada mL de EEP (20%) suministrado más las tres repeticiones de control, que no recibieron el producto. Se registraron los valores obtenidos en los cuadros y registros de campo, para posterior análisis de los efectos sobre parámetros como las temperaturas cloacales, el Score de diarreas, recuentos cloacales de *E. coli* o el incremento del peso corporal.

4.5.1. Infección controlada con la cepas de *Escherichia coli*.

Para el inicio de este ensayo, se produjo la infección controlada y dirigida de todas las aves en estudio con *E. coli* (cepas KUTI708 y YKUTI707), inoculando a través del agua de bebida, al día 26 de edad, en que se inicia el ensayo y luego se realizaron contajes para determinar la prevalencia de la bacteria testigo. En la Figura 29, se puede apreciar

que al primer conteo solamente se encontró la presencia de la bacteria en los grupos de control, y para los conteos posteriores, todas las unidades del experimento, tuvieron la presencia de la bacteria en su aparato digestivo, comprobando que dichas cepas han conseguido colonizar el intestino de las aves. El rango en que se determinó la prevalencia de *E. coli*, fue desde 1,9 log UFC/g en el T3, hasta 3,7 log UFC/g en el grupo control. Además, en la misma gráfica, se puede observar la diferencia de comportamiento del prendimiento entre las unidades bajo dosificación de EEP frente al tratamiento control.

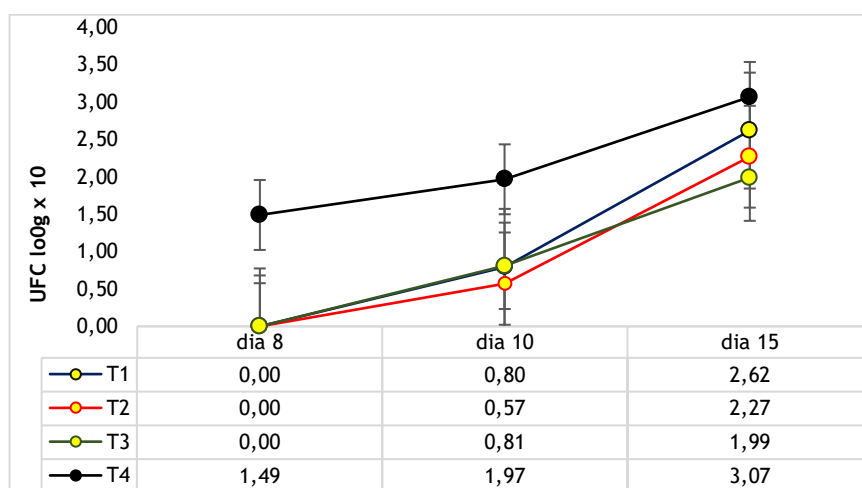


Figura 30: Recuentos de UFC de *E. coli*, post infección controlada para confirmar el prendimiento de la bacteria *E coli*. Los marcadores representan el promedio de \log_{10} UFC /g, y las líneas en cada marcador, su respectiva desviación estándar.

4.5.2. Control de temperatura cloacal post infección.

Respecto a las temperaturas cloacales, se puede observar en la Figura 30, que, tras la inoculación en agua de bebida de la bacteria en referencia, se produjo un incremento en dicha temperatura cloacal hasta el día 5^{to}- 6^{to} día, observándose una tendencia de marcación cercana al límite superior normal. En el día, 7^{mo} en todos los grupos descendió, situándose la tendencia hacia el límite normal inferior, debido posiblemente, al efecto de la replicación bacteriana en las aves, Las temperaturas más con tendencia hacia el límite inferior, las presentaron

T2 y T4. En ningún caso los grupos en estudio, excedieron los límites del rango normal de temperatura en pollos que va desde 40,5° a 41,5° (North Mack, 1990). A partir del día 10^{mo} las secciones estabilizaron la temperatura a rangos normales, siendo las más regulares la sección T1 y T3, como se aprecia en la Figura 31.

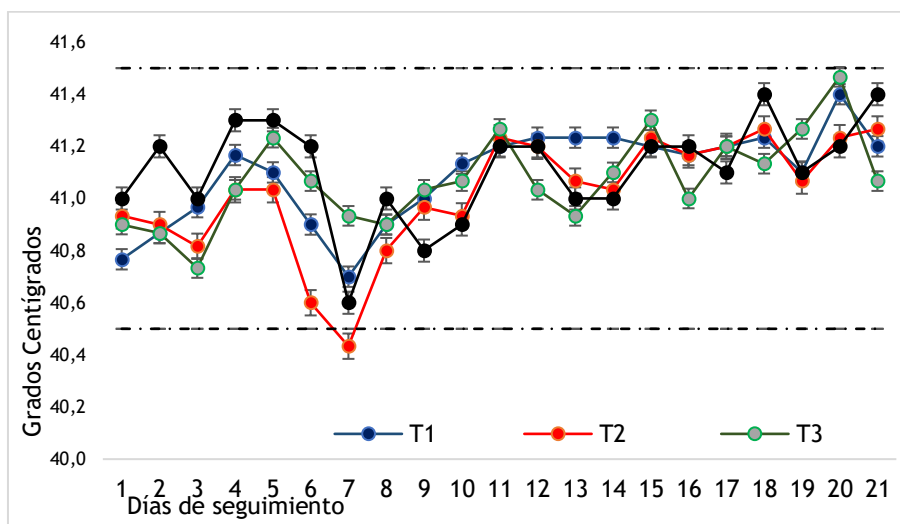


Figura 31. Temperatura cloacal de los pollos suplementados con diferentes concentraciones de tintura de EEP en el agua de bebida y control. (T1: 2 mL/L, T2: 3,5 mL/L, T3: 5 mL/L y T4: sin EEP). Las líneas punteadas, corresponden a los límites inferior y superior de temperatura corporal normal en pollos adultos.

No obstante, dado que las evoluciones en las temperaturas oscilaron de la misma manera en todas las repeticiones, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y el grupo control. A pesar de que mediante determinaciones serológicas existe amplia bibliografía en la que se demuestra que la suplementación con propóleo mejora la respuesta inmune de los pollos de engorde (Mahmoud y col., 2016; Gheisari y col., 2017; Khan, 2017; Sahin y Ozturk, 2018;), en la mayor parte la suplementación no fue simultánea a una inoculación con *E. coli* como inductor de estrés. Este método fue anteriormente utilizado por Abbas y col., (2020) en gallinas ponedoras, en las cuales se comprobó que la suplementación con propóleo mejoró

diversos parámetros serológicos y previno el descenso de productividad inducido por la inoculación de E. coli.

4.5.3. Comportamiento de las heces (score de diarreas) e índice de mortalidad.

Las unidades con los diferentes tratamientos tuvieron un comportamiento muy similar entre todos los tratamientos, no se pudo observar un comportamiento singular en ninguna de las repeticiones, por lo tanto, no se procedió analizarlas y se puede referir que ninguno de los tratamientos influyo en cuadros de disentería específicos, o de manera particular sobre las repeticiones en estudio.

En el seguimiento de mortalidad, no se registraron muertos en ninguna de las unidades experimentales, terminando las jaulas con todos los pollos iniciados en cada una (10 pollos). Por lo tanto, esta actividad no se puede analizar, solamente se puede mencionar que ninguno de los tratamientos influyo en el porcentaje de viabilidad.

4.5.4. Influencia del propóleo en los parámetros productivos

Reiterando que el consumo suministrado, se lo realizó en base a tabla de alimentación con lo que las 12 unidades en estudio recibieron diariamente su ración en base al cálculo correspondiente según el programa preestablecido. El registro de pesos se realizó desde el primer día de estudio (26^{avo} día de edad) y luego cada semana, es decir 26^{avo}, 32^{avo}, 39^{avo} y 46^{avo} día, en que se cerró el período del ensayo. El índice de conversión alimentaria al final del período completo de estudio se calculó empleando la fórmula respectiva. Los datos finales por tratamiento se los puede observar en la Figura 32.

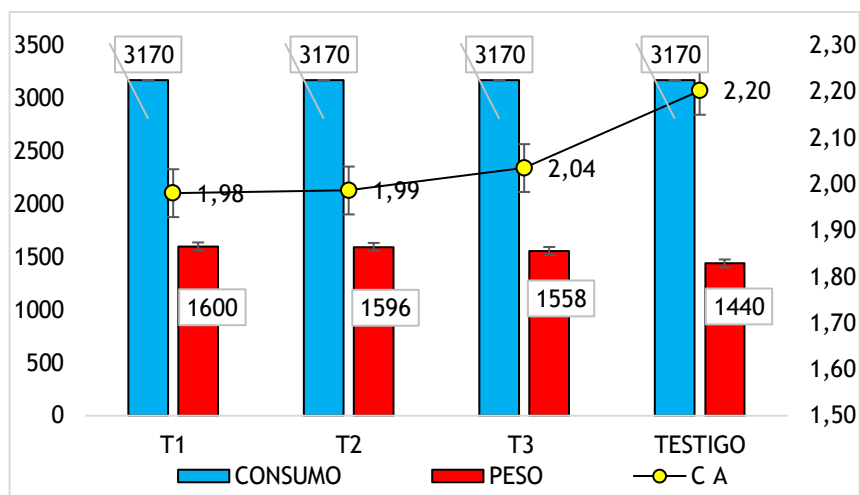


Figura 32. Alimento ingerido (g), incremento del peso corporal (g) e índice de conversión alimentaria (g pienso/ g incremento de peso en los pollos) bajo tratamiento con diferentes concentraciones de EEP. Todas las unidades se alimentaron con ración diaria igual para todos los tratamientos.

Según puede constatar en la Figura 32, no existió diferencia significativa en el consumo de concentrado por animal, ya que en todos los casos se suministró en cantidad constante (suministro con tabla de alimentación) y no bajo la modalidad *ad libitum*, a todas las unidades en experimento, terminando en un acumulado de alimento de 3,17 kg de alimento balanceado ingerido por cada ave, durante el ensayo. Trabajos realizados anteriormente no encontraron diferencias en la ingesta de alimentos en los lotes de pollos suplementados con propóleo (Gheisari y col., 2017; Sahin y col., 2018). En lo que atañe al incremento del peso corporal en los pollos, si se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el incremento experimentado en el grupo T1 (1,6 kg por animal) y el grupo control (1,44 kg por animal), mientras que los lotes T2 y T3 (1,59 y 1,55 kg, respectivamente) no mostraron diferencias estadísticamente relevantes con respecto a los controles. Resulta llamativo que el grupo T1 no es el que más cantidad de EEP suplementado recibió, sino que fue el grupo que recibió la dosis más baja. Por ello, se menciona, que no es necesario ni conveniente la suplementación con más de 2 mL de EEP al 20 %/L de agua de bebida, ya que los efectos conseguidos mediante este incremento en la

suplementación no fueron relevantes. Algunos autores que han publicado trabajos recientes acerca de la acción del propóleo en los pollos no han obtenido incrementos en el índice de conversión del alimento (Gheisari y col., 2017; Sahin y col., 2018). Probablemente, los resultados obtenidos por dichos autores sean diferentes a los obtenidos en el presente trabajo debido a que en su caso no se procedió a una infección experimental simultánea. En un caso en que, se siguió un diseño experimental similar al realizado en este trabajo, se consiguieron importantes mejoras en el status productivo de gallinas ponedoras (Abbas y col., 2020), gracias a la neutralización de la endotoxemia y del incremento de estrés oxidativo provocado por *E. coli* en las aves (Abbas y col., 2020). Otros autores (Mahmoud y col., 2006; Seven y col., 2010; Tekeli y col., 2011; Khan, 2017; Sahin y col., 2018) si han obtenido resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo, en el que se necesitó un promedio de 2,2 kg de pienso para conseguir 1 kg de incremento de peso en los grupos control, en los tres grupos suplementados con propóleo dicha cantidad osciló entre 1,98 y 2,04 kg. Esta mejora, en CA según autores previos tiene su origen en la capacidad del propóleo para modular la microbiota intestinal de los pollos, reduciendo el impacto de agentes patógenos y estimulando el crecimiento de géneros bacterianos beneficiosos (Seven y col., 2006; Tekeli y col., 2011; Khan y col., 2017).

Sobre la actividad del EEP como agente inmunoestimulante, existe mucha investigación que demuestra la eficiencia del producto, como señala Mahmoud (2006), que concluyó el propóleo de abeja tiene muchas actividades biológicas, incluida la actividad inmunoestimulante. Eyng y col., (2013) concluyeron que la inclusión de 100 g de propóleo crudo por Tm en el alimento para broilers, consiguió actuar como agente inmunoestimulador de las respuestas mediadas por células del sistema inmunitario. Arteaga Cadena y col., (2017) señalaron que el desarrollo de los órganos linfoides en las aves de corral permite establecer en cierta manera, una dependencia de su morfometría con el desempeño protector del sistema inmunológico. Mediante dicho estudio establecieron un incremento significativo en el peso y las medidas en el timo, bazo y bursa a favor de los grupos que

recibieron el producto apícola, los cuales mostraron asimismo un mejor desempeño productivo.

En la misma línea de discusión, Muñoz Rodríguez y col., (2011) aluden que los flavonoides proporcionados por el propóleo tienen la capacidad específica de activar los linfocitos T citotóxicos y las células T *natural killer*. No obstante, no existe una teoría clara acerca del mecanismo por el cual se produce esta acción estimulante, si bien la hipótesis más plausible es que dicha estimulación se deba a la inhibición de la enzima ciclooxigenasa, la cual tiene por función participar en la síntesis de las prostaglandinas encargadas de suprimir la acción de los linfocitos T (Hughes, 1999; Hassan y El-Wahad (2018), después de ensayar con la inclusión de propóleos en la dieta de las aves de corral, obtuvieron un efecto positivo en el rendimiento del crecimiento, y observaron además mejor respuesta inmunológica en los pollos, al elevarse en éstos el nivel de globulinas en sangre y disminuir los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre.

Ya se ha informado sobre la estimulación del sistema inmunológico mediante productos naturales (Hegazi y col., 1995; Kong y col., 2004). Mediante los resultados obtenidos en el trabajo investigativo, Taheri y col., (2005), indicaron que el propóleo puede tener un efecto positivo sobre la inmunidad humoral de los pollos de engorde, relacionando este efecto directo con la estimulación del tejido linfático del aparato digestivo, e indirectamente con el cambio de la población microbiana de la luz del tracto digestivo.

Por el contrario, Gheisari, y col., (2017) en un trabajo en el que aplicaron varias dosis diferentes de propóleo a pollos de engorde encontraron que ninguno de los tratamientos afectó significativamente la función inmunitaria humoral, aunque los grupos que recibieron el propóleo en dosis de 100 mg/kg de propóleos mostraron influencia significativa en los niveles de lipoproteínas en sangre.

Los productos de abejas como propóleo actúan en la solución de diversas patologías orgánicas que se producen por lesiones de órganos y tejidos, restaurando la homeostasis corporal en general. Esto se puede inferir por ejemplo con trabajos como el de Klaric y col., (2018), en el que demostraron que la adición de propóleo y polen de abeja en dietas de parrilleros, posee un fuerte efecto protector sobre el desarrollo de

patologías hepáticas ligadas a malos hábitos de vida. Por otro lado, Hughes, (1999) demostró la aplicación de propóleos y favorece la cicatrización de heridas quirúrgicas. Complementando este principio de acción del propóleo, en cuanto al efecto en restauración de tejidos, Mahmoud (2006) evaluó los efectos del EEP sobre la inflamación crónica. Los resultados mostraron una mejora en los síntomas de fatiga crónica y los síntomas relacionados con la artritis, además de un efecto analgésico. Con estos resultados, se puede concluir, que el EEP tiene profundos efectos antiinflamatorios en cuadros crónicos y/o agudos (Park y Kahng, 1999).

4.6. DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS DEL PROPÓLEO COMO PROMOTOR DEL CRECIMIENTO E INMUNOESTIMULANTE.

En este nuevo ensayo, los efectos del propóleo como promotor del crecimiento, comprobados en el apartado anterior, fueron comparados con los efectos de la suplementación con bacitracina de zinc, uno de los promotores de crecimiento, más empleado en avicultura en Ecuador, a una concentración en pienso de 350 g/T. En este caso se optó por suministrar el promotor del crecimiento a través de la ración alimenticia y no del agua de bebida, atendiendo a las recomendaciones del fabricante del aditivo.

Para este ensayo, todas las unidades se alimentaron con tabla de alimento y en base a ella se suministró la ración diaria igual para todos los tratamientos, por ello presentan igual consumo acumulado de alimento (3250 g de alimento acumulado/ ave), es decir no se propuso como objetivo preliminar, medir o conocer el consumo de alimento por cada pollo. Los resultados, diferenciados entre machos y hembras de la adición del propóleo sobre el crecimiento los podemos comprobar en la Tabla 24.

Tabla 24. Incremento de peso corporal y comportamiento del índice de conversión alimenticia en pollos tratados: con propóleo a 2 mL/L (T1), 3,5 mL/L (T2), tratados con bacitracina de zinc (T3) y controles (T4).

Grupo	Incremento del peso corporal		Conversión alimenticia	
	Machos	Hembras	Machos	Hembras
T1	^A 1616,0 ± 89,08 ^b	^B 1444,2 ± 33,18 ^a	^B 2,02 ± 0,11 ^a	^A 2,25 ± 0,05 ^b
T2	^A 1719,1 ± 64,21 ^a	^B 1383,0 ± 19,73 ^b	^B 1,89 ± 0,0,7 ^b	^A 2,35 ± 0,03 ^{a,b}
T3	^A 1684,7 ± 108,1 ^{a,b}	^B 1341,1 ± 61,65 ^{b,c}	^B 1,93 ± 0,13 ^b	^A 2,43 ± 0,12 ^a
T4	^A 1646,0 ± 7,21 ^b	^B 1318,3 ± 47,29 ^c	^B 1,97 ± 0,01 ^b	^A 2,46 ± 0,08 ^a

^{A-B}: Diferentes letras en la misma fila muestran resultados diferentes entre machos y hembras. ^{a-c}: Diferentes letras en la misma columna muestran resultados diferentes en función del tratamiento.

Como se puede observar, en todos los casos estudiados, los pollos machos mostraron un mayor incremento del peso corporal y un índice de CA significativamente inferior a los pesos obtenidos en el caso de los pollos hembras, es decir que los machos mostraron ser, significativamente más eficientes en la conversión del alimento en carne, como es de esperarse biológica y genéticamente. En el caso de la comparación entre los pollos controles, los tratados con bacitracina de zinc y los tratados con diferentes dosis de EEP, los resultados curiosamente mostraron diferencias significativas en función del sexo de los pollos. Estos resultados son coherentes con los anteriormente publicados por Kleczek y col. (2014), quienes demostraron que las diferencias en los pesos corporales de hembras y machos presentan importantes diferencias en el peso de la canal, siendo mayor en los machos que en las hembras, mientras que Lazzari y Pagani, (1999) demostraron que la diferencia en la velocidad de crecimiento y peso en pollo Cobb se debe al dimorfismo sexual, propio de las especies.

En el caso de los pollos machos, los mejores incrementos de peso se consiguieron con bacitracina de zinc y con propóleo a 3,5 mL/L, mientras que no se observó un incremento en el peso corporal de los controles y los tratados con propóleo a una concentración de 2 mL/L. Por el contrario, en el caso de los pollos hembra, los mejores resultados se obtuvieron mediante el tratamiento con propóleo a una concentración

de 2 mL/L, seguido del propóleo a 3,5 mL/L, mientras que la bacitracina de zinc no consiguió un incremento estadísticamente significativo en el incremento del peso corporal respecto a los controles. Los resultados en el índice de CA mostraron resultados coherentes con los obtenidos para el incremento del peso corporal, ya que a todos los casos se les suministró cantidad de alimento calculada o limitada mediante el método de alimentación controlada preestablecida y no *ad libitum*.

En estudios previos, numerosos autores han demostrado efecto promotor del crecimiento del propóleo en pollos productores de carne, utilizando dosis muy diferentes. Entre éstos, Kleczek y col., (2014) consiguió mejoras en el crecimiento y en el índice de conversión alimentaria con una suplementación de 50 mg/kg de pienso. Abbas (2014), utilizó una suplementación de entre 0,5 a 1,5 g/kg. Zafarnejad y col., (2017) empleó para este fin una suplementación entre 0,6 y 0,9 g/kg, obteniendo en todos los casos resultados positivos, al igual que lo consiguieron Hosseini y col., (2016), empleando una suplementación de 3 g/kg de pienso.

En el estudio implementado por Zafarnejad y col., (2017), bajo el suministro de cuatro dosis de propóleo más el control, se evidenció el mejor rendimiento de los pollos tratados frente a los no suplementados. Los resultados indicaron que el consumo y peso corporal más elevado, y el mayor rendimiento a la canal, se encontró en los pollos a los que se les ofreció 800 mg/kg de propóleo, mejorando la eficiencia alimenticia entre un 3-5% con respecto a los controles. De forma análoga, Eyng y col., (2015), llegaron a concluir que la suplementación continua o intermitente del propóleo, produjo un aumento significativo de la ganancia de peso corporal (promedio 1856 g vs 1641 g en los controles), mejorando de este modo la tasa de conversión alimentaria (promedio 1.88 vs 2.24 del tratamiento control). Kleczek y col., (2014) obtuvieron en cambio como resultado que el crecimiento de los pollos de engorde alimentados con una dieta suplementada con 50 mg de propóleo fue muy similar al rendimiento de pollos alimentados con una dieta con agentes promotores del crecimiento y ligeramente mejor que el de las aves que recibieron una dieta no suplementada. Además, en dicha investigación, al contrario que lo obtenido en el presente trabajo, obtuvieron que el consumo de alimento por kg de peso corporal, peso a

la canal y peso de carne magra fueron significativamente mayores en hembras frente a los machos.

Gheisari, y col., (2017) compararon los efectos de la suplementación con EEP a concentraciones de 50, 100, 200 y 300 mg/kg con un grupo control tratado con 4,5 mg/kg de flavofosfolipol. Los grupos tratados con EEP tendieron a mejorar el peso corporal y la ingestión de alimento de los grupos de ensayo en comparación con el grupo de control, obteniendo los mejores resultados en el caso de los pollos suplementados con 200 mg /kg de EEP. Por su parte, Khojasteh Shalmany y Shivarad (2006), investigaron los efectos del EEP en el rendimiento de los pollos Ross 308. Al final indicaron que, la ganancia de peso, el consumo de alimento, y el índice de conversión alimentaria fueron significativamente mejores para las aves alimentadas con EEP, mejorando también con dicha suplementación la tasa de mortalidad, que se redujo significativamente en comparación con la dieta control. Hassan y El-Wahad (2018), obtuvieron mediante suplementación con EEP, incrementos significativos del peso corporal de las aves, disminuyendo además la cantidad de alimento ingerida, por lo que el índice de conversión alimentaria resultó significativamente mejor mediante dicha suplementación. No es el pollo la única especie aviar en la cual el propóleo ha demostrado tener efectos como promotor del crecimiento y mejorador de la eficiencia en la conversión alimentaria, sino que también ha demostrado este efecto en codornices japonesas (*Coturnix japonica*) (Tayeb y Sulaiman, 2014).

No obstante, no en todos los casos la suplementación con EEP aportó resultados beneficiosos, ya que Eyng y col., (2015), reportaron efectos negativos de la aplicación de propóleo para algunos parámetros, si bien en este caso los resultados no son totalmente comparables a los obtenidos en el presente trabajo, dadas las bajas concentraciones de EEP empleadas (inclusión de 1% a 4%).

4.6.1. Efectos del propóleo sobre la mortalidad en las aves

Durante el presente estudio no se presentaron muertes durante los 21 días de ensayo, en ninguna de las unidades experimentales, tampoco en las de control. Por lo tanto, se terminó con el mismo número de pollos iniciados en cada repetición. Entonces el porcentaje de viabilidad

final fue del 100% por lo que se puede definir que ninguno de los tratamientos influyó en el parámetro de mortalidad. Por este motivo particular, no se pudo comparar de un modo eficaz nuestros resultados con los de otros autores que si reportaron un descenso en la mortandad relacionada con la suplementación con EEP. De este modo, Khan (2017) obtuvo tras la suplementación con EEP una reducción en la tasa de mortalidad, atribuida a las propiedades antimicrobianas del propóleo, ya que previenen infecciones subclínicas. Dicha reducción de la mortalidad pueden también explicarse por sus funciones del EEP en la mejor digestión de los alimentos, mayor absorción de nutrientes y el metabolismo, lo que ocasiona cambios en las concentraciones sanguíneas de colesterol, proteínas totales y aminoácidos (Mahmoud y col., 2016).

4.6.2. Determinación de la acción de exclusión competitiva en la microbiota intestinal del propóleo

Para inferir el principio de exclusión competitiva, se realizaron recuentos de *Lactobacillus acidophilus*, probiótico normal en la microbiota de pollos y *E. coli*, elegida como testigo por ser un patógeno oportunista de crecimiento habitual en el tracto gastrointestinal. Los resultados obtenidos pueden observarse en la Tabla 25.

Tabla 25. Recuentos (\log_{10} UFC/g) obtenidos de *Lactobacillus acidophilus* y *Escherichia coli* en pollos de 42 días tratados con propóleo a 2 mL/L (T1), 3,5 mL/L (T2), tratados con bacitracina de zinc (T3) y controles (T4).

Tratamiento	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Escherichia coli</i>
T1	$3,50 \pm 0,024^a$	$3,40 \pm 0,038^a$
T2	$3,52 \pm 0,030^a$	$3,39 \pm 0,051^a$
T3	$3,44 \pm 0,020^a$	$3,37 \pm 0,055^a$
T4	$3,23 \pm 0,122^b$	$3,58 \pm 0,011^b$

^{a-b}: Diferentes letras en la misma columna muestran resultados diferentes en función del tratamiento.

Los resultados obtenidos muestran que en los grupos tratados se encontró cantidades significativamente mayores de *L. acidophilus* y menores de *E. coli* que el grupo de pollos controles. No se evidenció,

por el contrario, ninguna diferencia significativa en el caso de los tres tratamientos empleados, que arrojaron resultados similares.

De manera diferente, en otras investigaciones (Mahmoud y col., 2017) los resultados indicaron que la suplementación con EEP no afectó las concentraciones cloacales de *E. coli*, coliformes totales, *Enterococcus* spp. y *Lactobacillus*. Más aún, estos autores encontraron descensos significativos en los pollos suplementados con EEP a una concentración de 1000 mg/kg de otro género bacteriano tradicionalmente considerado como beneficioso, que es *Bifidobacterium* spp.

Watkins y Kratzer, (1984) evaluaron los efectos de la suplementación en pollos de un producto comercial formado principalmente por un cultivo de *Lactobacillus*. Tras la administración de este probiótico no encontró diferencias significativas entre los pesos del intestino delgado de los pollos tratados y controles. La microbiología realizada en el contenido duodenal reveló un significativo mayor número de lactobacilos para los pollos de engorde que recibieron dosificación continua, y los de dosificación intercalada pasando un día, frente al grupo control que no recibió probiótico. Otros autores (La Ragione y col., 2004) estudiaron en pollitos de 1 día la eficacia de *Lactobacillus johnsonii* para prevenir una infección experimental con *S. enteritidis* y con *E. coli*. No hubo efectos significativos contra *S. Enteritidis* mientras que la colonización del intestino delgado por *E. coli* se redujo significativamente. En la misma prueba a los pollos libres de patógenos específicos (de 20 días de edad) se les administró *L. johnsonii* y, 24 h después, se les administró *C. perfringens*. La única dosis de *L. johnsonii* fue suficiente para suprimir todos los aspectos de la colonización y prevalencia *C. perfringens*.

En un estudio similar se investigó la eficacia de *Lactobacillus plantarum* y sulfato de colistina, como agente profiláctico de la infección gastrointestinal por *E. coli* en pollos de engorde. En los pollos en los que se les administró el probiótico se consiguió un mayor peso corporal, mayores contenidos cecales de ácido láctico y menores recuentos cloacales de *E. coli* y mejor respuesta inmunitaria contra éste que en los pollos empleados como controles, (Wang y col. 2014).

En un ensayo similar en donde se empleó como probiótico *E. faecium* en pollos de engorde inoculados experimentalmente con *E. coli*. Las aves suplementadas con *E. faecium* tuvieron un mayor peso corporal, mayor altura de las vellosidades yeyunales y mayores recuentos cloacales de *Lactobacillus* sp., mientras que por el contrario, mostraron menores recuentos de *E. coli* y *Clostridium perfringens* (Cao y col. 2013). Abdel-Mohsein, y col., (2014), revelaron que el propóleo alivia la respuesta del eje hipotalámico-pituitario-adrenal inducida por el estrés de calor, al aumentar tanto las poblaciones cecales de *Lactobacillus* como de *Bifidobacterium*, al mismo tiempo que reducen los microorganismos aeróbicos totales y las bacterias coliformes dentro del intestino de los pollos de engorde.

4.6.3. Efectos del propóleo sobre las vellosidades intestinales de los pollos

La altura de las vellosidades intestinales se considera un indicador importante de la salud digestiva de los pollos, ya que una mayor altura de estas está directamente relacionada con la capacidad de absorción de nutrientes de la mucosa (Hosseini y col., 2016). Investigaciones más recientes (Kers y col., 2018) revelaron que no sólo la altura de estas, sino también otros parámetros como el ancho de las vellosidades y la profundidad de las criptas influyen en la función de absorción intestinal, lo cual a su vez ejerce un papel muy importante en el ritmo de incremento del peso corporal en las aves.

Para analizar la salud intestinal a través del diagnóstico de vellosidades y criptas se tomó una muestra de intestino delgado (1 cm² a nivel del Íleon), y se realizaron las mediciones histológicas respectivas de: Longitud y ancho de vellosidades, y la profundidad de criptas, los resultados se muestran en la Tabla 26.

Tabla 26: Dimensiones promedio de las vellosidades intestinales de segmentos del íleon de los pollos tratados con propóleo a 2 mL/L (T1), 3,5 mL/L (T2), tratados con bacitracina de zinc (T3) y controles (T4).

Grupo	*Longitud	*Ancho	**Profundidad
T1	0,703 ± 0,115	0,280 ± 0,081	0,228 ± 0,096
T2	0,757 ± 0,088	0,265 ± 0,040	0,288 ± 0,106
T3	0,668 ± 0,034	0,227 ± 0,037	0,253 ± 0,139
T4	0,510 ± 0,064	0,250 ± 0,024	0,243 ± 0,136

Medición tomada en mm, expresada en media ± desviación estándar. *Referente a vellosidades, ** Referente a criptas. ^{a-b}: Diferentes letras en la columna de longitud, muestran que los resultados son significativamente diferentes.

Se puede distinguir en la Tabla 26, que el grupo T2 presentó vellosidades 48,4% más largas que el T4, alcanzando diferencias estadísticamente significativas. Los grupos T1 y T3 también mostraron longitudes de las vellosidades mayores en un 38% y 31%, que en los valores obtenidos en el grupo control. En base a los resultados obtenidos los pollos tratados tanto con EEP en el agua de bebida o con bacitracina de zinc en el alimento mostraron mejor salud intestinal que los controles, lo que presumiblemente, mejora la respuesta al mejor bienestar de las aves y por ende a su mejor performance de producción. No obstante, en el presente estudio no se ha encontrado evidencia alguna de efectos sobre el ancho de las vellosidades ni en la profundidad de las criptas.

De manera similar, Hosseini y col., (2016) en aves alimentadas con propóleo, polen y una mezcla de los dos, también demostraron el cambio en la mucosa intestinal observando proporciones de vellosidades de mayor crecimiento. También Chegini y col., (2018) tras la administración de propóleo a pollos de engorde obtuvieron incrementos en la altura de las vellosidades en pollos alojados bajo estrés calórico, en comparación con aquellos alimentados con ración normal. Además, Hosseini y col., (2016) proporcionando propóleo a los pollos de engorde consiguieron resultados beneficiosos de mayor altura de las vellosidades del yeyuno en los pollos estresados por calor, además refieren que la glucemia de la dieta puede estimular las funciones digestivas y de absorción de pollos de engorde y puede ser útil para explicar la mejora del incremento de crecimiento. Por el contrario, Mahmoud y col., (2017) no obtuvieron resultados en el mismo sentido, ya que en un ensayo también con propóleo en pollos de

engorde no encontraron que dicho propóleo tuviese efecto alguno ni sobre las vellosidades intestinales ni sobre las criptas.

4.6.4. Efectos del propóleo sobre la morfología de los órganos linfoides de los pollos de engorde

Los órganos linfoides constituyen los componentes primordiales de la estructura del sistema inmune de las aves. Entre muchos de los componentes del sistema, pueden considerarse como órganos linfoides primarios la bolsa de Fabricio o bursa, (lugar de producción y diferenciación de linfocitos B) y el timo (lugar de producción y diferenciación de linfocitos T) y la medula ósea (Qureshi y col., 1998; Vallés y col., 2011). Por su parte, el bazo y las glándulas de Harder, son considerados como órganos linfoides secundarios (Vallés y col., 2011). En los pollos, la bolsa de Fabricio juega un papel importante en la producción de anticuerpos. El desarrollo de la bursa comienza durante la embriogénesis tardía, Durante el desarrollo embrionario las células primordiales migran desde el saco vitelino hacia la medula ósea, y de ahí hacia timo o Bursa de Fabricio, donde se desarrollarán como linfocitos T y B (Yegani y Korver 2008; Valles y col., 2011). También el tamaño del intestino, tanto medido en peso como en longitud es directamente proporcional a la capacidad inmunitaria del animal, ya que se incrementa la superficie de contacto con antígenos de agentes infecciosos o potencialmente infecciosos (Yegani y Korber, 2008).

Los resultados obtenidos en el presente estudio tras la adición de propóleo y bacitracina de Zinc los podemos comprobar en la Tabla 27.

Tabla 27. Peso de los diferentes órganos linfoides e intestino tras el sacrificio en los pollos tratados con propóleo a 2 mL/L (T1), 3,5 mL/L (T2), tratados con bacitracina de zinc (T3) y controles (T4).

Grupo	Peso Timo (g)		Peso Bazo (g)		Peso Bursa (g)		Peso Intestino (g)		Longitud intestino (cm)	
	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H
T1	9,9±0,79 ^a	10,7±1,95 ^a	^A 3,6±0,4	^B 2,56±0,15 ^b	^A 4,05±0,1 ^b	^B 3,75 ±0,2 ^b	^A 114,5±26,6	^B 88,6±11,1 ^{a,b}	226,6±8,91 ^b	217,2±5,06 ^a
T2	9,23±0,85 ^b	10,83±2,35 ^a	^A 3,43±0,25	^B 2,57±0,06 ^b	^A 6,32±0,13 ^a	^B 4,05±0,65 ^a	^A 109,2±22,47	^B 89,1±14,12 ^a	^A 239,5±0,00 ^a	^B 225,00±0,00 ^a
T3	9,27±1,05 ^b	9,70±2,40 ^b	^A 3,43±0,35	^B 2,3±0,00 ^c	2,45±0,65 ^c	2,75±0,65 ^c	^A 109,8±24,68	^B 79,48±15,12 ^b	^A 240,5±1,73 ^a	^B 220,3±8,08 ^a
T4	^A 10,37±1,55 ^a	^B 6,3±1,20 ^c	^A 3,53±0,65	^B 3,03±0,45 ^a	^A 2,80±0,80 ^c	^B 1,52±0,13 ^d	^A 109,5±14,65	^B 88,45±13,75 ^{a,b}	228,8±9,23 ^b	197,3±23,96 ^b

^{A-B}: Diferentes letras en la misma fila muestran resultados diferentes entre machos (M) y hembras (H).

^{a-c}: Diferentes letras en la misma columna muestran resultados diferentes en función del tratamiento.

En base a los resultados obtenidos, ha podido comprobarse que la suplementación con EEP o con bacitracina de Zinc, permitieron mayores tamaños de los principales órganos linfoides como son el timo y la Bolsa de Fabricio en los grupos de prueba que tuvieron mayor peso que el grupo control (Figura 33). En el caso del bazo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y el grupo control, mientras que en el caso del timo y bursa si existieron dichas diferencias. El timo del tratamiento control fue 15,6% de menor tamaño que el T1 y menos de 14 % que T2 y T3.

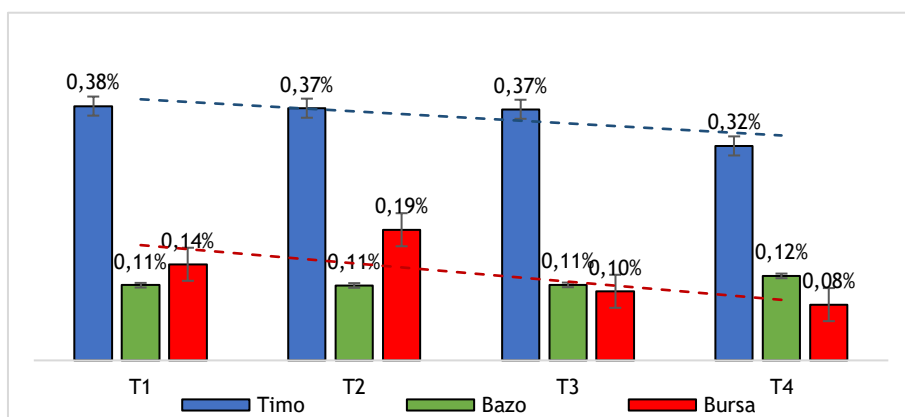


Figura 33. Porcentajes de peso de timo, bazo y bursa, con respecto al peso corporal de las aves antes de su sacrificio en los pollos tratados con propóleo a 2 mL/L (T1), 3,5 mL/L (T2), tratados con bacitracina de zinc (T3) y controles (T4).

Más evidente fue el comportamiento de la Bursa puesto que el T4 presentó menor tamaño que los tratamientos de prueba. Como ya se destacó, se obtuvieron valores significativamente más altos para la bolsa de Fabricio de todos los tratamientos tanto de hembras como de machos, frente al porcentaje de peso del tratamiento control (T4). En la Figura 33 puede observarse que, en el grupo T2 (suplementado con propóleo en agua al 3,5 mL/L de agua), las burzas crecieron mucho más del doble que en el grupo control: 0,19% vs 0,08% (138% de mayor

peso), mientras que en los grupos T1 y T3, las bolsas de Fabricio resultaron ser un 78% y 31% más grandes que en el grupo control.

Trabajos de investigación realizados previamente a este trabajo, como el de Vallés y col., (2011) confirmaron el efecto inmunomodulador del EEP sobre la Bursa de Fabricio en pollos de engorde en relación con los pollos empleados como controles. Otro trabajo, que en lugar de EEP empleó otro producto apícola como es la apitoxina (Arteaga Cadena, y col., 2017) en pollos camperos, consiguieron timos (631 g en el timo del grupo ensayo contra 480 g en los controles) y bursa (1.596 g del grupo ensayo contra 1.415 g en los controles) de pesos mayores en los grupos tratados. Eyang y col. (2015) evaluaron el efecto de la inclusión de cinco tratamientos distintos de propóleo en la alimentación de pollos, durante los primeros 21 días, sobre la actividad hematológica en especial de macrófagos, basófilos, generación de anticuerpos, el peso de los órganos linfoides. En sus resultados obtenidos encontraron que el peso relativo del timo, bolsa de Fabricio, bazo y el porcentaje de monocitos se incrementaron en respuesta a la administración de propóleo en relación con los pollos controles.

Zafarnejad y col., (2017) encontraron incrementos en el peso relativo de bazo y bursa tras la suplementación de pollos de engorde con EEP a dosis de 900 mg/kg de pienso, no encontrando efecto alguno a dosis inferiores. No obstante, Haghhighian Roudsari y col., (2010) si encontraron incrementos en el peso del timo, bolsa de Fabricio y en la concentración circulante de anticuerpos suplementando el pienso de los pollos con 250 mg/kg de propóleo. Resultados similares encontraron otros autores como Hosseini y col., (2016) o Chegini y col., (2018), que en ambos casos encontraron incrementos en el tamaño relativo del timo y la bolsa de Fabricio en pollos suplementados con propóleo frente a los pollos controles.

4.7. EFECTO DEL PROPÓLEO SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE LOS POLLOS.

La modificación de la microbiota intestinal de los pollos, generalmente modificada mediante la suplementación con probióticos constituye en la actualidad un alternativa importante de la investigación

biotecnológica aplicada como respuesta a la necesidad de reemplazar los antibióticos y quimioterapéuticos. Esto debido a que estos elementos como probióticos, complementados con prebióticos no desarrollan y mucho menos propagan resistencia microbiana, por lo tanto ofrecen un inmenso potencial para promover el crecimiento, la modulación de la microflora intestinal y la inhibición de patógenos, mejorando la calidad y hasta la cantidad de la carne de las aves de corral (Blajman col., 2014; 2015). No obstante, la suplementación con probióticos o prebióticos no es la única estrategia que puede emplearse con el fin de modificar la microbiota intestinal, ya que éste es también influenciado por medio de la adición de otro tipo de sustancias como micronutrientes, que a pesar de estar incluidos en la dieta en pequeñas cantidades, tienen capacidad de inhibir o potenciar la multiplicación de algunos géneros bacterianos (Roca-Saavedra y col., 2018).

Para ello se planteó comparar los efectos del EEP sobre los pollos, en comparación con dos probióticos comerciales, uno de ellos basado en la presencia de *L. acidophilus*, y otro consistente en una mezcla de *L. Rhamnosus* y *Enterococcus faecium*, así como un control sin probiótico.

4.7.1. Registros del consumo de alimento y peso corporal de los pollos

Los resultados de consumo de pienso, incremento del peso corporal e índice de conversión alimenticia de los pollos sometidos a cada uno de los tratamientos, se pueden verificar en la Tabla 28.

Tabla 28. Promedio de los resultados obtenidos en los principales parámetros productivos

	consumo de alimento (g)	incremento del peso corporal (g)	Índice de CA
T1 D1	1106 ± 12,11	599 ± 19,78	1,85 ± 0,08
T2 D1	1166 ± 6,19	630 ± 4,14	1,85 ± 0,02
T3 D1	1081 ± 54,20	580 ± 20,29	1,86 ± 0,04
T1 D2	1055 ± 175,95	566 ± 44,28	1,87 ± 0,17
T2 D2	1027 ± 191,36	549 ± 26,96	1,87 ± 0,44
T3 D2	1147 ± 21,27	583 ± 11,74	1,97 ± 0,07
T1 D3	1120 ± 9,18	591 ± 2,19	1,89 ± 0,01
T2 D3	1172 ± 39,27	573 ± 53,28	2,04 ± 0,26
T3 D3	1192 ± 5,19	616 ± 11,32	1,94 ± 0,04

Valores expresados en media ± desviación estándar.

Los datos en el análisis estadístico no muestran diferencias significativas entre las dosis o entre tratamientos. Sin embargo, en la Figura 34, podemos ver el valor de índice de conversión alimentaria, considerado como el factor que mejor se aplica para evaluar la eficiencia de la transformación del alimento consumido en músculo (carne). En cuanto a los tratamientos se observa que el grupo T1 alcanzó, 3,4% de mayor eficiencia que los tratamientos de control (Figura 34). Con respecto a la dosificación de EEP frente al promotor de crecimiento, y al tratamiento control, presento 5,2 % y 2,7% de mejor eficiencia en la conversión de alimento frente al tratamiento control respectivamente.

El propóleo como simbiótico en sinergia con *Lactobacillus* (T1) tuvo un índice de conversión alimentaria un 3% de mejor que los otros dos tratamientos (T2, T3), y como promotor de crecimiento (D1) frente a la bacitracina de zinc (D2), presento 5 % de mayor eficiencia para el mismo índice.

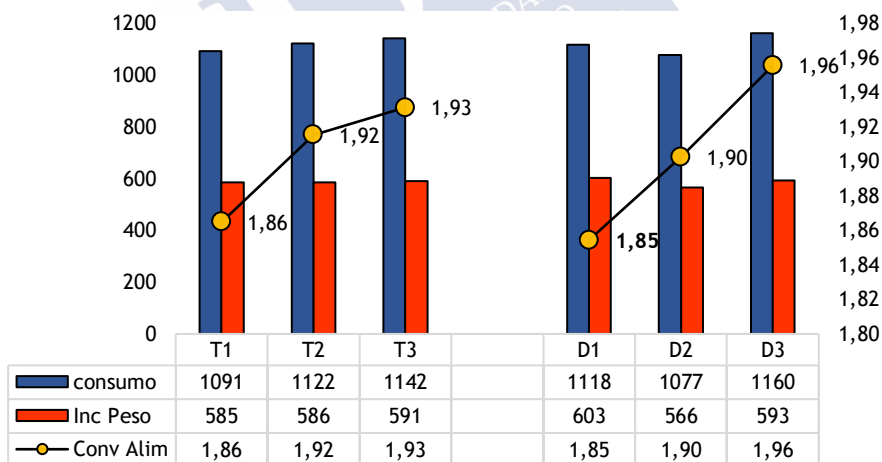


Figura 34. Comportamiento de los Tratamientos y dosificaciones sobre los principales parámetros productivos.

Trabajos de investigación realizados previamente, como el de Abdulrahim (1999), demostraron los efectos beneficiosos de combinar *L. acidophilus* y bacitracina de zinc, sobre el crecimiento de los pollos

de engorde durante un período de 8 semanas. Durante dicho período encontraron que el incremento del peso corporal fue mejor con respecto a los controles (10,8% superior) con la interacción de ambos aditivos en la dieta, mientras que el uso de la bacitracina de zinc de manera individual también consiguió un incremento con respecto a los controles, pero de menor cuantía (9,1%). La conversión de alimentos mostró diferencia en eficiencia, pues se redujo con la bacitracina de zinc sola, pero mejoró con el uso de *L. acidophilus* y bacitracina en combinación.

Más recientemente, Kamel y Mohamed, (2016) implementaron el ensayo para valorar el efecto de algunos aditivos nutricionales (probióticos, prebióticos, simbióticos, ácidos orgánicos y enzimas) sobre la eficiencia productiva y económica de pollos de engorde Cobb y Ross. Al final, el mayor incremento del peso corporal se obtuvo para los pollos de raza Cobb suplementados con simbióticos. Estos autores concluyeron que mediante dicha suplementación se podría minimizar el uso de antibióticos como promotores del crecimiento en pollos, ya que sus resultados mejoraron la ganancia de peso que suele conseguirse mediante el uso de antibióticos para este fin. Además, trabajos posteriores han demostrado que el uso de probióticos y simbióticos mejoran positivamente el sistema inmunológico de los pollos, consiguiendo incluso menores mortalidades que mediante la suplementación con antibióticos (Attia y col., 2017).

Gheisari y col., (2017) encontraron que los pollos de engorde a los que se suplementó su dieta con propóleo a razón de 200 mg/kg de pienso, tuvieron valores más altos en consumo de alimento y mejor

ganancia de peso, en comparación con los pollos controles. Por el contrario, De Souza y col., (2018) al evaluar el efecto de los probióticos adicionados al alimento, sobre el rendimiento productivo, morfología intestinal y características de la canal de los pollos tras el sacrificio en matadero, encontró que la suplementación con probióticos como *L. acidophilus*, *B. subtilis*, *Bifidobacterium bifidum* y *Enterococcus faecium*, no produjo mejoras estadísticamente significativas. Este trabajo fue llevado a cabo combinando la suplementación de los probióticos con factores estresantes ambientales, por lo que sus

resultados no son totalmente comparables a los obtenidos en el presente trabajo.

Hascík, (2019) diseñó un estudio para determinar el efecto de la suplementación dietética con polen de abeja, propóleo y probiótico (en este caso *Lactobacillus fermentum*) en la producción de músculo y características de la canal de pollos de engorde. El trabajo develó, que el polen de abeja en combinación con probióticos fue el complemento alimenticio más adecuado, mostrando efectos estadísticamente significativos en la mejora del incremento del peso corporal de los pollos, comparados con los controles. De Souza y col., (2018) investigaron los efectos de probióticos añadidos en el agua de bebida, sobre el rendimiento de crecimiento de pollos de engorde. El grupo de control recibió agua sin tratamiento, mientras que el grupo experimental fue tratado con un probiótico comercial compuesto de: *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *E. faecium* y *L. casei*. También se incluyó en el ensayo otro grupo experimental que recibió un tratamiento a base de otros complementos alimenticios que han sido asociados con la mejora productiva de pollos de engorde, como son levadura de panadería, vitamina C, lactosa y glucosa. Los resultados obtenidos por estos autores, demostraron que la adición del probiótico aumentó significativamente la ganancia de peso corporal de los pollos a los 21, 35 y 42 días de edad, sin que se demostrase diferencia alguna en lo referente al consumo de pienso por parte de los animales. De este modo, el incremento en el índice de conversión observada en el grupo suplementado con probióticos fue consecuencia de una mejora en la salud intestinal de los pollos, no en un incremento en el consumo de alimento.

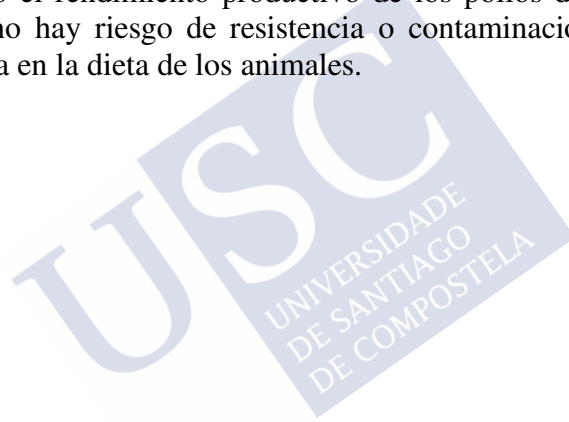
5. CONCLUSIONES

En base a los resultados alcanzados en las diferentes pruebas y ensayos componentes de esta tesis doctoral, se han podido determinar las conclusiones siguientes:

- 1) El propóleo Imbabureño, presenta características químicas muy cercanas a los parámetros establecidos por la normativa nacional vigente, aunque su composición de acuerdo con el origen cantonal varía significativamente en función de la flora circundante. En general, el promedio provincial, mantiene buenas concentraciones de compuestos bioactivos como fenoles y flavonoides, encontrando que el propóleo procedente del cantón Ibarra, cumple con todos los parámetros establecidos por las normas de calidad en todos los parámetros investigados. De este modo, podemos afirmar que las muestras de propóleo obtenidas del cantón de Ibarra resultaron de mayor calidad química, que las del resto de cantones.
- 2) Las enterobacterias más frecuentes en el tracto gastrointestinal de pollos de engorde de Imbabura, fueron *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*, presentes en la mayoría de las explotaciones avícolas estudiadas. Más limitada fue la presencia de *Shigella spp* y *Yersinia spp.*, especialmente de este último género. También se ha podido constatar que el clima, ubicación altitudinal y nivel de organización en el sistema de buenas prácticas de manejo, influyen directamente en la prevalencia de las enterobacterias.
- 3) Mediante la extracción de ADN por PCR, se determinó que las especies encontradas en los planteles avícolas de Imbabura correspondieron a los patotipos: *E. coli* YKUTI708, *E. coli* YKUTI707, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella* serovar *Newport*, *Shigella sp.* clone *CAN 067R* y *Shigella sp.* strain *WHQ-9*.

- 4) La actividad antimicrobiana del extracto etanólico de propóleo (al 20%) mediante la prueba de concentración mínima inhibitoria, se presentó a partir los 600 µg/ml de EEP para las especies: *E. coli*, *Salmonella spp* y *Shigella spp*, mientras que para *Yersinia spp* la concentración necesaria se ubicó a partir de 800 µg/ml de propóleo activo. A través del método de difusión en agar, se pudo determinar que la actividad inhibidora del EEP sobre el crecimiento para *E coli* únicamente, sin afectar en forma alguna a las demás bacterias.
- 5) El EEP potenció el efecto de exclusión competitiva, pues causó mejor reacción a las infecciones controladas de bacterias patógenas (*E. coli*), consiguiendo un menor crecimiento y prevalencia de esta especie bacteriana en el tracto intestinal. Por el contrario, el EEP predispuso el ambiente para el crecimiento de bacterias benéficas (representadas por *L. acidophilus*), lo que causó mejor desempeño en la protección inmunitaria del aparato gastrointestinal, menor daño por proceso inflamatorio causado por bacterias patógenas y mejores resultados en los índices productivos
- 6) Se determinó que el EEP causó mayor longitud de las vellosidades intestinales, corroborando la correlación significativa, que guarda la longitud de vellosidades con el tamaño de la bursa y la cantidad de UFC/ml de *Lactobacillus* en el intestino delgado. Estos incrementos aumentan la superficie de absorción, y mejoran la respuesta de bienestar de las aves, mejorando los parámetros productivos de los pollos y la inocuidad de la carne.
- 7) Mediante el empleo de EEP, se consiguieron resultados productivos similares a los provocados por el uso de promotores de crecimiento convencionales (bacitracina de cinc). Por lo tanto, se puede emplear como mejorador de crecimiento, obteniendo los beneficios del empleo de productos naturales y la supresión de promotores del crecimiento tradicionales basados en antimicrobianos farmacéuticos, utilizados durante muchas décadas en la industria avícola, y que han causado inconvenientes en la salud pública.

- 8) El EEP produjo un mejor desarrollo de los órganos inmunitarios primarios (bolsa de Fabricio y timo), así como una mejor integridad intestinal, ratificando que el propóleo es un importante agente natural con potencial estimulante del sistema inmunitario en las aves.
- 9) Pudo comprobarse la importante acción prebiótica del propóleo en la fisiología digestiva de las aves de corral, propiciando un mejor ambiente para el desarrollo óptimo del microbiota intestinal. Además, pudo evidenciarse la sinergia con probióticos comerciales (*L. acidophilus*, *L. rhamonosus* y *E. faecium*). Esta simbiosis mejoró el rendimiento productivo de los pollos de forma segura, pues no hay riesgo de resistencia o contaminación del producto apícola en la dieta de los animales.



6. BIBLIOGRAFÍA

Aarestrup FM, Bager F, Jensen NE, Madsen M, Meyling A, Wegener HC. (1998) Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark. APMIS. doi: 10.1111/j.1699-0463.1998.tb01391.x. PMID: 9725794.

Abbas, A. (2014). Effect of dietary supplementation with differing levels of propolis on productivity and blood parameters in broiler chicks. Basrah Journal of Veterinary Research, 13(2), 164-180.

Abbas, A. O., Alaquil, A. A., El-Beltagi, H. S., El-Atty, H. K., Kamel, N. N. (2020). Modulating laying hen productivity and immune performance in response to oxidative stress induced by *Escherichia coli* challenge using dietary propolis supplementation. Antioxidants, 9, 0893.

Abdelqader, A. (2014). Effects of dietary *Bacillus subtilis* on heat-stressed broilers performance, intestinal morphology and microflora composition Effects of dietary *Bacillus subtilis* on heat-stressed broilers performance, intestinal morphology and microflora composition. Animal Feed Science and Technology, 198, 279-285.

Abdel-Mohsein, H. S., Mahmoud, M. A. M., Mahmoud, U. T. (2014). Influence of propolis on intestinal microflora of Ross broilers exposed to hot environment. Advances in Animal and Veterinary Sciences, 2(4), 204-211.

Abdou, R. M., Zhu, L., Baker, R. D., Baker, S. S. (2016). Gut microbiota of nonalcoholic fatty liver disease. Digestive Diseases and Sciences, 61, 1268-1281.

Abdulrahim, S. M. (1999) Effect of *Lactobacillus acidophilus* and zinc bacitracin as dietary additives for broiler chickens, *British Poultry Science*, 40,1, 91-94.

Abreu Rodriguez, R. (2016). Prevalencia de Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), en exudados rectales de pollos de engorde en granjas avícolas en la isla de Tenerife, España. Tesis doctoral. Universidad de La Laguna, Tenerife, España.

Afrasibai, S., Pourhajibagher, M., Chiniforush, N., Bahador, A. (2020). Propolis nanoparticle enhances the potency of antimicrobial photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* in a synergistic manner. *Scientific Reports*, 10(1), 15560.

Agra da Silva, R., Evangelista Rodrigues, A., Cristina Marcucci Ribeiro, M., Ramalho Custódio, Â., Estefânia Domingues Andrade, N., Esfrain Pereira, W. (2006). Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. *Ciência Rural*, 36(6), 1842-1848.

Agrocalidad. (2013). Guía de buenas prácticas avícolas. Disponible en: <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu165859.pdf> consultado 20.01.2020

Agrocalidad. (2016). Planteles avícolas funcionales. Reporte -matriz de registro, 1. (A. d. sanitaria, Ed.) Ibarra, Imbabura, Ecuador.

Agrocalidad. (2018a). Matriz de inspecciones apícolas de la provincia de Imbabura. 1-2. (A. d. sanitaria, Ed.) Ibarra, Imbabura, Ecuador.

Agrocalidad. (2018b). PNSA01 – Explotaciones avícolas. Matriz de registro, 1. (A. d. sanitaria, Ed.) Ibarra, Imbabura, Ecuador.

Al-Ani, I., Zimmermann, S., Reichling, J., Wink, M. (2018). Antimicrobial activities of European propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics. *Medicines*, 5(1), 2.

Alcocer, I., De Oliveira, K. M. P., Vidotto, M. C., De Oliveira, T. C. R. M. (2006). Discriminação de serovares de *Salmonella* spp. isolados de carcaças de frango por REP e ERIC-PCR e fagotipagem do sorovar enteritidis. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 26(2), 414-420.

Al-Fatah, M.A. (2020). Probiotic modes of action and its effect on biochemical parameters and growth performance in poultry. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 10(1), 9-15.

Ali, A., Wei, Y. Z., Mustafa, M. A. (2015). Exploiting propolis as an antimicrobial edible coating to control post-harvest anthracnose of bell pepper. *Packaging Technology and Science*, 28, 173-179.

Alimohamadi, K., Taherpour, K., Ghasemi, H. A., Fatahnia, F. (2014). Comparative effects of using black seed (*Nigella sativa*), cumin seed (*Cuminum cyminum*), probiotic or prebiotic on growth performance, blood hematology and serum biochemistry of broiler chicks. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 98, 538-546.

Ahmed, S. T., Islam, M. M., Mun, H. S., Sim, H. J., Kim, Y. J., Yang, C. J. (2014). Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* as a probiotic strain on growth performance, cecal microflora, and fecal noxious gas emissions of broiler chickens. *Poultry Science*, 93, 1963-1971.

Amarante, J. F., Ribeiro, M. F., Costa, M. M., Menezes, F. G., Silva, T. M. S., Amarante, T. A. B., Gradela, A., Moura, L. M. D. (2019). Chemical composition and antimicrobial activity of two extracts of propolis against isolates of *Staphylococcus* spp. and multiresistant bacterials. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 39(9), 734-743.

Andrade, J. K. S., Denadai, M., de Oliveiraa, C. S. (2017). Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Research International*, 101, 129-138.

Angel, R., Seon, K., Wenting, L., Jimenez, E. (2013). Velocidad de paso y pH intestinal en aves: implementaciones para la digestión y uso de enzimas. Disponible en: http://www.produccion_animal.com.ar/produccion_aves/produccion_a_vicola/0513CA_P_VIIItrad.pdf . Consultado el 03.05.2019.

Angulo Asensio, E. (2013). Fisiología aviar. Edicions de la Universitat de Lleida, Lleida, España.

Anjum, S. I., Ullah, A., Khan, K. A., Attaullah, M., Khan, H., Ail, H., Bashir, M. A., Tahir, M., Ansari, M. J., Ghramn, H. A., Adgaba, N., Dash, C. K. (2019). Composition and functional properties of propolis (bee blue): A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26, 1695-1703.

Apata, D. F. (2008). Growth performance, nutrient digestibility and immune response of broiler chicks fed diets supplemented with a culture of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 1253-1258.

Ardoino, S. M., Toso, R., Toribio, M., Álvarez, H., Mariani, E., Cachau, P., Mancilla, M., Oriani, D. S. (2017). Antimicrobianos como promotores de crecimiento (AGP) en alimentos balanceados para aves: uso, resistencia bacteriana, nuevas alternativas y opciones. *Ciencia Veterinaria*, 19, 50-66.

Armas-Freire, P. I., Trueba, G., Proaño-Bolaños, C., Levy, K., Zhang, L., Marrs, C.F., Cevallos, W., Eisenberg, J. N. (2015). Unexpected distribution of the fluoroquinolone-resistance gene *qnrB* in *Escherichia coli* isolates from different human and poultry origins in Ecuador. *International Microbiology*, 18(2), 85-90.

Arrate, L. (2008). Propoleo, el “antibiótico” natural de la colmena. *Revista Agropesquera*, 85, 56-61.

Arteaga Cadena, V. J., Jáuregui Sierra, D., Mendoza, T. J. (2017). Incidencia de la apitoxina en los órganos linfáticos de pollos broiler. *Avances, Desarrollo y Sustentabilidad Agroambiental en Ecuador y Venezuela* (pp. 190–197). Universidad de Los Andes Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/44851>. Consultado el:12.09.2020.

Arteaga, V., Lamas, A., Regal, P., Vázquez, B., Miranda, J. M., Cepeda, A., Franco, C. M. (2019). Antimicrobial activity of apitoxin from *Apis mellifera* in *Salmonella* enterica strains isolated from poultry and its effects on motility, biofilm formation and gene expression. *Microbial Pathogenesis*, 137, 103771.

Attia, Y. A., Al-Khalaifah, H., Ibrahim, M. S., Al-Hamid, A. E. A., Al-Harthi, M. A., El-Naggar, A. (2017). Blood hematological and biochemical constituents, antioxidant enzymes, immunity and lymphoid organs of broiler chicks supplemented with propolis, bee pollen and mannan oligosaccharides continuously or intermittently. *Poultry Science*, 96(12), 4182-4192.

Aviagen. (2018). Manual de manejo pollos de engorde, ross. Disponible en: http://es.aviagen.com/assets/tech_center/bb_foreign_language_docs/spanish_techdocs/ross-broilerhandbook2018-es.pdf. Consultado el 23.06.2020.

Ávila, E. (2005). Alimentación de las aves. Segunda edición. Editorial Trillas, Culiacán, México.

Azemin, A., Md-Zin, N. B., Mohd-Rodi, M. M., Kim-Chee, A. S., Zakaria, A. J., Mohd, K. S. (2017). Application of metabolite profiling and antioxidant activity in assessing the quality of processed and

unprocessed stingless bee' propolis. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 9(2S), 637-660.

Aziz Mousavi, S. M. A., Hosseini, H. M., Mirhosseini, S. A. (2018). A review of dietary probiotics in poultry. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 5(2), 48-54.

Bai, S. P., Wu, A. M., Ding, X. M., Lei, Y., Bai, J., Zhang, K. Y., Chio, J. S. (2013). Effects of probiotic-supplemented diets on growth performance and intestinal immune characteristics of broiler chickens. *Poultry Science*, 92, 663-670.

Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 114-117.

Bankova, V., Popova, M., Trusheva, B. (2014). Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chemistry Central Journal*, 8, 1-15.

Barrera, A., Barrera, K. (2018). Influencia de tiempos de instalación de pollitos bb sobre título de anticuerpos maternos y morfometría de las vellosidades intestinales. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/29331/3>. Consultado el 25.02.2019.

Bastos, E. M. A. F., Guzmán, D., Figueroa, M. V. J., Scoaris, D. D. O. (2011). Caracterización antimicrobiana y fisicoquímica de la región andina colombiana. *Acta Biológica Colombiana*, 16(1), 175-184.

Beekman, M., Ratnieks, F. L. W. (2000). Long-range foraging by the honey-bee, *Apis mellifera* L. *Functional Ecology*, 14(4), 490-496.

Belluco, S., Barco, L., Roccato, A., Ricci, A. (2016). *Escherichia coli* and Enterobacteriaceae counts on poultry carcasses along the

slaughter line: A systematic review and meta-analysis. *Food Control*, 60, 269-280.

Bernabé, A., Navarro, J., Pallares, F. (2017). Morfología y fisiología del sistema digestivo. Disponible en: <http://ocw.um.es/cc.-de-la-salud/citologiae-histologia-veterinaria/material-de-clase-1/tema25-intestino.pdf>. Consultado el 12.02.2018.

Batancor, L., Pereira, M., Martinez, A., Giossa, G., Fookes, M., Flores, K., Barrios, P., Repiso, V., Vignoli, R., Cordeiro, N., Algorta, G., Thomson, N., Maskell, D., Schelotto, F., Chabalgoity, J.A. (2010). Prevalence of *Salmonella enterica* in poultry and eggs in Uruguay during an epidemic due to *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(7), 2413-2423.

Biri, J. M., Melchor, A. A. (1983). *Cria moderna de las abejas. Manual práctico*. Editorial De Vecchi, Barcelona, España.

Blajman, J. E., Frizzo, L. S., Zbrun, M. V., Astesana, D. M., Fusari, M. L., Soto, L. P., Rosmini, M. R., Signorini, M. L. (2014). Probiotics and broiler growth performance: a meta-analysis of randomized controlled trials. *British Poultry Science*, 55, 483-494.

Blajman, J. E., Zbrun, M. V., Astesana, D. M., Berisvil, A. P., Scharpen, A. R., Fusari, M. L., Soto, L. P., Signorini, M. L., Rosmini, M. R., Frizzo, L. S. (2015). Probióticos en pollos parrilleros: Una estrategia para los modelos productivos intensivos. *Revista Argentina de Microbiología*, 47(4), 360-367.

Booth, N., McDonald, L. (1987). *Farmacología y terapéutica Veterinaria* (Quinta ed., Vol. II). Editorial Acribia, Zaragoza, España.

Boufadi, Y. M., Soubhye, J., Neve, J., van Antwerpen, P., Riazi, A. (2016). Antimicrobial effects of six Algerian propolis extracts. *International Journal of Food Science and Technology*, 51(12), 2613-2620.

Bradbear, N. (2005). La apicultura y los medios de vida sostenibles., Dirección de Sistemas de Apoyo a la Agricultura, FAO, Roma, Italia.

Braykov, N. P., Eisenberg, J. N. S., Ecevedo, Grossman, M., Zhang, L., Vasco, K., Cevallos, W., Muñoz, D., Acevedo, A., Moser, K. A., Marrs, C. F., Foxman, B., Trostle, J., Trueba, G., Levy, K. (2016). Antibiotic resistance in animal and environmental samples associated with small-scale poultry farming in Northwestern Ecuador. *MSphere*, 1, e00021-15.

Brown, M. (2011). Modes of action of probiotics: recent developments. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10, 1895-1900.

Buitrago, L. (2006). Mortalidad en los pollos de engorde. Disponible en: <http://www.engormix.com/avicultura/foros/mortalidad-pollos-engorde-t4698/>. Consultado el 14.07.2019.

Cabrera, J. (2018). La apicultura en el ecuador: antecedentes históricos. Disponible en: <https://docplayer.es/24412764-la-apicultura-en-el-ecuador-antecedentes-historicos-por-jose-cabrera-laboratorios-la-melifera-quito-ecuador.html>. Consultado el 14.07.2019.

Camou, T., Zunino, P. (2020). Alarma por la resistencia a antimicrobianos: situación actual y desafíos. *Revista Médica del Uruguay*, 16, 1-10.

Çandır, E. E., Özdemir, A. E., Soylu, E. M., Sahinler, N., Gül, A. (2009). Effects of propolis on storage of sweet cherry cultivar Aksehir Napolyon. *Asian Journal of Chemistry*, 21, 2659-2666.

Canseco, L. (2012). Amenazas para la integridad intestinal de las aves. Disponible en: <http://www.elsitioavicola.com/articles/2261/amenazas-para-la-integridad-intestinal-de-las-aves/>. Consultado el 14.07.2019.

Cao, G. T., Zeng, X. F., Chen, A. G., Zhou, L., Zhang, L., Xiao, Y. P., Yang, C. M. (2013). Effects of a probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and cecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. *Poultry Science*, 92(11), 2949-2955.

Cápita, R., Alonso-Calleja, C., Prieto, M., García-Fernández, M. C., Moreno, B. (2002). Incidence and pathogenicity of *Yersinia* spp. isolates from poultry in Spain. *Food Microbiology*, 19, 295-301.

Carrasco, J. M. D., Casanova, N. A., Fernandez-Miyakawa, M. E. (2019). Microbiota, gut health and chicken productivity: What is the connection? *Microorganisms*, 7(10), 1-15.

Casart, Y., Martínez, A. N. D., Falconí, M., Koch, A., Proaño-Perez, F., Santiana, I. (2018). *Salmonella* prevalence in poultry farms of Ecuador and serotype identification based on multiplex PCR systems. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Zulia*, 28(3), 227-234.

Catchpole, O., Mitchell, K., Bloor, S., Davis, P., Suddes, A. (2015). Antiproliferative activity of New Zealand propolis and phenolic compounds vs human colorectal adenocarcinoma cells. *Fitoterapia*, 106, 167-174.

Cavaliere, S. J., Rankin, I. D., Harbeck, R. J., Sautter, R. L., McCarter, Y. S., Sharp, S. E., Ortez, J. H., Spiegel, C. A. (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. American Society for Microbiology. Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf> Consultado el: 13.03.2020.

Cervantes, H. (2013). El uso de antibióticos en la producción avícola: pasado, presente y futuro. *El Sitio Avícola*, 1-5. Disponible en: <http://www.elsitioavicola.com/articles/2301/el-uso-de-antibioticos-en->

la-produccion-avacola-pasado-presente-y-futuro. Consultado el 25.09.2020

Cervantes, M. (2010). Principales fundamentos de exclusión competitiva. Disponible en: http://www.bayersanidadanimal.com.mx/index.php?art_id=30&categ=25&expand=2/24/25&file=view_article.tp. Consultado el 14.07.2019.

Chaillou, L. L., Herrera, H. A., Maidana, J. F. (2004). Estudio del propoleo de Santiago del Estero, Argentina. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 24(1), 11-15.

Chegini, S., Kiani, A., Rokni, H. (2018). Alleviation of thermal and overcrowding stress in finishing broilers by dietary propolis supplementation. *Italian Journal of Animal Science*, 17(2), 377-385.

Cheng, G., Hao, H., Xie, S., Wang, X., Dai, M., Huang, L., Yuan, Z. (2014). Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? *Frontiers in Microbiology*, 5, 217.

Ciorba, M. A. (2012). A gastroenterologist's guide to probiotics. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 10(9), 960-968.

Climate data. (2016). Obtenido de Climate data. Disponible en: <https://es.climate-data.org/location/2964/>. Consultado el 14.07.2019.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2007). Document M100-S17. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

Cobb. (2019). Pollo de engorde, Guía de manejo. Disponible en: https://www.cobb-vantress.com/assets/Cobb-Files/ec35b0ab1e/Broiler-Guide-2019-ESP-WEB_2.22.2019.pdf. Consultado el 03.04.2020.

Corporación Nacional de Avicultores del Ecuador (CONAVE) (2016). Consultado en: Estadísticas avícolas. 24. Disponible en: http://amevea-ecuador.org/web_antigua/datos/AMEVEA_2015___ING._JOSE_OR_ELLANA.PDF. Consultado 10.04.2018.

Corporación Nacional de Avicultores del Ecuador (CONAVE) (2020). Disponible en: <https://www.conave.org/informacion-sector-avicola-publico>. Consultado el 10.07.2020.

Cosby, D. E., Cox, N. A., Harrison, M. A., Wilson, J. L., Buhr, R. J., Fedorka-Cray, P. J. (2015) *Salmonella* and antimicrobial resistance in broilers: A review: Journal of Applied Poultry Research, 24, 408-426.

Cox, C. M., Dalloul, R. A. (2015). Immunomodulatory role of probiotics in poultry and potential in novo application. Beneficial Microbes, 6, 45-52.

Crecencio, R. B., Brisola, M. C., Bitner, D., Frigo, A., Rampazzo, L., Borges, K. A., Furian, T. Q., Salle, C. T. P., Moraes, H. L. S., Faria, G. A., Da Silva, A. S., Stefani, L. M. (2020). Antimicrobial susceptibility, biofilm formation and genetic profiles of *Escherichia coli* from retail chicken meat. Infection, Genetics and Evolution, 84, 104355.

Cruzado, M., Pastor, A., Castro, N., Cedrón, J. C. (2013). Determinación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de extractos de alcachofa (*Cynara scolymus* L.). Revista de la Sociedad Química del Perú, 79(1), 2013.

Cuesta-Rubio, O., Campo Fernández, M., Hernández, I. M., Jaramillo Jaramillo, C. G., González, V. H., Montes de Oca Porto, R., Marrero Delange, D., Monzote Fidalgo, L., Piccinelli, A. L., Campone, L., Rastrelli, L. (2017). Chemical profile and anti-leishmanial activity

of three Ecuadorian propolis samples from Quito, Guayaquil and Cotacachi regions. *Fitoterapia*, 120, 177-183.

Cunningham, J. G. (2014). *Fisiología Veterinaria* (Quinta ed.). Elsevier, Barcelona, España.

Daneshmand, A., Sadeghi, G. H., Karimi, A., Vaziry, A., Ibrahim, S. A. (2015). Evaluating complementary effects of ethanol extract of propolis with the probiotics on growth performance, immune response and serum metabolites in male broiler chickens. *Livestock Science*, 178, 195-201.

De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M. J., Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las Plantas útiles del Ecuador*. Editorial Aarhus, Quito, Ecuador.

De Souza, L. F. A., Araújo, D. N., Stefani, L. M., Giometti, I. C., Cruz-Polycarpo, V. C., Polycarpo, G., Burbarelli, M. F. (2018). Probiotics on performance, intestinal morphology and carcass characteristics of broiler chickens raised with lower or higher environmental challenge. *Austral Journal of Veterinary Sciences*, 50(1), 35-41.

Devequi-Nunes, D., Machado, B. A. S., De Abreu Barreto, G., Silva, J. R., Da Silva, D. F., Da Rocha, J. L. C., Brandão, H. N., Borges, V. M., Umsza-Guez, M. A. (2018). Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *PLoS One*, 13(12), e0207676.

Donado-Godoy, P., Gardner, I., Byrne, B. A., Leon, M., Perez-Gutierrez, E., Ovalle, M. V., Tafur, M. A., Miller, W. (2012). Prevalence, risk factors, and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* from commercial broiler farms in two important poultry-producing regions of Colombia. *Journal of Food protection*, 75(5), 874-883.

Duman, M., Özpolat, E. (2015). Effects of water extract of propolis on fresh shibuta (*Barbus grypus*) fillets during chilled storage. Food Chemistry, 189, 80-85.

El sitio avícola. (2016). Tendencias avícolas 2016. Disponible en: <https://elsitioavicola.com/articulos/2866/tendencias-avacolas-mundiales-2016-amarica-representa-el-44-por-ciento-de-la-produccion-mundial-de-pollo/>. Consultado el 10.04.2020.

El telegrafo. (2017). La apicultura ayuda incluso en la producción de cítricos Disponible en: <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/regional/1/la-apicultura-ayuda-incluso-en-la-produccion-de-citricos>. Consultado el 10.04.2020.

Endesfelder, D., Engel, M. & zu Castell, W. (2016). Gut Immunity and Type 1 Diabetes: a Mélange of Microbes, Diet, and Host Interactions?. Curr Diab Rep 16, 60 <https://doi.org/10.1007/s11892-016-0753-3>

Ensminger, M. (1983). Alimentos y nutrición de los animales. Editorial Clovis, Boca Ratón, CA, USA.

Espinosa, M. (2017). Sistema de buenas prácticas avícolas como estrategia de productividad y competitividad en Ibarra POR. En: Avances, desarrollo y sustentabilidad agroambiental en Ecuador y Venezuela. Universidad de Los Andes (ULA) Pontificia Universidad católica del Ecuador.

Espinosa, G., Monserrath. (2021). [@mo.nespinosa]. [Fotografías]. Disponible en <https://www.instagram.com/mo.nespinosa/?hl=es-la> consultado 24.01.2021

Estrada, M. (2011). Anatomía y fisiología aviar. Disponible en: http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/pluginfile.php/247268/mod_resource/content/0/ANATOMIA_Y_FISIOLOGIA_AVIAR_documento_2011.pdf. Consultado el 10.04.2020.

Eyng, C., Murakami, A. E., Pedroso, R. B., Verzignassi Silveira, T. G., Lino Lourenço, D. A., Quiles Marques Garcia, A. F. (2013). Crude propolis as an immunostimulating agent in broiler feed. *Seminario de Ciencias Agrarias*, 34(5), 2511-2522.

Eyng, C., Murakami, A. E., Ospina-Rojas, I. C., Pedroso, R. B., Silveira, T., Lourenço, D. (2015). Effect of diet inclusion of ethanolic extract of propolis on broiler immunity. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 47(2), 185-192.

Farooqui, T., Farooqui, A. (2012). Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases. *Frontiers in Biosciences*, 4, 779-793.

Fijan S. (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(5), 4745-4767.

Foley, S., Nayak, R., Hanning, I. B., Johnson, T. J., Han, J., Ricke, S. C. (2011). Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 4273-4279.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Disponible en: <http://www.fao.org/es/ESN/Probio/probio.htm>. Consultado el 22.06.2020.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2017). Resistencia a los antimicrobianos: lo que necesitas saber. FAO,

1-9. Disponible en: <http://www.fao.org/faostories/article/es/c/1062439/>. Consultado el 22.06.2020.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2018). Gateway to poultry production and products. Disponible en: <http://www.fao.org/poultry-production-products/en/>. Consultado el 10.06.2020.

Food and Drug Administration (FDA). (2020). Bacteriological analytical Manual (Fifth edition). Disponible en: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bacteriological-analytical-manual-bam#intro>. Consultado el 10.06.2020.

Fuertes Romo, D. (2017). Estudio de la Producción y comercialización en la cadena productiva apícola en la provincia de Imbabura. Tesis de pregrado. Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador

Funari, C. S., Ferro, V. O. (2006). Análise de própolis. *Ciência e Tecnologia Alimentaria Campinas*, 26(1), 171-178.

Gadde, U., Kim, W. H., Oh, S. T., Lillehoj, H. S. (2017). Alternatives to antibiotics for maximizing growth performance and feed efficiency in poultry: a review. *Animal Health Research Reviews*, 18(1), 26-45.

Gargouri, W., Osés, S. M., Fernández-Muiño, M. A., sancho, M. T., Kechaou, N. (2019). Evaluation of bioactive compounds and biological activities of Tunisian propolis. *LWT-Food Science and Technology*, 111, 328-336.

Gauthier, R. (2015). La salud intestinal: Clave de la productividad - El caso de los ácidos orgánicos. *Engormix-Avicultura*, 6, 64-69. Memorias del 2^{do} precongreso científico avícola iasa. xxvii convención aneca-wpdc. 30 de abril. Puerto Vallarta, Jalisco, México, 1-13. Disponible en : <https://www.engormix.com/avicultura/articulos/salud->

intestinal-clave-productividad-t26193.htm. Consultado el 10.03.2020.

Gheisari, A., Shahrivand, S., Landy, N. (2017). Effect of ethanolic extract of propolis as an alternative to antibiotics as a growth promoter of broiler performance, serum biochemistry, and immune responses. *Veterinary World*, 10(2), 249-254.

Gibert, M. (2014). Colibacilosis en avicultura: Situación actual. Disponible en: http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/colibacilosis_en_avicultura_-_magdalena_gibert.pdf. Consultado el 15.03.2018.

Gil, M., Perelli, A., Alvarado, R., Arias, Y., Blumenthal, E. (2012). Bacteriostatic and bactericidal activity of propolis tincture on enteropathogenic bacteria. *Salus*, 16(3), 29-37.

Gobierno Autónomo Descentralizado de Imbabura (GAD). (2016). Actualización del plan de desarrollo y ordenamiento territorial, provincia de Imbabura. Disponible en: http://app.sni.gob.ec/snmlink/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdocumentofinal/1060000180001_PDOT%20IMBABURA%202015-2035_SIGAD_15-08-2015_22-50-42.pdf. Consultado el 10.04.2020.

Gobierno Autónomo Descentralizado de Imbabura (GAD). (2018). Actualización del plan de desarrollo y ordenamiento territorial, provincia de Imbabura. Disponible en: http://app.sni.gob.ec/snmlink/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdocumentofinal/1060000180001_PDOT%20IMBABURA%202015-2035_SIGAD_15-08-2015_22-50-42.pdf. Consultado el 10.04.2020.

Gómez-Duarte, O. G. (2014). Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* enteropatógenas en Colombia. *Revista Chilena de Infectología*, 31(5), 577-586.

Granados, J. (2008). Factores que influyen en la integridad intestinal del Broiler. Memorias en extenso del Seminario AMEVEA, Quito, Ecuador, 224.

Granda Ojeda, R. E. (2017). Análisis del potencial de la actividad apícola como desarrollado socioeconómico en sectores rurales. Universidad San Francisco de Quito, Ecuador. Disponible en: <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/7106/1/135301.pdf>. Consultado el 07.06.2020.

Grosso, G. S., Principal, J. (2007). Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Tropical*, 25(2), 95-102.

Guerra, F., Espinosa, M., Arteaga, V., Mafla Andrade, S. (2018). acción de la apitoxina en la biosíntesis de cortisol y su efecto en el comportamiento productivo de pollos broiler. *Redvet*, 19, 1-11.

Guerrini, A., Bruni, R., Maietti, S., Poli, F., Rossi, D., Paganetto, G., Muzzoli, M., Scalvenzi, L., Sacchetti, G. (2009). Ecuatorian stingless bee (*Meliponinae*) Honey: A chemical and functional profile or fan ancient health product. *Food Chemistry*, 114(4), 1413-1420.

Gutiérrez-Castillo, A. C., Paasch Martinez, L. H., Calderón Apodaca, N. L. (2008). Salmonelosis y campilobacteriosis, las zoonosis emergentes de mayor expansión en el mundo. *Veterinaria México*, 39(1), 81-90.

Haghighian Roudsari, M., Mehdizadeh-Taklimi, S. M., Bagherzadeh-Kasmani, F., Lotfelahian, H., Mosavi, F., Abolghasemi, A. H. (2010). Effects of different levels of oil-extracted propolis on immune system of broiler chicks against Newcastle virus. *Journal of Veterinary Research*, 65(1), 19-24.

Han, W., Zhang, X. L., Wang, D. W., Li, L. Y., Liu, G. L., Zhao, Y. X. (2013). Effects of microencapsulated *Enterococcus faecalis*

CG1.0007 on growth performance, antioxidation activity, and intestinal microbiota in broiler chickens. *Journal of Animal Science*, 91, 4374-4382.

Harfouch, R. M., Mohammad, R., Suliman, H. (2016). Antibacterial activity of syrian propolis extract against several strains of bacteria in vitro. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(2), 42-46.

Hassan Rasha. I.M., & El-wahab Hala. Abd. (2018). Effect of Feeding Propolis on Growth Performance of Broilers. *Journal of Advanced Veterinary Research*, 8(Issue 3 (2018) 66-72), 66–72. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/296864531_The_effects_of_propolis_supplementation_on_broiler_performance_and_feed_digestibility Consultado el: 02.05.2020.

Hascik, P., Trembecká, L., Bobko, M., Čuboň, J., Kačániová, M., & Tkáčová, J. (2016). El perfil de aminoácidos de la carne de pollo de engorde después de polen de abejas y propóleos suplementación dietetic. *Journal of Apicultural Research*, 55(4), 324–334. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1245398>

Hascik, P., Pavelková, A., Arpasová, H., Cubon, J., Kacaniova, M., Kunová, S. (2019). The effect of bee products and probiotic on meat performance of broiler chickens. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(1), 88-92.

Hedman, H. D., Eisenberg, J. N. S., Vasco, K. A., Blair, C. N., Trueba, G., Berrocal, V. J., Zhang, L. (2019). High prevalence of extended-spectrum beta-lactamase ctx-m-producing *Escherichia coli* in small-scale poultry farming in rural Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(2), 374-376.

Hellberg, R. S., Haney, C. J., Shen, Y., Cheng, C. M., Williams-Hill, D. M., Martin, W. B. (2012). Development of a custom 16S rRNA

gene library for the identification and molecular subtyping of *Salmonella enterica*. Journal of Microbiological Methods, 91(3), 448-458.

Hernández Ayala, E. G., Rocha Ruiz, J. R. (2007). Medicina veterinaria y zootecnia manual de prácticas de producción apícola. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México. Disponible en: <https://demielesyabejas.com/wp-content/uploads/2018/10/Manualdepracticass7-1506.pdf>. Consultado el 14.09.2020.

Hernández Sampieri, R. (2014). Metodología de la investigación. Sexta edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana, México DF, México.

Hosseini, S. M., Azghandi, M. V., Ahan, S., Nourmohammadi, R. (2016). Effect of bee pollen and propolis (bee glue) on growth performance and biomarkers of heat stress in broiler chickens reared under high ambient temperature. Journal of Animal and Feed Sciences, 25, 45-51.

Hughes, D. A. (1999). Effects of dietary antioxidants on the immune function of middle-aged adults. Proceedings of the Nutrition Society, 58(1), 79-84.

Hu, Y., Matsui, Y., Riley, W. (2020). Risk factors for fecal carriage of drug-resistant *Escherichia coli*: A systematic review and meta-analysis. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 9(1), 31.

Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC). (2010). Resultados del Censo de población y vivienda 2010, Fascículo Imbabura. Disponible en:

https://www.ecuadorencifras.gob.ec/wp-content/descargas/Libros/Memorias/memorias_censo_2010.pdf
Consultado el 14.05.2018

Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC). (2012). Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC 2012. Disponible en: <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/wp-content/descargas/Presentaciones/PRESENTACION-Espac.pdf>. Consultado el 14.09.2019.

Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC). (2016). Nacimientos y Defunciones Generales 2016. Disponible en: <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-de-nacimientos-y-defunciones-2016/> Consultado el 14.08.2020

Jeong, J. S., Kim, I. H. (2014). Effect of *Bacillus subtilis* C-3102 spores as a probiotic feed supplement on growth performance, noxious gas emission, and intestinal microflora in broilers. *Poultry Science*, 93, 3097-3103.

Kabir, S. M. L. (2009). The role of probiotics in the poultry industry. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 3531-3546.

Kacaniova, M., Rovna, K., Arpasova, H., Cubon, J., Hleba, L., Pochop, J., Kunova, S., Hascik, P. (2012). *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of propolis on the microbiota from gastrointestinal tract of chickens. *Journal of Environmental Science and Health*, 47(11), 1665-1671.

Kamel, E. R., & Mohamed, L. S. (2016). Effect of Dietary Supplementation of Probiotics, Prebiotics, Synbiotics, Organic Acids and Enzymes on Productive and Economic Efficiency of Broiler Chicks. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 50(1), 8-17. <https://doi.org/10.5455/ajvs.231428>

Khan, S. H. (2017). Recent advances in role of propolis as natural additive in poultry nutrition. *Journal of Apicultural Science*, 61(2), 167-183.

Kalavathy, R., Abdullah, N., Jalaludin, S., Ho, Y. W. (2003). Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. *British Poultry Science*, 44, 139-144.

Kalia, P., Kumar, N. R., Harjai, K. (2016). Studies on the therapeutic effect of propolis along with standard antibacterial drugs in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infected BALB/c mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 485.

Kalia, P., Kumar, N.R., Harjai, K. (2017). Synergistic Effect of propolis with cefixime against *Salmonella enterica* serovar typhimurium: An in vitro study. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 8(2), 140-145.

Kasiotis, K. M., Anastasiadou, P., Papadopoulos, A., Machera, K. (2017). Revisiting Greek propolis: Chromatographic analysis and antioxidant activity study. *Plos One*, 12, e0170077.

Kers, J. G., Velkers, F. C., Fischer, E. A. J., Hermes, G. D. A., Stegeman, J. A., Smidt, H. (2018). Host and environmental factors affecting the intestinal microbiota in chickens. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-14.

Kessel, A. S., Gillespie, I. A., O'Brien, S. J., Adak, G. K., Ward, L. R. (2001). General outbreaks of infectious intestinal disease linked with poultry, England and Wales, 1992-1999. *Communicable Disease and Public Health*, 4(3), 171-177.

Khan, S. H. (2017). Recent advances in role of propolis as natural additive in poultry nutrition. *Journal of Apicultural Science*, 61(2), 167-183.

Khan, S., Singh, P., Ansari, M., Asthana, A. (2014). Isolation of *Shigella* species and their resistance patterns to a panel of fifteen

antibiotics in mid and far western region of Nepal. *Asian-Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(1), 30-34.

Khojasteh Shalmany, S., Shivazad, M. (2006). The effect of diet propolis supplementation on Ross broiler chicks performance. *International Journal of Poultry Science*, 5(1682–8356), 84-88.

Kieny, M. (2017). La oms publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Consultado el 11.08.2020.

Kim, J. S., Ingale, S. L., Kim, Y. W., Kim, K. H., Sen, S., Ryu, M. H., Lohakare, J. D., Kwon, I. K., Chae, B. J. (2012). Effect of supplementation of multi-microbe probiotic product on growth performance, apparent digestibility, cecal microbiota and small intestinal morphology of broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96, 618-626.

Kismet, K., Ozcan, C., Kuru, S., Gencay Celemli, O., Celepli, P., Senes, M., (2017). Does propolis have any effect on non-alcoholic fatty liver disease? *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 90, 863-871.

Klaric, I., Pavic, M., Miskulin, I., Blazicevic, V., Dumic, A., Miskulin, M. (2018). Influence of dietary supplementation of propolis and bee pollen on liver pathology in broiler chickens. *Animals*, 8(4), 54.

Kleczek, K., Wilkiewicz-Wawro, K., Makowski, W., Murawska, D., Wawro, M. (2014). The effect of dietary propolis supplementation on the growth performance of broiler chickens. *Polish Journal of Natural Sciences*, 29(2), 105-117.

Kuropatnicki, A. K., Szliszka, E., Krol, W. (2013). Historical aspects of propolis research in modern times. Evidence-Based Complementary Alternative Medicine, 2013, 964149.

Lacalle, A. (2008). Propoleo, el “antibiótico” natural de la colmena. Revista Agropesquera, 85, 56-61.

Lamas, A., Fernandez-No, I. C., Miranda, J. M., Vázquez, B., Cepeda, A., Franco, C. M. (2016). Prevalence, molecular characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars isolated from northwestern Spanish broiler flocks (2011-2015). Poultry Science, 95(9), 2097-2105.

Lamas, A., Miranda, J. M., Regal, P., Vázquez, B., Franco, C. M., Cepeda, A. (2018a). A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. Microbiological Research, 206, 60-73.

Lamas, A., Paz-Mendez, A. M., Regal, P., Vazquez, B., Miranda, J. M., Cepeda, A., Franco, C. M. (2018b). Food preservatives influence biofilm formation, gene expression and small RNAs in *Salmonella enterica*. LWT-Food Science and Technology, 97, 1-8.

Lamas, A., Regal, P., Vázquez, B., Miranda, J. M., Cepeda, A., Franco, C. M. (2018c). *Salmonella* and *Campylobacter* biofilm formation: a comparative assessment from farm to fork. Journal of the Science of Food and Agriculture, 98(11), 4014-4032.

La Ragione, R., Narbad, A., Gasson, M., Woodward, M. (2004). *In vivo* characterization of *Lactobacillus johnsonii* FI9785 for use as a defined competitive exclusion agent against bacterial pathogens in poultry. Letters in Applied Microbiology, 38, 197-205.

Lazzari, G., Pagani, J. L. (1999). Dimorfismo sexual en el crecimiento muscular y óseo. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, 19(1), 75-79.

Lee, K. W., Lee, S. H., Lillehoj, H. S., Li, G. X., Jang, S. I., Babu, U. S., Park, M. S., Kim, D. K., Lillehoj, E. P., Neumann, A. P., Rehberger, T. G., Siragusa, G. R. (2010). Effects of direct-fed microbials on growth performance, gut morphometry, and immune characteristics in broiler chickens. *Poultry Science*, 89, 203- 216.

Lee, K. W., Li, G., Lillehoj, H. S., Lee, S. H., Jang, S. I., Babu, U. S., Lillehoj, E. P., Neumann, A. P., Siragusa, G. R. (2011). *Bacillus subtilis*-based direct-fed microbials augment macrophage function in broiler chickens. *Research in Veterinary Science* 91, e87-e91.

Liao, X. D., Ma, G., Cai, J., Fu, Y., Yan, X. Y., Wei, X. B., Zhang, R. J. (2015). Effects of *Clostridium butyricum* on growth performance, antioxidation, and immune function of broilers. *Poultry Science*, 94, 662-667.

Líderes. (2018). la apicultura se mueve con tres ejes estratégicos en ecuador. Disponible en: <https://www.revistalideres.ec/lideres/apicultura-miel-abejas-ministerio-agricultura.html>. Consultado el 02.10.2020.

Liu, X., Yan, H., Lv, L., Xu, Q., Yin, C., Zhang, K., Wang, P., Hu, J. (2012). Growth performance and meat quality of broiler chickens supplemented with *Bacillus licheniformis* in drinking water. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 25, 682-689.

López-Santamarina, A., Miranda, J. M., Mondragon, A. C., Lamas, A., Cardelle-Cobas, A., Franco, C. M., Cepeda, A. (2020). Potential use of marine seaweeds as prebiotics: A review. *Molecules*, 25(4), 1004.

López, B. G. C., Schmidt, E. M., Eberlin, M. N., Sawaya, A. C. H. F. (2014). Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chemistry*, 146, 174-180.

López Tevez, L., & Torres, C. (2006). Determinación de la actividad antimicrobiana.

Machado, B., Pulcino, T. N., Silva, A. L., Tadeu, D., Melo, R. G. S., Mendonça, I. G. (2017). Propolis as an alternative in prevention and control of dental cavity. *Immunity*, 19, 24.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. (2009). *Biología de los microorganismos*, Brock (décima edición). Editorial Pearson, Madrid, España.

Ministerio de Agricultura y Ganadería MAG. (2016). La política agropecuaria ecuatoriana. Hacia el desarrollo territorial rural sostenible 2015-2025. In Ministerio de Agricultura y Ganadería (Issue 44). Disponible en: <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu183434.pdf>. Consultado el 11.10.2020.

Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). (2020). Apicultura en Ecuador. Disponible en: <https://www.agricultura.gob.ec/ecuador-tiene-1760-apicultores-registrados/#:~:text=Quito%2C 6 de julio de,%2C polen%2C propóleo y cera>. Consultado el: 12.09.2020

Mahmoud, S. V. L. (2006). Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian-Pacific Journal of Cancer Prevention*, 7, 22-31.

Mahmoud, U. T., Amen, O. A., Applegate, T. J., Cheng, H. W. (2017). Brazilian propolis effects on growth, productivity performance, gut characteristics and physiological changes in broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*, 16(5), 169-179.

Mahmoud, U. T., Cheng, H. W., Applegate, T. J. (2016). Functions of propolis as a natural feed additive in poultry. *World's Poultry Science Journal*, 72, 37-47.

Manzano, C., Estupiñán, D., Poveda, E. (2012). Efectos clínicos de los probióticos: Qué dice la evidencia. *Revista Chilena de Nutricion*, 39(1), 98-110.

Martínez, J., Gil, J., García, C., & Durango, D. (2009). Caracterización físico-química y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño. Universidad Nacional De Colombia Sede Medellín Facultad De Ciencias Agropecuarias, Tesis de M.

Martínez, J. G., Garcia, C. P., Durango, D. R., Gil, J. G. (2012). Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección. Revista MVZ Cordoba, 17(1), 2861-2869.

Martin, M. P., Pileggi, R. (2004). A quantitative analysis of Propolis: a promising new storage media following avulsion. Dental Traumatology, 20, 85-89.

Martinotti, S., Ranzato, E. (2015). Propolis: a new frontier for wound healing? Burns Trauma, 3, 9-18.

Megías, M., Molist, P., Pombal, M. (2016). Atlas de histología vegetal y animal órganos animales. Disponible en: <http://webs.uvigo.es/mmegias/inicio.html>. Consultado el 03.04.2019.

Mendizábal, F. M. (2005). Abejas- Manuales esenciales. Editorial Albatros, Santiago del Estero, Argentina.

Milojković-Opsenica, D., Ristivojević, P., Trifković, J., Vovk, I., Lušić, D., Tešić, Z. (2016). TLC Fingerprinting and pattern recognition methods in the assessment of authenticity of poplar-type propolis. Journal of Chromatographic Science, 54(7), 1077-1083.

Miranda, J. M., Vázquez, B. I., Fente, C. A., Barros-Velázquez, J. B., Cepeda, A., Franco, C. M. (2008). Evolution of resistance in poultry intestinal *Escherichia coli* during three commonly used antimicrobial therapeutic treatments in poultry. Poultry Science, 87(8), 1643-1648.

Momtaz, H., Rahimian, M. D., Dehkordi, F. S. (2013). Identification and characterization of *Yersinia enterocolitica* isolated from raw chicken meat based on molecular and biological techniques. *Journal of Applied Poultry Research*, 22(1), 137-145.

Mookiah, S., Sieo, C. C., Ramasamy, K., Abdullah, N., Ho, Y. W. (2014). Effects of dietary prebiotics, probiotic and synbiotics on performance, caecal bacterial populations and caecal fermentation concentrations of broiler chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 341-348.

Mora, A., Viso, S., López, C., Alonso, M. P., García-Garrote, F., Dabhi, G., Mamani, R., Herrera, A., Marzoa, J., Blanco, M., Moullin-Schouleur, M., Schouler, C., Blanco, J. (2013). Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45: K1:H7-B2-ST95 in humans. *Veterinary Microbiology*, 167(3-4), 506-512.

Moser, K. A., Zhang, L., Spicknall, I., Braykov, N. P., Levy, K., Mars, C. F., Foxman, B., Trueba, G., Cevallos, W., Goldstick, J., Trostle, J., Eisenberg, J. N. S. (2018). The role of mobile genetic elements in the spread of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from chickens to humans in small-scale production poultry operations in rural Ecuador. *American Journal of Epidemiology*, 187(3), 558-567.

Mottet, A., Tempio, G. (2017). Global poultry production: Current state and future outlook and challenges. *World's Poultry Science*, 73(2), 245-256.

Muñoz Rodríguez, L., Linares Villalba, S., Narváez Solarte, W. (2011). Propiedades del Propóleo como aditivo natural funcional en la nutrición animal. *Biosalud*, 2, 101-111..

Muñoz, Z. (2004). Acidificantes, fitasas y sus interacciones en la alimentación de cerdos y pollos. *Anaporc*, 23(232), 34-65.

Nakphaichit, M., Thanomwongwattana, S., Phraephaisarn, C., Sakamoto, N., Keawsompong, S., Nakayama, J., Nitisinprasert, S. (2011). The effect of including *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 during post-hatch feeding on the growth and ileum microbiota of broiler chickens. *Poultry Science*, 90, 2753-2765.

Ng S. C., Hart A. L., Kamm M. A., Stagg A. J., Knight S. C. (2009). Mechanisms of action of probiotics: Recent advances. *Inflammatory Bowel Disease*, 15, 300-310.

Noriega, V. (2014). El propóleo, otro recurso terapéutico en la práctica clínica. adaptación al grado, 1-28. Disponible en: <https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/5580/NoriegaSalmonV.pdf>. Consultado el 08.07.2020.

North Mack, B. D. (1990). *Comercial chicken production manual* (Fourth edition). Editorial Chapman-Hall, Riverside, EEUU.

Nüesch-Inderbilen, M., Heini, N., Zurfluh, K., Althaus, D., Hächler, H., Stephan, R. (2017). *Shigella* antimicrobial drug resistance mechanisms, 2004-2014. *Emerging Infectious Diseases*, 22(6), 1083-1085.

Omara, S. T., Zawrah, M. F., Samy, A. A. (2017). Minimum bactericidal concentration of chemical synthesized silver nanoparticles against pathogenic *Salmonella* and *Shigella* strains isolated from layer poultry farms. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(8), 214-221.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2020). Resistencia a los antimicrobianos. OMS, 1-6. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibioticos#>. Consultado el 23.05.2020.

Ortez, J. H., Rankin, I. D. (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. In: Coyle, M.B. (ed.), manual de

pruebas de susceptibilidad antimicrobiana (p. 242). Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>. Consultado el 12.09.2020.

Palomino, G. L. R., García, P. C. M., Gil, G. J. H., Rojano, B. A., Durango, R. D. L. (2009). Determination of phenolic content and evaluation of antioxidant activity of propolis from Antioquia (Colombia). *Vitae*, 16(3), 388-395.

Pan, D., Yu, Z. (2014). Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes*, 5(1), 108-119.

Pareja, J. (2005). Anatomía y fisiología del aparato digestivo de las aves. Disponible en: <http://es.scribd.com/doc/36440314/Anatomia-y-Fisiologia-Intestinal>. Consultado el 11.10.2018.

Park, E. H., Kahng, J. H. (1999). Suppressive effects of propolis in rat adjuvant arthritis. *Archives of Pharmaceutical Research*, 22(6), 554.

Park, J. H., Kim, I. H. (2014). Supplemental effect of probiotic *Bacillus subtilis* B2A on productivity, organ weight, intestinal *Salmonella* microflora, and breast meat quality of growing broiler chicks. *Poultry Science*, 93, 2054-2059.

Parolia, A., Thomas, M. S., Kundabala, M., Mohan, M. (2010). Propolis and its potential uses in oral health. *International Journal of Medical Science*, 2, 210-215.

Pascoal, A., Extevinho, M. M., Choupina, A. B., Sousa-Pimenta, M., Estevinho, L. M. (2019). Na overview of the bioactive compounds, therapeutic properties and toxic effects of apitoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 134, 110864.

Paulino, N., Barbosa, A. P., Paulino, A. S., Marcucci, M. C. (2014). Hepatoprotective effect of green propolis is related with antioxidant

action *in vivo* and *in vitro*. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, 3(1), 43-50.

Peng, Z., Zou, M., Li, M., Liu, D., Guan, W., Hao, Q., Xu, J., Zhang, S., Jing, H., Li, Y., Liu, X., Yu, D., Yan, S., Wang, W, Li, F. (2018). Prevalence, antimicrobial resistance and phylogenetic characterization of *Yersinia enterocolitica* in retail poultry meat and swine feces in parts in China. *Food Control*, 93, 121-128.

Pérez, S. (2012). Estudio de factibilidad para la instalación de una planta procesadora de aves en la parroquia de Guayllabamba, provincia de Pichincha. Tesis doctoral, Universidad de San Francisco de Quito, Ecuador.

Plataforma Tecnológica Española de Sanidad Animal (2016). Guía de uso responsable de medicamentos veterinarios: apicultura. Disponible en: https://www.agronewscastillayleon.com/sites/default/files/apicultura_final_alta_resolucion17.pdf. Consultado el 11.10.2020.

Pobiega, K., Krasniewska, K., Derewiaka, D., Gniewosz, M. (2019a). Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 5386-5395.

Pobiega, K., Krasniewska, K., Gniewosz, M. (2019b). Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality- A review. *Trends in Food Science and Technology*, 83, 53-62.

Popova, T. (2017). Effect of probiotics in poultry for improving meat quality. *Current Opinion in Food Science*, 14, 72-77.

Poultry Hub. (2017). Sistema digestivo de las aves domesticas Disponible en: <http://www.poultryhub.org/physiology/bodysystems/digestive-system>. Consultado el 04.11.2019.

Quintana, J. A. (2011). Avitecnia. Manejo de las aves domesticas mas comunes (Cuarta edición). Editorial Trillas, México D.F., México.

Quiroz, E., Recalde, J., Arias, M. T., Seqqat, R., Vinueza, C., Ayala, L. (2016). Isolation of lyctic bacteriophages for nanobiocontrol of pathogenic and antibiotic resistant *Salmonella* present in poultry in Ecuador. *Biology and Medicine*, 8(3), 287.

Qureshi, M. A., Hussain, I., Heggen, C. L. (1998). Understanding immunology in disease development and control. *Poultry Science*, 77(8), 1126-1129.

Rahimi, E., Shirazi, F., Khamesipour, F. (2017). Isolation and study of the antibiotic resistance properties of *Shigella* species in meat and meat products. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41, e12947.

Rémy, V., Gänz P., Garibay S. R. T. (2012). Manual de apicultura orgánica. *Ecosur*, 2(2), 285-299.

Ricke, S. C. (2018). Impact of prebiotics on poultry production and food safety. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 91(2), 151-159.

Roca Saavedra, P. (2017). Estudio de la influencia de factores externos en la modificación del microbioma y estado nutricional poblacional. Tesis Doctoral, Universidad Santiago de Compostela, Lugo, España.

Roca-Saavedra, P., Mendez-Vilabril, M., Miranda, J. M., Nebot, C., Cardelle-Cobas, A., Franco, C. M., Cepeda, A. (2018). Food additives, contaminants and other minor components: effects on human gut microbiota- a review. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 74, 69-83.

Rosales Tapia, S. (2017). Estudio de mercado avícola enfocado a la comercialización del pollo en pie, año 2012-2014. Disponible en: <http://www.scpm.gob.ec/biblioteca>. Consultado el 10.10.2020.

Ros Piqueras, M. J. (2009). Iniciación a la apicultura. Editado por: Consejería de Agricultura y Agua de la región de Murcia. Murcia, España.

Ruiz, B. (2020). Fuerte crecimiento de la avicultura latinoamericana en 2019. *Industria Avicola*, 67(4), 4-25.

Ryan, K. J. C., Sherris, G. R. (2017). Microbiología médica, 6^o edición, Editorial McGraw-Hill, México D.F., México.

Sackey, B. A., Mensah, P., Collison, E., Sakyi-Dawson, E. (2001). *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella* and *Escherichia coli* in live and dressed poultry from metropolitan Accra. *International Journal of Food Microbiology*, 71(1), 21-28.

Salas, R. (2005). Manual técnico de apicultura. Disponible en : http://www.mieldemalaga.com/data/manual_apicultura.hon.pdf. Consultado el 10.10.2020

Sahin, H. A., Ozturk, E. (2018). Effects of raw propolis or water and ethanol extracts of propolis performance, immune system, and some blood parameters of broiler breeders. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 47, e20170161.

Samli, H. E., Senkoğlu, N., Koc, F., Kanter, M., Ağma, A. (2007). Effects of *Enterococcus faecium* and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and intestinal microbiota. *Archives of Animal Nutrition* 61, 42-49.

Sánchez-Salazar, E., Gudiño, M. E., Sevillano, G., Zurita, J., Guerrero-López, R., Jaramillo, K., Calero-Cáceres, W. (2019).

Antibiotic resistance in *Salmonella* strains from layer poultry farms in central Ecuador. *Journal of Applied Microbiology*, 128(5), 1347-1354.

Schiavone, A., Publiese, N., Circella, E., Camarda, A. (2020). Association between the poultry red mite *Dermanyssus gallinae* and potential avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Parasitology*, 284, 109198.

Scott, D. (2001). La miel y otros productos de las abejas, usos y beneficios para la salud humana. Disponible en: <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/av-0561.pdf>. Consultado el 23.10.2020.

Sen, S., Ingale, S. L., Kim, Y. W., Kim, J. S., Kim, K. H., Lohakare, J. D., Kim, E. K., Kim, H. S., Ryu, M. H., Kwon, I. K., Chae, B. J. (2012). Effect of supplementation of *Bacillus Subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. *Research in Veterinary Science* 93, 264-268.

Servicio Ecuatoriano de Normalización INEN. (2015). NORMA NTE INEN 2794. Normativa Técnica, primera, 18. Quito, Ecuador. Consultado en: <https://www.normalizacion.gob.ec/>. Consultado el 08.07.2020.

Seven, P. T., Seven, I. (2008). Effect of dietary Turkish propolis as alternative to antibiotic on performance and digestibility in broilers exposed to heat stress. *Journal of Applied Animal Research*, 34(2), 193-195.

Seven, P. T., Yilmaz, S., Seven, I., Cerci, I. H., Azman, A., Yilmaz, M. (2010). The effects of propolis on biochemical parameters and activity of antioxidant enzymes in broiler exposed to lead induced oxidative stress. *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*, 23(11), 1482-1489.

Shi, R., Chen, L., Chang, H. T., Liu, H. Y., Zhao, J., Wang, X. W., Wang, C. Q. (2014). Pathogenicity of *Shigella* in chickens. PLoS One, 9(6), e100264.

Silici, S., Kutluca, S. (2005). Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. Journal of Ethnopharmacology, 99, 69-73.

Silva, R. A., Rodrigues, A. E., Ribeiro, M. C. M., Custódio, Â. R., Andrade, N. E. D., Pereira, W. E. (2006). Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. Ciência Rural, 36(6), 1842-1848.

Silva, M. V. da. (2012). Aves de corral y productos avícolas : riesgos para la salud humana. FAO, 1-3.

Singh, M., Singh, S., Salgar, A. R., Prathibha, N., Chandrahari, N., Swapna, L. A. (2019). An in vitro comparative evaluation of antimicrobial efficacy of propolis, *morinde citrifolia* juice, sodium hypochlorite and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. Journal of Contemporary dental Practice, 20(1), 40-45.

Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (SINAGAP) (2016). Resultados del censo nacional ganadero del Ecuador. Disponible en: <http://sinagap.agricultura.gob.ec/resultados-censo-nacional/file/591-reporte-de-resultados-censo-nacional-completo>. Consultado el 04.11.2019.

Sofiysky, W. (2002). Guia medicinal de los productos de apicultura. Disponible en: https://www.asturias.es/medioambiente/articulos/ficheros/apicultura_e_cologica.pdf. Consultado el 12.10.2020.

Sousa, J. P .B., Furtado, N. A. J. C., Jorge, R., Soares, A. E. E.,

Bastos, J. K. (2007). Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(1), 85-93.

Souza, L., Santana Andrade, J. K., Santana Andrade, G. R., Denadai, M., Cavalcanti, R. L., Azevedo Pereira da Silva, M. A., Narain, N. (2019). Chemical characterization of four Brazilian brown propolis: An insight in tracking of its geographical location of production and quality control. *Food Research International*, 123, 481-502.

Souza, R. B., Ferrari, R. G., Magnani, M., Kottwitz, L. B. M., Alcocer, I., Tognim B., M. C., Oliveira, T. C. R. M. (2010). Ciprofloxacin susceptibility reduction of *Salmonella* strains isolated from outbreaks. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 497-500.

Stanchi, N. O., Martino, P. E., Gentilini, E., Reinoso, E. H., Echeverría, M. G., Leardini, N. A., Copes, J. A. (2007). *Microbiología Veterinaria*. Editorial InterMédica, Buenos Aires, Argentina.

Suasnívar, M., De León, G., Guzmán, A. (2015). *Manual de Apicultura*. Disponible en: <https://coba.com.gt/wp-content/uploads/2015/07/MANUAL-BASICO-DE-APICULTURA-I.pdf>. Consultado el 21.09.2020.

Sumano López, H., Ocampo Camberros, L. (2006). *Farmacología Veterinaria* (Tercera Edición ed., Vol. 1). Editorial McGraw-Hill, México D.F., México.

Taheri, H. R., Rahmani, H. R., & Pourreza, J. (2005). Humoral Immunity of Broilers is Affected by Oil Extracted Propolis (OEP) in the Diet. *International Journal of Poultry Science*, 4(6), 414–417.

Tayeb, I. T., Sulaiman, B. F. (2014). Effect of propolis supplementation on productive performance in local quail. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 4(3), 621-627.

Tekeli, A., Kutlu, H. R., Çelik, L. (2011). Effects of *Z. officinale* and propolis extracts on the performance carcass and some blood parameters of broiler chicks. *Current Research Poultry Science*, 1(1), 12-23.

Torshizi, M. A. K., Moghaddam, A. R., Rahimi, S., Mojgani, N. (2010). Assessing the effect of administering probiotics in water or as a feed supplement on broiler performance and immune response. *British Poultry Science*, 51, 178-184.

Valladares, J. (2015). Anatomía y fisiología del intestino delgado. Disponible en: <http://bmeditores.mx/diferencias-anatomicas-histologicas-yfisiologicasentremamiferos-y-aves-i/>. Consultado el 10.03.2018.

Valles, J. G., Principal, J., Barrios, C. (2011). Immunomodulatory property of ethanolic extract of propolis on the Bursa of Fabricio in F1 male babies chicken Rhode Island Red x Rhode Island White. *Zootecnia Tropical*, 29(2), 161-168.

Vargas Sánchez, R. D., Torrescano Urrutia, G. R., Sánchez Escalante, A. (2013). El propóleo: conservador potencial para la industria alimentaria, *Interciencia*, 38, 705-711.

Vásquez, R., Ortega, N., Martínez, R., Maldonado, W. (2012). Manual técnico de apicultura abeja (*Apis mellifera*). In *Corpoica* (1st ed.). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica, Colombia.

Vilà, B., Esteve-Garcia, E., Brufau, J. (2010). Probiotic microorganisms: 100 years of innovation and efficacy; modes of action. *World's Poultry Science Journal* 65, 369-380.

Villacrés, I., Alcocer, I., Zurita, J., Rodríguez Riglos, M. (2017). Sensibilidad antimicrobiana y detección de genes de virulencia en

aislados clínicos de *Shigella* spp. Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas, 36(1-2), 67-76.

Vinueza-Burgos, C., Cevallos, M., Ron-Garrido, L., Bertrand, S. (2016). Prevalence and diversity of *Salmonella* serotypes in Ecuadorian broilers at slaughter age. PloS One, 11(7), e0159567.

Vinueza-Burgos, C., Baquero, M., Medina, J., De Zutter, L. (2019). Occurrence, genotypes and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* collected from the broiler production chain within an integrated poultry. International Journal of Food Microbiology, 299(16), 1-7.

VIRVAC (2010). Enterobacterias. Disponible en: <https://issuu.com/hitsoft/docs/suramox-viracol>. Consultado el 03.09.2020.

Vivas Espinosa, J. L. (2015). Prevalencia de nosema (*Nosema* spp.) en colmenares de la región norte y centro norte del Ecuador. Universidad Central del Ecuador. Tesis doctoral.

Waititu, S. M., Yitbarek, A., Matini, E., Echeverry, H., Kiarie, E., Rodriguez-Lecompte, J. C., Nyachoti, C. M. (2014). Effect of supplementing direct-fed microbials on broiler performance, nutrient digestibilities, and immune responses. Poultry Science, 93, 625-635.

Wagh, V. D. (2013). Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. Advances in Pharmacological Sciences, 2013(1), 308249.

Wang, H., Ye, K., Xu, X., Zhou, G. (2014). Optimization of an acidified sodium chlorite solution for reducing pathogenic bacteria and maintaining sensory characteristics of poultry meat in simulation slaughter process. Journal of Food Processing and Preservation, 38(1), 397-405.

Wang, Y., Gu, Q. (2010). Effect of probiotic on growth performance and digestive enzyme activity of Arbor Acres broilers. *Research in Veterinary Science*, 89, 163-167.

Wang, Y., Ma, Q., Hao, R., Zhang, Q., Yao, S., Han, S., Ren, B., Fan, B., Chen, L., Xu, X., Qiu, S., Yang, H. (2019). Antimicrobial resistance and genetic characterization of *Shigella* spp. in Shanxi province, China, during 2006-2016. *BMC Microbiology*, 199, 116.

Watkins, B. A., Kratzer, F. H. (1984). Drinking water treatment with a commercial preparation of a concentrated *Lactobacillus* culture for broiler chickens. *Poultry Science*, 63(8), 1671-1673.

Xu, L. J., Wang, C. Q., Hu, G. Z., Kang, X. T., Ren, J. (2004). Discovery on shigellosis of flock in china and studies on the pathogenic specialty. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 26, 281-286.

Xu, L. J., Wang, C. Q., Ma, S. F., Xue, S., Zhao, Y. L., (2005). Serum epidemiology survey on *Shigella* infection in the chicken. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 25, 594-596.

Xu, Q. Q., Yan, H., Liu, X.L., Lv, L., Yin, C.H., Wang, P. (2014). Growth performance and meat quality of broiler chickens supplemented with *Rhodopseudomonas palustris* in drinking water. *British Poultry Science*, 55, 360-366.

Yang, C. M., Cao, G. T., Ferket, P. R., Liu, T. T., Zhou, L., Zhang, L., Xiao, Y. P., Chen, A. G. (2012). Effects of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune function, and cecal microflora in broiler chickens. *Poultry Science*, 91, 2121-2131.

Yang, W., Wu, Z., Huang, Z., Miao, X. (2017). Preservation of orange juice using propolis. *Journal of Food Science and Technology*, 54(11), 3375-3383.

Yasar, M., Savranlar, Y., Karaman, H., Sagit, M., Silici, S., Ozcan, I. (2016). Effects of propolis in an experimental rat model of allergic rhinitis. *American Journal of Otolaryngology-Head and Neck Medicine and Surgery*, 37, 287-293

Yegani, M., Korver, D. R. (2008). Factors affecting intestinal health in poultry. *Poultry Science*, 87(10), 2052-2063.

Zafarnejad, K., Afzali, N., Rajabzadeh, M. (2017). Effect of bee glue on growth performance and immune response of broiler chickens. *Journal of Applied Animal Research*, 45(1), 280-284.

Zhang, Z. F., Kim, I. H. (2014). Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers. *Poultry Science*, 93, 364-370.

Zhao, X., Guo, Y., Guo, S., Tan, J. (2013). Effects of *Clostridium butyricum* and *Enterococcus faecium* on growth performance, lipid metabolism, and cecal microbiota of broiler chickens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 6477-6488.