



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES EXTRACTOS PROPÓLICOS

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE
LA CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

ALUMNO/A: Ana Tormos Esteve

TUTOR/A ACADEMICO: Ana Jiménez Belenguer

Curso Académico: 2018-2019

VALENCIA, FECHA 30/01/2019

MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES EXTRACTOS PROPÓLICOS

Ana Tormos Esteve, Ana Jiménez Belenguer¹.

¹Departamento de Biotecnología. Universitat Politècnica de Valencia

RESUMEN

El propóleo es una sustancia resinosa producida por las abejas (*Apis mellifera*) a partir de cera y exudados vegetales, cuya finalidad es sellar grietas en la colmena, impedir la entrada de intrusos y mantener condiciones de asepsia. El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la capacidad antimicrobiana del extracto de 25 muestras de propóleos de diferentes orígenes y con diferentes intensidades de color y comparar su efectividad frente a un desinfectante oral, la Clorhexidina. Para ello se ha medido la capacidad frente a ocho bacterias patógenas de diferentes especies, y se ha analizado mediante la técnica de difusión disco-placa para así comparar la eficacia de los diferentes propóleos. La mayoría de los propóleos mostraron inhibición del crecimiento de los microorganismos, pero no se encontró ninguna correlación entre la actividad antimicrobiana o el origen, ni la intensidad del color. Por otra parte, ninguno de los propóleos estudiados fue tan efectivo como el desinfectante oral utilizado. Del estudio se puede concluir que a pesar de que el propóleo posee capacidad antimicrobiana, no todas las muestras mostraron la misma efectividad, sus orígenes y su intensidad de color no tuvieron relación con su capacidad antimicrobiana y ninguna muestra fue tan efectiva como el desinfectante sintético.

PALABRAS CLAVE: Propóleo, capacidad antimicrobiana, Gram positivo

RESUM

El pròpolis és una substància resinosa produïda per les abelles (*Apis mellifera*) a partir de cera i exsudats vegetals, la finalitat és segellar esquerdes en el rusc, impedir l'entrada d'intrusos i mantenir condicions d'asèpsia. L'objectiu d'aquest treball ha estat avaluar la capacitat antimicrobiana de l'extracte de 25 mostres de pròpolis de diferents orígens i amb diferents intensitats de color i comparar la seva efectivitat davant un desinfectant oral, la Clorhexidina. Per a això s'ha mesurat la capacitat davant de vuit bacteris patògens de diferents espècies, i s'ha analitzat mitjançant la tècnica de difusió disc-placa per així comparar l'eficàcia dels diferents pròpolis. La majoria dels pròpolis van mostrar inhibició del creixement dels microorganismes, però no es va trobar cap correlació entre l'activitat antimicrobiana o l'origen, ni la intensitat del color. D'altra banda, cap dels pròpolis estudiats va ser tan efectiu com el desinfectant oral utilitzat. De l'estudi es pot concloure que tot i que el

pròpolis posseeix capacitat antimicrobiana, no totes les mostres van mostrar la mateixa efectivitat, els seus orígens i la seva intensitat de color no va tenir relació amb la seva capacitat antimicrobiana i cap mostra va ser tan efectiva com el desinfectant sintètic.

ABSTRACT

Propolis is a resinous substance produced by bees (*Apis mellifera*) from wax and vegetable exudates, whose purpose is to seal cracks in the hive, prevent the entry of intruders and maintain aseptic conditions. The objective of this research was to evaluate the antimicrobial capacity of the extract of 25 samples of propolis of different origins and with different colour intensity and compare its effectiveness against an oral disinfectant, is Chlorhexidine. For this, the capacity against eight pathogenic bacteria of different species has been measured, and it has been analyzed using the disc-plate diffusion technique in order to compare the efficacy of the different propolis. Most propolis showed growth inhibition of microorganisms, but no correlation was found between antimicrobial activity or origin, nor colour intensity. On the other hand, none of the propolis studied was as effective as the oral disinfectant used. From the study it can be concluded that in spite of propolis possessing antimicrobial capacity, not all samples showed the same effectiveness, their origins and their intensity of colour had no relation with their antimicrobial capacity and no sample was as effective as the synthetic disinfectant.

INTRODUCCIÓN

El propóleo es una sustancia resinosa de color variable producida por las abejas (*Apis mellifera*) que proviene de la mezcla de cera, secreciones salivares y resinas provenientes tanto de hojas, como flores, tallos y grietas de diferentes tipos de plantas. Las abejas utilizan el propóleo como material de construcción para sellar aperturas y grietas en la colmena, así como para mantener condiciones de asepsia en el interior (Batista et al., 2018; Pobiega et al., 2018; Osés et al., 2016).

El propóleo siempre ha sido considerado como agente terapéutico, y por ello sus características han sido muy estudiadas. Se han asociado a una serie de efectos farmacológicos, incluyendo entre ellos: antimicrobiano, antiviral, antioxidante, hepatoprotector, antitumoral, antiinflamatorio e inmunoestimulante y antialérgico. La eficacia de sus diferentes efectos varía en función de su composición que depende de la región geográfica de origen, el clima, las condiciones medioambientales y la estación del año (Batista et al., 2018; Pobiega et al., 2018; Kasote et al., 2017; Osés et al., 2016; Nam et al., 2016; Graikou et al., 2016).

Una gran cantidad de componentes químicos han sido detectados en el propóleo, entre ellos los ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, componentes volátiles, componentes aromáticos, hidrocarburos, esteroides, enzimas, flavonoides, ácidos, micro y macronutrientes, vitaminas y aceites esenciales. Se atribuye su actividad biológica principalmente a los flavonoides, terpenos, ácidos fenólicos y ésteres, y el efecto sinérgico que todos ellos constituyen. Dependiendo del origen de los propóleos estos tienen una cantidad de componentes químicos u otros. A pesar de su diversidad de composición química, los propóleos pueden mostrar los mismos patrones de actividad microbiana (Pobiega et al., 2018; Graikou et al., 2016; Hendi et al., 2011; Osés et al., 2016; Boyanova et al., 2006). La clasificación del propóleo en función del color es común y su gama va desde verde o rojo hasta marrón oscuro, siendo éste el más común. Se piensa que hay una relación entre el color y la composición del propóleo (Kasote et al., 2017).

El aumento de resistencias a los antibióticos y su paulatino aumento está propiciando la búsqueda de alternativas al uso de éstos, es por ello que resulta de interés la posible utilización del propóleo como prevención para algunas infecciones leves, como sería el caso de las enfermedades periodontales o para inhibir el crecimiento microbiano por la asociación entre agentes antimicrobianos sintéticos y naturales (Regueira et al., 2018; Nam et al., 2016; Silva et al., 2012).

Por otra parte, debido su composición química y a la riqueza de sus componentes bioactivos, el propóleo también se considera una sustancia que podría aplicarse en producción alimentaria, tanto para inhibir el crecimiento

microbiano como por sus capacidades antioxidantes (Pobiega et al., 2018; Osés et al., 2016).

Por todo lo nombrado anteriormente, el objetivo de este estudio ha sido evaluar la capacidad antimicrobiana de las diferentes muestras de propóleo y compararla con la efectividad de un desinfectante sintético, así como determinar si hay relación entre la capacidad antimicrobiana y el origen e intensidad de color de los diferentes propóleos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de propóleo:

Para la realización de este estudio se analizaron un total de 25 muestras de extractos de propóleo que procedían de diferentes orígenes tal y como se muestra en la tabla 1, donde se puede observar el número de muestra, así como la nomenclatura asignada a cada una de ellas, el origen de cada muestra y en algunos casos la región de la que se obtuvo.

Tabla 1. Identificación de las diferentes muestras con su país de origen y en algunos casos la región.

MUESTRA	NOMENCLATURA	ORIGEN	REGIÓN
M1	16004	Rumania	Suceava
M2	16016	España	Gestalgar
M3	16019	España	
M4	16099	Honduras	Siguetepeque
M5	17078	Brasil	
M6	17080	China	
M7	17081	China	
M8	16048	España	Valencia
M9	16005	Rumania	Suceava
M10	16007	Rumania	Suceava
M11	16000	España	
M12	16017	España	Sierra Mariola
M13	16018	España	Barxeta
M14	17079	Brasil	
M15	17076	Rumania	
M16	16003	Rumania	Suceava
M17	17082	Ucrania	
M18	16020	España	
M19	16054	España	Godellea
M20	16053	Rumania	Mircea
M21	17094	España	Valencia
M22	16006	Rumania	Suceava
M23	17077	Rumania	
M24	17075	Lituania	
M25	18028	España	Ayora

Estas muestras fueron extraídas mediante el procedimiento de doble ultrasonificación, método descrito por Escriche y Juan (2018). Los extractos se obtuvieron a partir de EtOH/agua al 70% a temperatura ambiente. (Escriche y Juan, 2018) Posteriormente las muestras fueron conservadas en congelación a -20°C en eppendorf estériles.

Por otra parte, también se evaluó la capacidad antimicrobiana de la Clorhexidina al 0,2% de concentración a partir de Clorhexidina digluconato (Acofarma) al 20% como ejemplo de actividad antimicrobiana en productos periodontales comerciales de actividad antimicrobiana conocida.

Cepas bacterianas:

Durante este estudio se utilizaron un total de 7 cepas de diferentes bacterias y una levadura, como se muestra en la Tabla 2. Siete de ellas pertenecientes a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), y una de ellas perteneciente a Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ).

Tabla 2. Bacterias y cepas utilizadas en el estudio

BACTERIAS	CEPA
GRAM +	<i>Streptococcus pyogenes</i> CECT 985
	<i>Streptococcus mutans</i> CECT 479
	<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 1240
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> CECT 231
	<i>Bacillus subtilis</i> CECT 356
GRAM -	<i>E. coli</i> DSMZ 1103
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CECT 110
	<i>Candida albicans</i> CECT 1002
LEVADURAS	

Para la utilización de las cepas, las cuales estaban conservadas a -20°C y se revivieron para su uso, se realizaron dos pases consecutivos para obtener las cepas en fase exponencial en 24 horas. Para ello se utilizaron diferentes medios en función de las cepas. Para las Gram negativas y la mayoría de las Gram positivas se utilizó el medio TSA (Tryptic Soy Agar), para las cepas *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus mutans*, se utilizó el medio BHI (Brain Heart Infusion Agar), (SCHARLAU SL., Barcelona) y se incubó a 37°C durante 48 horas, y para *Candida albicans* se utilizó YPDA (Yeast Peptone Dextrose Agar), (Difco Laboratories Inc) se incubaron a 37°C durante 24 horas. Todas las cepas fueron incubadas en aerobiosis

Medición de la capacidad antimicrobiana

Para la evaluación de la capacidad antimicrobiana de las 25 muestras de propóleo y la Clorhexidina, se decidió utilizar una técnica cuantitativa a partir

de la técnica de difusión disco-placa, para así poder determinar la sensibilidad de los microorganismos y la levadura a las diferentes muestras de propóleo. Esta técnica se basó en depositar sobre la superficie de la placa de agar con la cepa inoculada un disco de papel (Filtros Anovia S.L) impregnado con los distintos extractos de propóleo. De esta forma, al colocar el disco impregnado en contacto con la superficie del agar, el filtro absorbe el agua y la muestra difunde en el agar. Así, en el caso de que la muestra posea sustancias solubles con capacidad antimicrobiana, éstas difundirán radialmente a través del agar, formándose así un halo de inhibición del crecimiento alrededor del disco.

Para la preparación de los inóculos se utilizaron cultivos de 24 horas de cada cepa microbiana, y estos inóculos se realizaron mediante la suspensión directa de colonias. Para ello se recogieron colonias con un asa de siembra de la placa del cultivo puro y se transfirieron a un tubo con 10ml de tampón PBS 1X. Se agitó el tubo en el vortex durante 15-20 segundos y se buscó alcanzar una turbidez de McFarland entre 2 y 4 en función de la cepa, como puede observarse en la Tabla 3. Se tomó una alícuota de 50 μ L del inóculo y se transfirió a un tubo con agar semisólido a 45°C, correspondiente en función de la cepa microbiana. Se agitó el tubo en el vortex durante 10 segundos y se vertió el contenido en una placa Petri con el medio correspondiente en función de cada cepa. Se realizaron movimientos circulares a la placa para la correcta distribución del medio y se dejó solidificar.

Tabla 3. Medio empleado, McFarland utilizado e incubación de cada microorganismo utilizado en el estudio.

BACTERIA	MEDIO	MCFARLAND	INCUBACIÓN
GRAM +			
<i>Streptococcus pyogenes</i>	BHI	4	37°C/48h
<i>Streptococcus mutans</i>	BHI	4	37°C/48h
<i>Staphylococcus aureus</i>	TSB	3	37°C/24h
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	TSB	3	37°C/24h
<i>Bacillus subtilis</i>	TSB	2	37°C/24h
GRAM -			
<i>E. coli</i>	TSB	2	37°C/24h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	TSB	2	37°C/24h
LEVADURAS			
<i>Candida albicans</i>	YPD	2	28°C/24h

Por otra parte, se realizó una dilución 1:100 de la Clorhexidina hasta obtenerla al 0,2% de concentración, que es la usual en comprimidos orales comerciales.

Se sembraron las muestras por triplicado para cada uno de los microorganismos. Las placas fueron incubadas en posición invertida en estufa

a las condiciones adecuadas en función de las necesidades de crecimiento de los microorganismos, como se muestra en la Tabla 3, y posteriormente se midió su halo en mm de inhibición con una regla milimetrada.

Medición de la intensidad del color:

Se realizó la medición de la intensidad del color de las diferentes muestras para valorar si una mayor intensidad de color estaba relacionada con una mayor capacidad antimicrobiana. Para ello se utilizó el colorímetro C221 Honey Color Analyzer, un microprocesador portátil perteneciente a la casa comercial HANNA INSTRUMENTS, que mide el porcentaje de transmisión de luz de la miel comparándola con un reactivo analítico de glicerol.

El valor de medida fue la escala Pfund, donde, en función de los milímetros de esa escala, se le atribuye una densidad óptica y por lo tanto un color, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Valores de referencia de la escala Pfund (White, 1978).

COLORES DE LA MIEL

Nombre del color	Escala de Pfund en milímetros	Densidad óptica
Blanco agua	< 9	0,0945
Extra blanco	9 – 17	0,189
Blanco	18 – 34	0,378
Ámbar extra claro	35 – 50	0,595
Ámbar claro	51 – 85	1,389
Ámbar	86 – 114	3,008
Ámbar oscuro	> 114	-

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se midió la capacidad antimicrobiana a partir del método de difusión disco-placa, obteniéndose halos de inhibición en mm. Se consideró que había capacidad antimicrobiana cuando los valores de la medición de los halos superaban los 6 mm, el tamaño del diámetro del disco.

En la interpretación de los datos, los valores de inhibición más altos se observaron en la muestra M23, llegando los diámetros de los halos a medir 12 mm, seguido por las muestras M17 y M21, que dieron tamaños de diámetro de halo de 11,33 mm. Otras muestras en cambio no inhibieron el crecimiento microbiano o lo hicieron mínimamente, como sería el caso de M4, cuyo mayor diámetro de halo fue de 6,83 mm, o la muestra M9, cuyo mayor halo fue de 7,33 mm, mostrando así bajo poder de inhibición microbiana.

Con respecto a las medias totales de las medidas de los halos, éstas fueron muy variables, igual que la efectividad de los propóleos. Encontramos que la muestra con mayor media de halo inhibición coincide en este caso con

la que produjo el mayor diámetro de halo, la muestra M23 originaria de Rumanía, con una media de 8,92 mm, seguida de la muestra M8 de España (Valencia), que, a pesar de no haber generado ninguno de los halos de mayor diámetro, su media es la segunda más alta, siendo de 8,48 mm, probablemente porque causó inhibición en la mayoría de los microorganismos. El tercer propóleo con mayor media de diámetro de halo fue el M17 (Ucrania), con una media de 8,29 mm.

Como podemos observar en la Figura 1, tanto para los microorganismos *E. coli* como *P. aeruginosa*, las medias del tamaño de los halos fueron prácticamente de 6 mm, considerando, que los propóleos no presentaron ningún tipo de inhibición sobre estos microorganismos. Este resultado nos indica que los propóleos tienen un bajo efecto antimicrobiano sobre las bacterias Gram negativas. El hecho de que las bacterias Gram negativas sean más resistentes a la capacidad antimicrobiana del propóleo puede ser debido a que su membrana externa inhibe o retrasa su penetración, y por lo tanto disminuye su efectividad (Hendi et al., 2011; Silva et al., 2012). En otros estudios se encontraron resultados similares, como en el caso de Silva et al. (2012), Graikou et al. (2016) y Hendi et al. (2011), en ellos, las bacterias Gram negativas mostraron mayor resistencia a los efectos de los propóleos, a pesar de que sí inhibieron su crecimiento. Kasote et al. (2017) necesitó una mayor concentración de muestra para inhibir el crecimiento de *E. coli*, y Osés et al. (2016) encontró poca actividad frente a *P. aeruginosa*. Por otra parte, Miguel (2013) obtuvo que en propóleos de origen español *E. coli* resultó resistente a todos los propóleos a los que se enfrentó a pesar de que frente a otras bacterias Gram negativas como *Salmonella spp* sí que se encontraron actividades inhibitorias significativas.

En el resto de los microorganismos se observó que la media de la medición de halos fue superior a 6 mm, y que por lo tanto fueron susceptibles a las muestras de propóleos empleados. Se observó que el microorganismo con la mayor media de tamaño de halos fue *Staphylococcus aureus*, seguido de *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus epidermidis* siendo todos ellos Gram positivos. Los resultados obtenidos en otros estudios coinciden con los presentes, obteniendo mayores inhibiciones de crecimientos en bacterias Gram positivas (Miguel., 2013; Silva et al., 2012; Hendi et al., 2011; Graikou et al., 2016; Kasote et al., 2017).

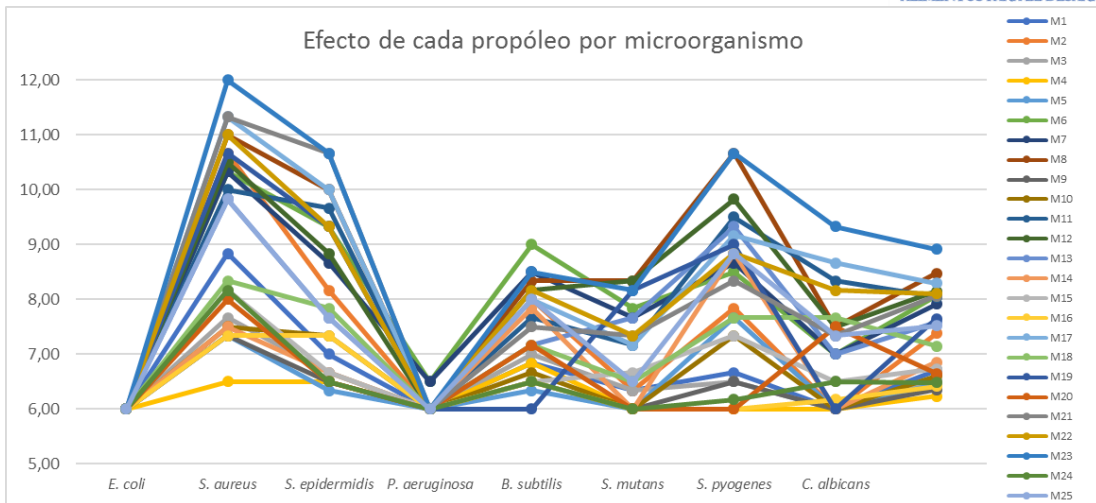


Figura 1. Efecto antimicrobiano medido en mm de cada propóleo en función de los microorganismos estudiados.

Como se muestra en la Figura 2, todas las medias se incrementaron al incluir los valores obtenidos con la Clorhexidina. Al comparar la media de los valores obtenidos en los diferentes propóleos con los valores obtenidos en la Clorhexidina, obtenemos una imagen global en la que se muestra que este desinfectante fue más efectivo que la media de los propóleos empleados en este estudio. Tal y como se muestra en la Figura 3, la media de los valores obtenidos en la medición de los halos de todos los propóleos en comparación a los valores obtenidos en la Clorhexidina fue mucho menor. Cabe destacar que los propóleos no tuvieron efecto antimicrobiano claro frente a las bacterias Gram negativas mientras que la Clorhexidina dio valores medios de halos de 14,33 mm para *E. coli* y 14,67 mm para *P. aeruginosa*.

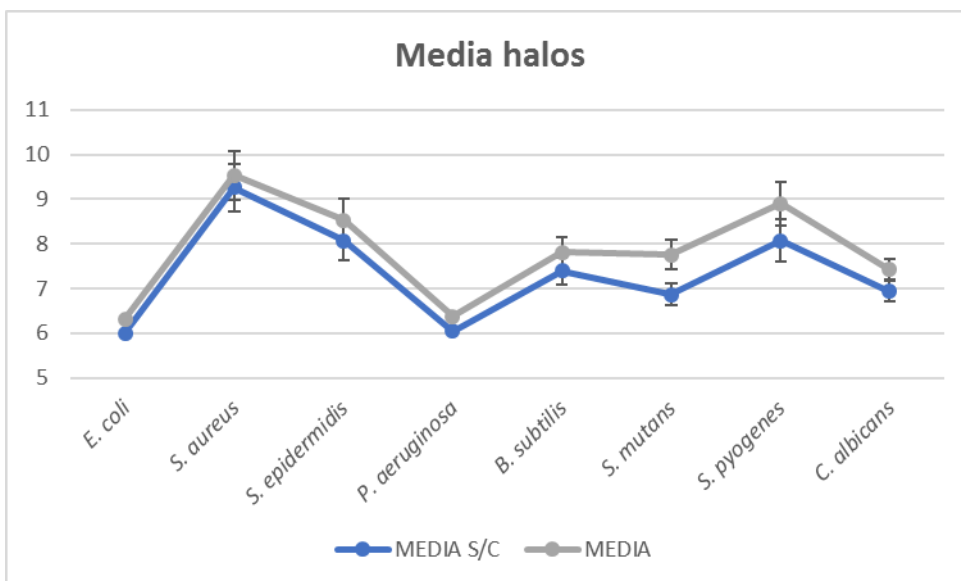


Figura 2. Medias de las medidas de los halos de inhibición de los propóleos incluyendo y sin incluir los valores de la Clorhexidina.

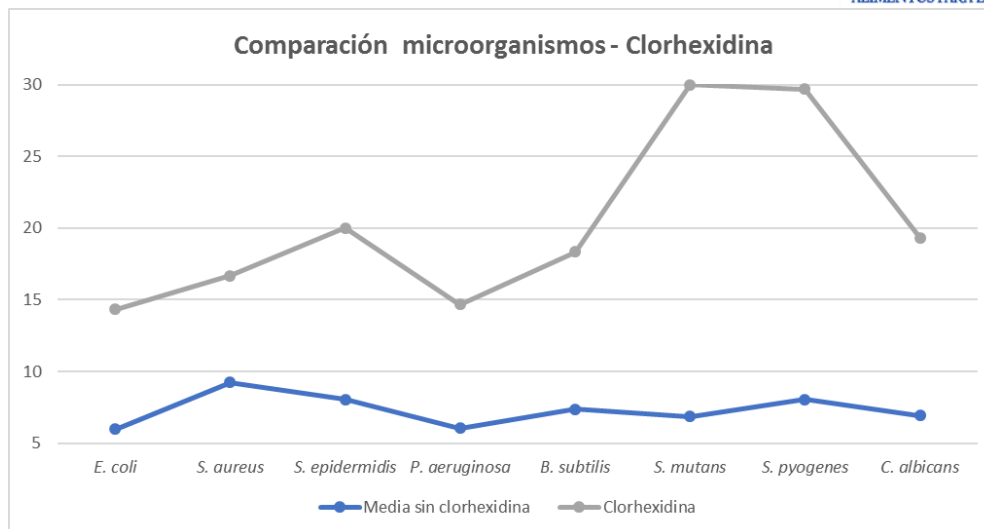


Figura 3. Media de los valores obtenidos en la medición de los halos de todos los propóleos en comparación a los valores obtenidos en la Clorhexidina.

A continuación, se procedió a analizar de forma más específica los datos obtenidos en función de la efectividad sobre cada microorganismo. En las bacterias Gram negativas no se obtuvo ningún efecto, seguidas por la levadura, cuyo mayor tamaño de halo se observó en la muestra M23, siendo éste de 9,33 mm, y en M17 de 8,67 mm. Los mayores resultados que se obtuvieron fueron en las bacterias Gram positivas, siendo *S. mutans* y *B. subtilis* los microorganismos menos susceptibles a la acción de las muestras frente a *S. aureus*, que fue la bacteria donde mayor diámetro de halo se encontró, seguido de *S. pyogenes* y *S. epidermidis*. También cabe añadir que los propóleos no tuvieron la misma efectividad en los diferentes microorganismos. En la Figura 4 se representan los propóleos que resultaron más efectivos frente a Gram positivos, se observa como la muestra con mayores tamaños de halo fue M23, siendo también la muestra más efectiva en la mayoría de los microorganismos.

Por otra parte, se observa como para cada microorganismo la efectividad de los propóleos varía, esto se debe a que la capacidad antimicrobiana así como la mayoría de los efectos farmacológicos del propóleo dependen de su composición química y su origen (Miguel., 2013; Silva et al., 2012; Herrera et al., 2010; Hendí et al., 2011; Zancanela et al., 2018), y también a que los propóleos son especie-dependiente (Stepanović et al., 2003). En el estudio realizado por Miguel (2013), se obtuvieron resultados diferentes a nivel del efecto antimicrobiano al estudiar cepas de diferentes orígenes, y según estos resultados había una fuerte correlación entre el contenido fenólico total, principalmente flavonoides y la actividad antimicrobiana. En nuestro caso, podemos observar como para *B. subtilis* la muestra con mayor diámetro de halo es la M6, con un tamaño de 9 mm, mientras que para *S. aureus* tiene uno de los valores más bajos, 10,33 mm. Lo mismo ocurrió con la muestra M12, que obtuvo el mayor halo de inhibición para *S. mutans*, mientras que en otros microorganismos su halo fue superado por otras muestras.

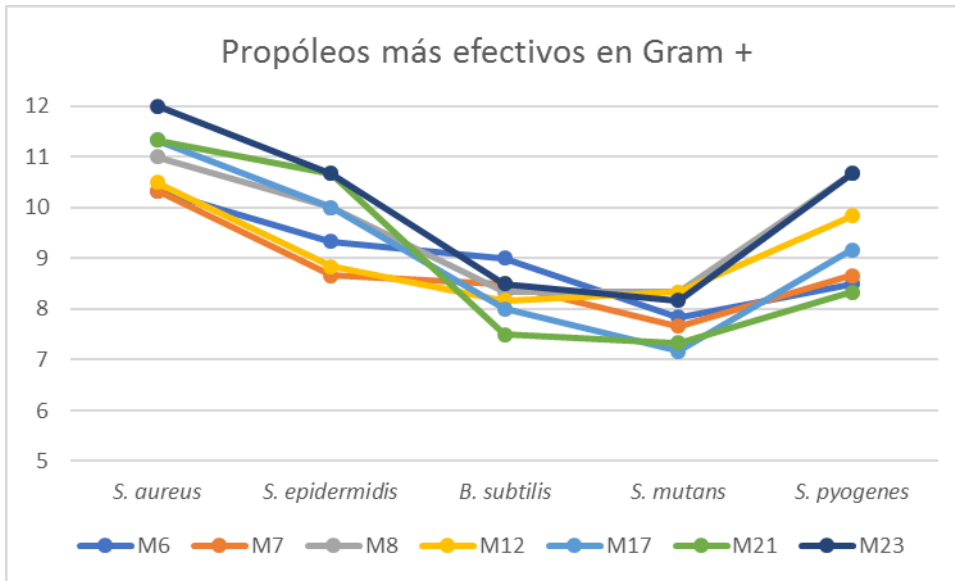


Figura 4. Comparación de las muestras de propóleos más efectivas sobre las bacterias Gram positivas estudiadas.

En el caso de *S. aureus*, como se observa en la Figura 5 las muestras en las que el diámetro de halo fue mayor fueron M23, cuyo valor fue 12 mm, M21, cuyo valor fue 11,33 mm y M17, cuyo valor fue 11,33 mm. A pesar de este efecto, los valores de la Clorhexidina fueron más altos, siendo éstos de 16,67 mm. Los resultados obtenidos coinciden con los resultados de otros estudios donde *S. aureus* resultó el microorganismo más susceptible (Silva et al., 2012; Hendi et al., 2011; Kasote et al., 2017).

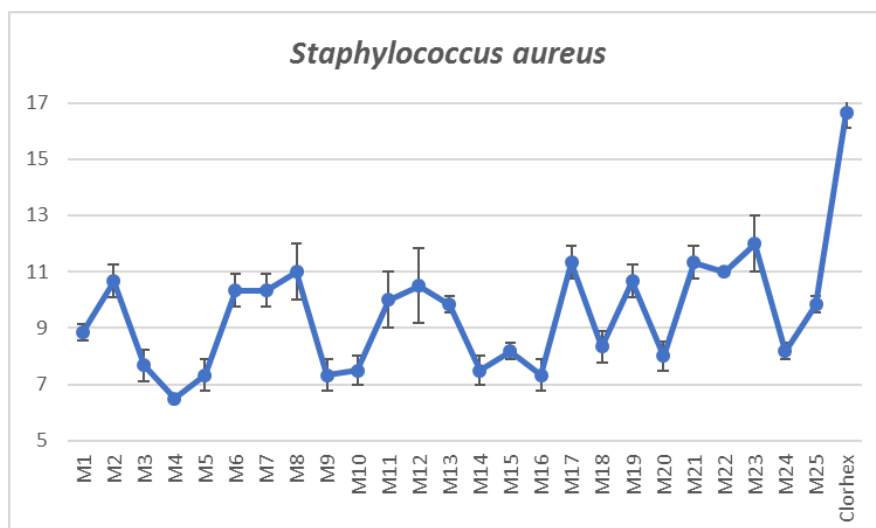


Figura 5. Medias de las diferentes muestras en el microorganismo *S. aureus*, donde se encontró mayor media de tamaño de diámetro de halo.

En el caso de *S. epidermidis* y *S. pyogenes*, como se observa en la Figura 6, los propóleos que mostraron mayor diámetro de halo fueron, en el caso de *S. epidermidis*, la muestra M23, cuyo valor fue 10,67 mm, la muestra M21, cuyo valor fue 10,67 y la M17, cuyo valor fue de 10 mm. En el caso de *S. pyogenes* los valores obtenidos fueron, en M23 de 10,67 mm, en M8, de 10,67 mm, y M12, de 9,83 mm.

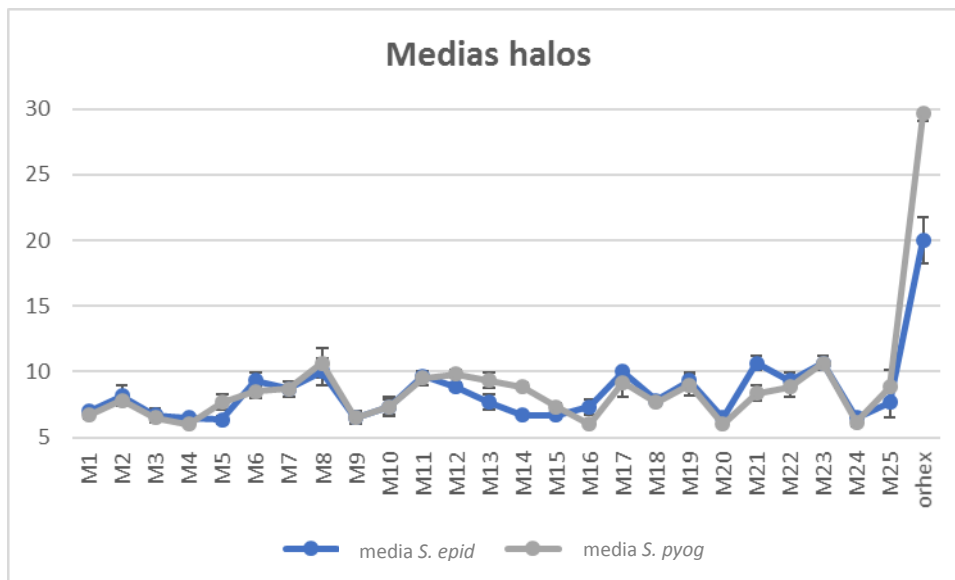


Figura 6. Medias de las diferentes muestras en dos de los microorganismos donde el valor del diámetro de halos fue mayor.

Tras este análisis se puede concluir que, a pesar de que algunos propóleos tienen mayores efectos que otros, no siempre son igual de efectivos frente a los diferentes microorganismos, como observamos en la Figura 7. Aquí vemos que los 3 propóleos que más afectaron a los diferentes microorganismos no coinciden entre sí, siendo la muestra M23 la más efectiva para *C. albicans*, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. pyogenes*, pero no para *B. subtilis* y *S. mutans*, siendo las muestras M6 y M12 las más efectivas respectivamente. Esto se debe a que lo más probable es que los propóleos tengan diferentes composiciones químicas que hacen que su efecto varíe, así como a que son especie-dependientes en función de los microorganismos ensayados (Stepanović et al., 2003; Miguel., 2013). En otros estudios donde se midieron las capacidades antimicrobianas de estos mismos microorganismos, los resultados fueron diferentes, obteniéndose en algunos casos la inhibición total de *S. mutans* (Oda et al., 2016; Peycheva et al., 2018; Ophori et al., 2010). Los resultados obtenidos frente a *C. albicans* también fueron diferentes a otros estudios, ya que otros propóleos resultaron tener una actividad antimicrobiana variable frente a esta levadura. En el caso de Silva et al. (2012) *C. albicans* fue el microorganismo más resistente en comparación a todos los Gram positivos y negativos estudiados, incluidos *E. coli* y *P. aeruginosa*, mientras que otros investigadores obtuvieron resultados donde *C. albicans* fue muy susceptible a la acción de los propóleos (Regueira et al., 2018; Herrera et al.,

2010; Zancanela et al., 2018; Peycheva et al., 2018). Por otra parte, Kasote et al. (2017) obtuvieron que *B. subtilis* fue el Gram positivo más resistente.

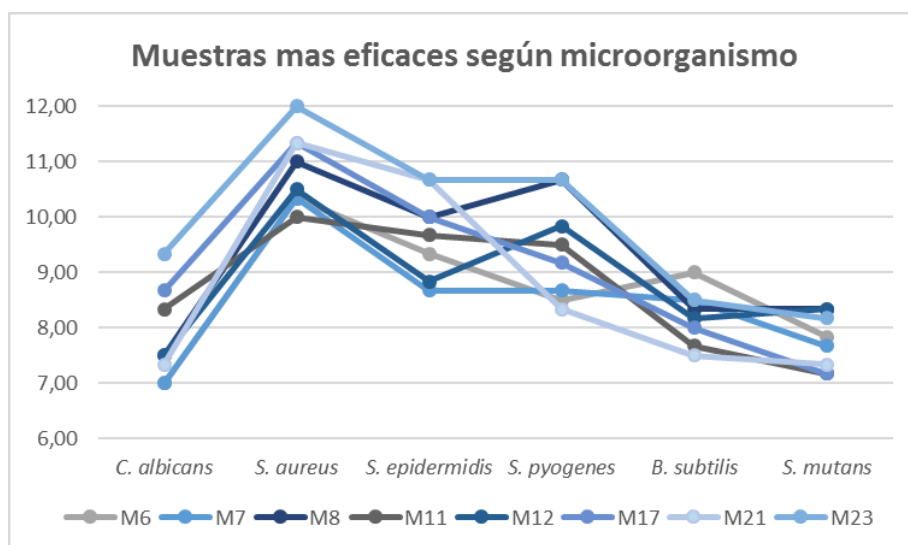


Figura 7. Muestras de propóleos más eficaces en función de los microorganismos Gram positivos y la levadura estudiada.

Tabla 5. Representación de las diferentes muestras de propóleos con sus respectivas medias obtenidas de la medición de los diámetros de los halos y sus respectivos orígenes.

Propóleos	Muestra	MEDIA	Origen
17077	M23	8,92	RUMANIA
16048	M8	8,48	ESPAÑA
17082	M17	8,29	UCRANIA
16017	M12	8,15	ESPAÑA
16006	M22	8,10	RUMANIA
17080	M6	8,06	CHINA
17094	M21	8,06	ESPAÑA
16000	M11	8,04	ESPAÑA
17081	M7	7,92	China
16054	M19	7,65	ESPAÑA
16018	M13	7,58	ESPAÑA
18028	M25	7,52	ESPAÑA
16016	M2	7,38	ESPAÑA
16020	M18	7,15	ESPAÑA
17079	M14	6,85	BRASIL
17076	M15	6,73	RUMANIA
16004	M1	6,71	RUMANIA
16053	M20	6,65	RUMANIA
16007	M10	6,60	RUMANIA
16019	M3	6,52	ESPAÑA
17075	M24	6,48	LITUANIA
17078	M5	6,46	BRASIL
16003	M16	6,42	RUMANIA
16005	M9	6,35	RUMANIA
16099	M4	6,23	HONDURAS

Por lo tanto, y en función de las medias totales obtenidas, como se muestra en la Tabla 5, las muestras con mayores medias de tamaño de halo, y por lo tanto con mayor capacidad antimicrobiana fueron la M23, la M8 y la M17, cada una de un origen distinto, siendo la primera originaria de Rumania, la segunda de España y la tercera de Ucrania, mientras que las de menor halo, la M4, M9 y M16, las dos primeras eran originarias de Rumania y la última de Honduras. Tras la obtención de estos resultados, podemos observar cómo tanto el propóleo más efectivo como dos de los menos efectivos pertenecen al mismo país de origen, pudiendo considerar así que no existe relación entre el origen del propóleo y su capacidad antimicrobiana, a pesar de que deberían realizarse más estudios, relacionados con la composición química de los propóleos, para poder afirmar que no existe relación entre origen y efectividad antimicrobiana

Al comparar los resultados obtenidos de los propóleos considerados más efectivos en este estudio frente al desinfectante oral estudiado, la Clorhexidina al 0,2%, podemos concluir, como se muestra en la Figura 8 que, a pesar de obtener valores que confirman que algunos propóleos producen una inhibición del crecimiento de las bacterias, no son tan efectivos como, en este caso, un desinfectante comercializado como es la Clorhexidina.

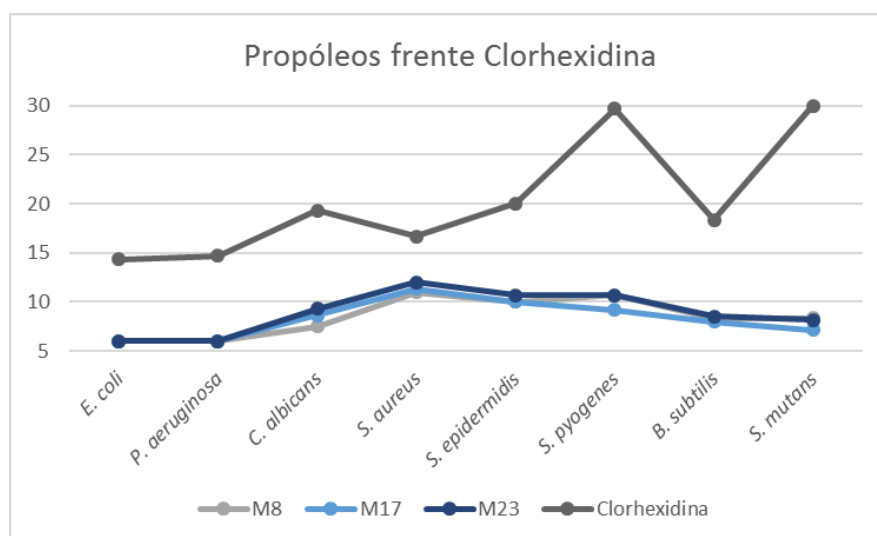


Figura 8. Comparación de las medias de los diámetros de halo de las tres muestras de propóleo más eficaces frente a los datos obtenidos en la Clorhexidina.

Por último, otro de los objetivos de este estudio era valorar si existía una correlación entre la intensidad del color del propóleo y su capacidad antimicrobiana. Por otra parte, los datos que se obtuvieron tras realizar la medición de color fueron los que se observan en la Tabla 6.

Tabla 6. Tabla con los datos obtenidos en el colorímetro C221 Honey Color Analyzer

MUESTRA	REFERENCIA	VALOR (MM PFUND)
M1	16004	62
M2	16016	68
M3	16019	61
M4	16099	26
M5	17078	46
M6	17080	68
M7	17081	70
M8	16048	57
M9	16005	50
M10	16007	52
M11	16000	60
M12	16017	57
M13	16018	63
M14	17079	50
M15	17076	67
M16	16003	37
M17	17082	69
M18	16020	49
M19	16054	56
M20	16053	65
M21	17094	59
M22	16006	62
M23	17077	48
M24	17075	55
M25	18028	55

Al visualizar la Figura 9 podemos observar como al comparar las medidas de los halos con los valores obtenidos en el colorímetro obtenemos que muestras con altas medias de diámetros de halo, como sería el caso de la muestra M23, dan bajos valores de intensidad de color, siendo en este caso de 48 mm en la escala Pfund. Por otra parte, al comparar muestras con elevada actividad antimicrobiana como sería la muestra M8, con muestras con muy baja efectividad, como sería la muestra M9, vemos que los valores de M8 son mayores que los de M9, siendo estos de 57 y 50 mm respectivamente, en la escala Pfund. Por lo tanto, podría considerarse a simple vista que no hay relación entre la intensidad del color y la capacidad antimicrobiana. A pesar de ello, se relaciona el color del propóleo a su composición química, y estudios afirman que la intensidad del color podría considerarse como un parámetro de calidad (Kasote et al., 2017).

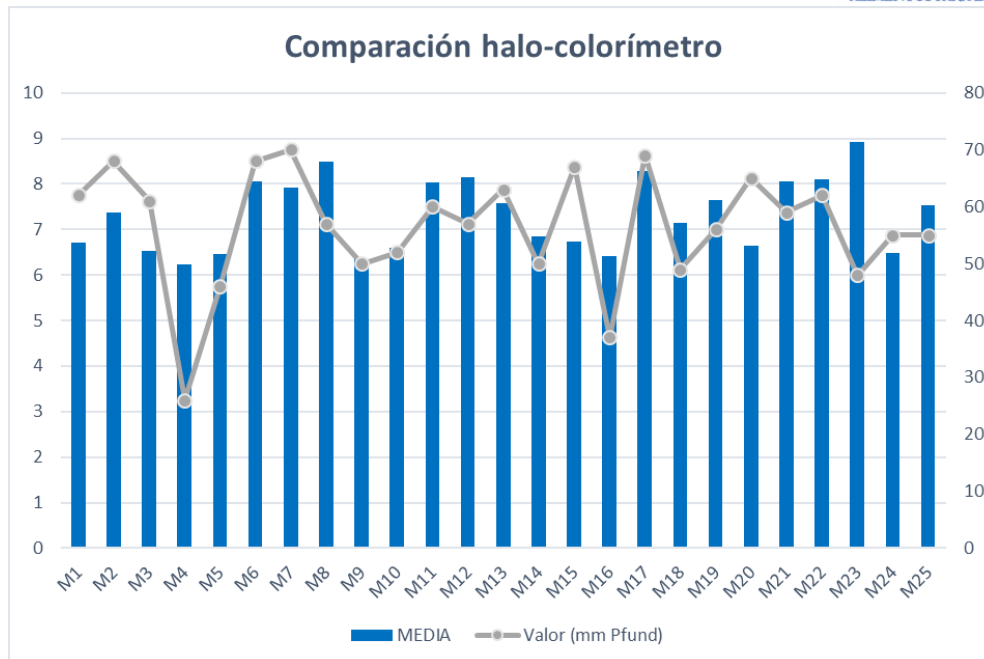


Figura 9. Comparación de las medias de diámetro de los halos de cada muestra frente a los datos obtenidos en el colorímetro.

A partir de los datos obtenidos se realizó un análisis ANOVA multifactorial con el objeto de establecer si había diferencias estadísticamente significativas respecto a los halos de inhibición, teniendo en cuenta que las variables serían los diferentes microorganismos, los datos obtenidos en el colorímetro y las diferentes muestras de propóleo.

Como se puede observar en la Figura 10, hubo una variación significativa del diámetro de los halos de inhibición, en función del tipo de microorganismo y del tipo de muestra de propóleo, donde el Valor-P resultó ser menor de 0,05. Por lo tanto, sí que se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las muestras analizadas, resultando la Clorhexidina la que más diferencia presentó, seguida de la muestra M23, como puede observarse en la Figura 10.

Medias y 95,0% de Fisher LSD

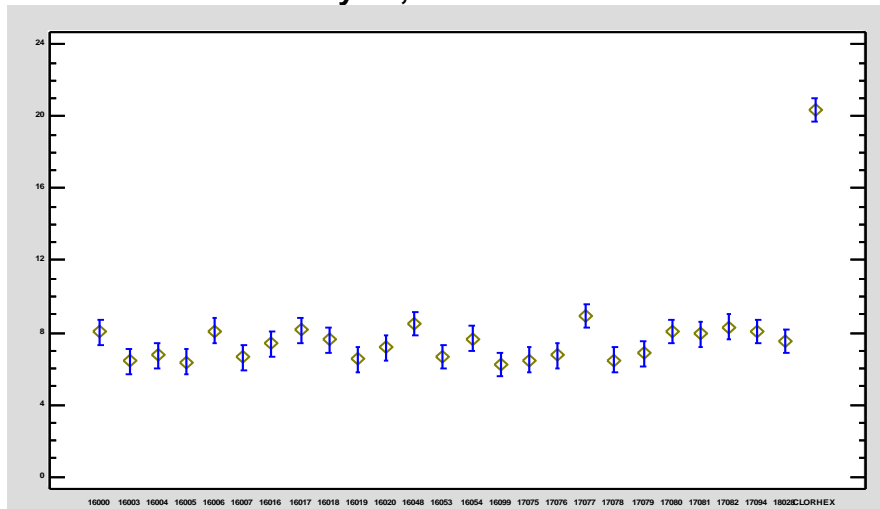


Figura 10. Diagrama de Fisher para las diferentes muestras de propóleo en función del halo de inhibición (en mm).

Por otra parte, también se observó que el microorganismo más sensible a las muestras de propóleo fue *Staphylococcus aureus*, mientras que el más resistente fue *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, como se observa en la Figura 11.

Medias y 95,0% de Fisher LSD

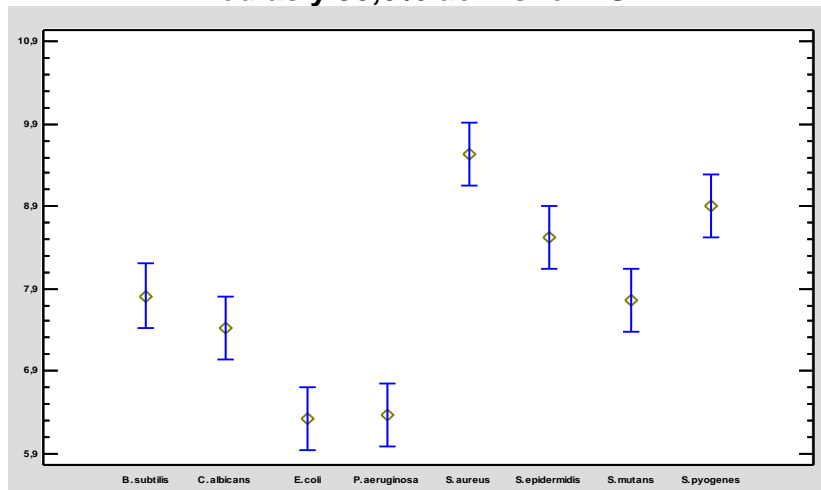


Figura 11. Diagrama de Fisher para los diferentes microorganismos en función del tamaño del halo de inhibición.

Con respecto a las interacciones dobles, únicamente fue significativo el tipo de microorganismo en función de la muestra, lo que significa que el halo de inhibición varió en cada microorganismo dependiendo de la muestra utilizada. Esto implica que, según el tipo de muestra utilizada para un mismo microorganismo, estadísticamente se observan que hay diferencias significativas en el efecto de cada muestra sobre dicho microorganismo.

Tras el análisis de los resultados, podemos decir que serían necesarios otros estudios para conocer la composición química de los propóleos ya que sus efectos farmacológicos y actividades biológicas se asocian a su composición química, y que esta varía en función de diversos factores, siendo uno de ellos su origen (Zancanela et al., 2018; Herrera et al., 2010). Igualmente, Peycheva et al. (2018) al utilizar un preparado a base de propóleos con altas concentraciones de polifenoles y flavonoides obtuvo una gran inhibición del crecimiento de *S. mutans* y *C. albicans*, mientras que, al utilizar un propóleo comercial escogido al azar, estos resultados fueron mucho menores y lo mismo ocurrió en otros estudios al analizar los propóleos estudiados que tenían altas concentraciones de estos mismos compuestos (Ristivojević et al., 2018; Kasote et al., 2017; Osés et al., 2016; Herrera et al., 2010; Funakoshi-Tago et al., 2015; Miguel., 2013). A pesar de ello, hay autores que afirman que las diferentes composiciones químicas no tienen por qué resultar en drásticas diferencias de actividad antimicrobiana (Graikou et al., 2016).

CONCLUSIONES

Ninguno de los propóleos ensayados tuvo efecto significativo en las bacterias Gram negativas ensayadas tal y como la mayoría de la bibliografía describe.

A pesar de que algunos propóleos presentaron mayor efecto antimicrobiano que otros, y que las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* fueron las más susceptibles a esta actividad, su efectividad no fue igual para los diferentes microorganismos, lo que sugiere que los propóleos son cepa-dependientes.

No se encontró relación significativa según el origen del propóleo ya que tanto los propóleos con mayor inhibición del crecimiento microbiano como los que mostraron menor efecto pertenecían a los mismos países de origen, en este caso Rumania y España.

Por otra parte, tampoco se encontró relación con la intensidad de color, ya que las muestras con mayor efecto antimicrobiano tenían tanto altos como bajos valores de intensidad de color.

A pesar de producir inhibición en el crecimiento microbiano, los propóleos demostraron no ser tan efectivos como, en este caso, la Clorhexidina, un desinfectante bucal comercial, lo que hace que los propóleos a las dosis empleadas no sean una alternativa al uso de dicho desinfectante.

Para conocer más sobre los efectos antimicrobianos del propóleo serían necesarios estudios sobre su composición química y sobre todos los componentes que lo forman, y valorar si hay relación entre el origen, así como el color de los propóleos, para así poder plantear su utilización como

prevención de enfermedades, como combinación junto a otros fármacos o a nivel de la industria alimentaria.

REFERENCIAS

- Batista, C. M., Alves, A. V. F., Queiroz, L. A., Lima, B. S., Filho, R. N. P., Araújo, A. A. S., Albuquerque R. L. C., Cardoso, J. C. 2018. The photoprotective and anti-inflammatory activity of red propolis extract in rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology*, 180, 198-207.
- Boyanova, L., Kolarov, R., Gergova, G., Mitov, I. 2006. In vitro activity of Bulgarian propolis against 94 clinical isolates of anaerobic bacteria. *Anaerobe*, 12(4): 173-177.
- Escriche, I., Juan-Borrás, M. 2018. Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. *Food Research International*, 106, 834-841.
- Funakoshi-Tago, M., Okamoto, K., Izumi, R., Tago, K., Yanagisawa, K., Narukawa, Y., Kiuchi, F., Kasahara, T., Tamura, H. 2015. Anti-inflammatory activity of flavonoids in Nepalese propolis is attributed to inhibition of the IL-33 signaling pathway. *International Immunopharmacology*, 25(1): 189-198.
- Graikou, K., Popova, M., Gortzi, O., Bankova, V., Chinou, I. 2016. Characterization and biological evaluation of selected Mediterranean propolis samples. Is it a new type? *LWT - Food Science and Technology*, 65, 261-267.
- Hendi, N. K. K., Naher, H. S., Al-Charrakh, A. H. 2011. In vitro antibacterial and antifungal activity of Iraqi propolis. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(20): 5058–5066.
- Herrera, C. L., Alvear, M., Barrientos, L., Montenegro, G., Salazar, L. A. 2010. The antifungal effect of six commercial extracts of Chilean propolis on *Candida* spp. *Ciencia e Investigacion Agraria*, 37(1): 75-84.
- Kasote, D. M., Pawar, M. V., Bhatia, R. S., Nandre, V. S., Gundu, S. S., Jagtap, S. D., Kulkarni, M. V. 2017. HPLC, NMR based chemical profiling and biological characterisation of Indian propolis. *Fitoterapia*, 122, 52-60.
- Miguel, M. G. 2013. Chemical and biological properties of propolis from the western countries of the Mediterranean basin and Portugal. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3): 403-409.

- Nam, S. H., Choi, Y. R., Jang, S. O., Shim, Y. S., Han, G. S. 2016. Antimicrobial activity of propolis on different oral bacteria. *Indian Journal of Science and Technology*, 9(15).
- Oda, H., Nakagawa, T., Maruyama, K., Dono, Y., Katsuragi, H., Sato, S. 2016. Effect of Brazilian green propolis on oral pathogens and human periodontal fibroblasts. *Journal of Oral Biosciences*, 58(2): 50-54.
- Ophori, E. A., Eriagbonye, B. N., Ugbodaga, P. 2010. Antimicrobial activity of propolis against *Streptococcus mutans*. *African Journal of Biotechnology*, 9(31), 4966–4969.
- Osés, S. M., Pascual-Maté, A., Fernández-Muiño, M. A., López-Díaz, T. M., Sancho, M. T. 2016. Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chemistry*, 196, 1215-1223.
- Pobiega, K., Kraśniewska, K., Gniewosz, M. 2019. Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review. *Trends in Food Science and Technology*, 83, 53-62.
- Peycheva, S., Apostolova, E., Gardjeva, P., Peychev, Z., Kokova, V., Angelov, A., Slavov, A., Murdjeva, M. 2018. Effect of Bulgarian propolis on the oral microflora in adolescents with plaque-induced gingivitis. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*.
- Regueira, M. S., Tintino, S. R., da Silva, A. R. P., Costa, M. do S., Boligon, A. A., Matias, E. F. F., Queiroz B. V., Menendez, I. R. A., Melo Coutinho, H. D. 2017. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. *Food and Chemical Toxicology*, 107, 572-580.
- Ristivojević, P., Dimkić, I., Guzelmeric, E., Trifković, J., Knežević, M., Berić, T., ... Stanković, S. 2018. Profiling of Turkish propolis subtypes: Comparative evaluation of their phytochemical compositions, antioxidant and antimicrobial activities. *LWT*, 95, 367-379.
- Silva, V., Genta, G., Möller, M. N., Masner, M., Thomson, L., Romero, N., Radi, R., Fernandes, D., Laurindo, F. R. M., Heizen, H., Fierro, W., Denicola, A. 2011. Antioxidant activity of Uruguayan propolis. In vitro and cellular assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12): 6430-6437.
- White Jr, J. W. 1978. Honey. In *Advances in food research*. Academic Press, 24, 287-374.