

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Estudio de la actividad antimicrobiana y antioxidante de propóleos de distintos orígenes.

TRABAJO FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

ALUMNO: Elías Rico López

TUTORA: Ana I. Jiménez Belenguer

COTUTORA: M. Isabel Escriche Roberto

Curso Académico: 2014/2015

VALENCIA, julio 2015

Tipo Licencia: Licencia Creative Commons "Reconocimiento no Comercial–Sin Obra Derivada"



TÍTULO

Estudio de la actividad antimicrobiana y antioxidante de propóleos de distintos orígenes.

RESUMEN

En este trabajo, enmarcado dentro de la seguridad alimentaria, se propone la determinación de la actividad antimicrobiana frente a un screening de 14 tipos de bacterias distintas y la determinación de la actividad antioxidante, analizando la cantidad de antioxidantes totales que presentan dichas muestras. La actividad antimicrobiana se realizó mediante la técnica de antibiogramas y la actividad antioxidante se determinó mediante la técnica del DPPH. En relación a la actividad antimicrobiana, todas las muestras de propóleo analizadas mostraron tener efecto sobre el 100% de las bacterias Gram positivas estudiadas. Por el contrario no se obtuvo inhibición en ninguna bacteria Gram negativa. Dentro de las bacterias Gram negativas estudiadas se observó inhibición sobre como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* bacterias patógenas presentes habitualmente en la industria alimentaria, evidenciando su uso potencial como aditivo en la industria agroalimentaria. En relación a la actividad antioxidante los extractos de propóleo con etanol al 70% mostraron significativamente mayor cantidad de antioxidantes totales que los extractos de etanol al 94%. Sin embargo estas diferencias no se vieron reflejadas en la actividad antimicrobiana ya que no se vio afectado el diámetro del halo de inhibición en ambos casos. Por último se relacionaron los resultados obtenidos enfrentando cantidad de antioxidantes totales y actividad antimicrobiana por tipo de muestra analizada.

Palabras clave: Propoléos, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *Staph. aureus*, *Staph. epidermis*, actividad antioxidantes, actividad antimicrobiana.

TITLE

Study of the antimicrobial activity and antioxidant of propolis of distinct origins

ABSTRACT

In this work, part of the food safety, determination of antimicrobial activity against a screening of 14 different types of microorganisms and determination of antioxidant activity is proposed by analyzing the total amount of antioxidants that have the samples. The antimicrobial activity was performed using the technique of susceptibility and antioxidant activity was determined by DPPH technique. Concerning antimicrobial activity, all samples tested showed propolis have 100% effect on Gram positive bacteria studied. By contrast no inhibition was observed in any Gram negative bacterium. In Gram-negative bacteria studied inhibition on as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* pathogenic bacteria normally present in the food industry was observed, demonstrating its potential use as an additive in the food industry in relation to the antioxidant activity of propolis extracts 70% ethanol showed significantly higher in total extracts of 94% ethanol antioxidants. Finally the results obtained were related total face amount of antioxidants and antimicrobial activity by type of sample analyzed and these results were compared with existing literature.

Key words: Propolis, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *Staph. aureus*, *Staph. epidermis*, antioxidant activity, antimicrobial activity

TÍTOL

Estudi de l'activitat antimicrobiana i antioxidant de pròpolis de diferents orígens

RESÚM

En aquest treball, emmarcat dins de la seguretat alimentària, es proposa la determinació de l'activitat antimicrobiana enfront d'un screening de 14 tipus de bacteries diferents i la determinació de l'activitat antioxidant, analitzant la quantitat d'antioxidants totals que presenten aquestes mostres. L'activitat antimicrobiana es va realitzar mitjançant la tècnica de antibiogrames i l'activitat antioxidant es va determinar mitjançant la tècnica del DPPH. En relació a l'activitat antimicrobiana, totes les mostres de pròpolis analitzades van mostrar tenir efecte sobre el 100% de les bacteries Gram positives estudiades. Per contra no es va obtenir inhibició en cap bacteri Gram negativa. Dins dels bacteris Gram negatives estudiades es va observar inhibició sobre com *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus* bacteris patògens presents habitualment en la indústria alimentària, evidenciant el seu ús potencial com a additiu en la indústria agroalimentària. En relació a l'activitat antioxidant dels extractes de pròpolis amb etanol al 70% van mostrar significativament major quantitat d'antioxidants totals que els extractes d'etanol al 94%. No obstant això aquestes diferències no es van veure reflectides en l'activitat antimicrobiana ja que no es va veure afectat el diàmetre de l'halo d'inhibició en ambdós casos. Finalment es van relacionar els resultats obtinguts enfrontant quantitat d'antioxidants totals i activitat antimicrobiana per tipus de mostra analitzada.

Paraules clau: Pròpolis, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *Staph. aureus*, *Staph. epidermis*, activitat antioxidants, activitat antimicrobiana

ALUMNO: Elías Rico López

TUTORA: Ana I. Jiménez Belenguer

COTUTORA: M. Isabel Escriche Roberto

VALENCIA, JULIO DEL 2015

Licencia Creative Commons "Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada



Agradecimientos

En primer lugar, quisiera agradecer a la Dra. Ana I. Jiménez Belenguer toda la paciencia, el esfuerzo dedicado, los consejos y las enseñanzas recibidas por su parte durante todo el tiempo que ha durado el desarrollo de este trabajo.

En segundo lugar, quisiera agradecer a la Dra. M^a Isabel Escriche Roberto por toda la paciencia, apoyo y enseñanzas recibidas por su parte.

Un especial agradecimiento a Eva M^a Domenech Antich por el apoyo y la pasión que ha demostrado por este tema.

Agradecer también a Nancy, Fabian y Alejandro, del laboratorio de Microbiología, todos los consejos y ayudas prestadas durante el tiempo de mi estancia.

Un gran agradecimiento a Laura, por estar siempre ahí, animándome en los malos momentos, ayudándome en todo lo que podía, siempre apoyándome y comprendiéndome. Así como a mi familia que siempre ha estado ayudándome en todo lo que he necesitado.

Finalmente, agradeceros a todos vosotros el trato recibido durante este periodo y el apoyo que me habéis dado, por todo ello solo me queda deciros Mil GRACIAS y os deseo lo mejor en el futuro.

Índice de acrónimos

Abreviatura	Nombre completo
μL	Microlitros
ACSA	Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CHR	Chromatography
CLSI	El instituto de normas clínicas y de laboratorio
CNE	Centro Nacional de epidemiología
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidracil
EEP	Extractos etanólicos de propóleo
EFSA	European Food Safety Authority
g	Gramos
h	Horas
L	Litros
min	Minutos
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
°C	Grados centígrados
PCA	Plate Count Agar
ppm	Partes por millón
PSB 1X	Tampon Fosfato Salino
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SIM	Sistema de Información Microbiológica
TSA	Tryptic Soy Broth Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UE	Unión Europea

Índice General

1. Introducción

1. Objetivos	1
1.1. Elaboración, Recolección y utilización del propóleo por la abeja	1
1.2. Características Físico-Químicas del propóleo	2
1.2.1. Composición y análisis físico-químicos del propóleo	2
1.3. Propiedades del propóleo	3
1.4. Actividad antioxidante	4
1.5. Actividad antimicrobiana	5
1.6. Toxiinfecciones alimentarias	7

2. Objetivos

2. Objetivos	9
2.1 Plan de trabajo	9

3. Material y Métodos

3. Material y métodos	11
3.1. Muestras de propóleos estudiadas	11
3.2. Cepas bacterianas estudiadas	11
3.2.1. Medios de cultivo	12
3.2.2. Conservación y crecimiento de las cepas estudiadas	12
3.3. Extracción y purificación de los propóleos	13
3.4. Medida de la capacidad antimicrobiana	14
3.5. Medida de la capacidad antioxidante	15
3.6. Análisis estadístico	16

4. Resultados y Discusión

4. Resultados y discusión	17
4.1. Resultados del estudio de la actividad antimicrobiana de las muestras de propóleos	17
4.2. Resultados del estudio de la actividad antioxidante de las muestras de propóleos	25
4.3. Resultados de la relación entre la actividad antioxidantes y la actividad antimicrobiana de las muestras de propóleo	27

5. Conclusión

5. Conclusiones	33
-----------------	----

6. Bibliografía y Anexos

6. Bibliografía	34
-----------------	----

Índice de Figuras

3. Material y Métodos

Figura 3.1. Diagrama de flujo del proceso de preparación de los EPP para su posterior análisis	13
Figura 3.2. Diseño del ensayo de la actividad antimicrobiana en presencia del EEP	15

4. Resultados y Discusión

Figura 4.1. Ejemplos de inhibición positiva (a) y control negativo (C-)	17
Figura 4.2. Ejemplos de inhibición positiva (a) y control negativo (C-)	17
Figura 4.3. Halos de Inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i> .	18
Figura 4.4. Halos de Inhibición de <i>Listeria innocua</i> con la presencia de un segundo halo.	19
Figura 4.5. Halos de Inhibición de <i>Bacillus subtilis</i> .	19
Figura 4.6. Halos de inhibición de <i>Micrococcus luteus</i> .	20
Figura 4.7. Halos de inhibición de <i>Bacillus cereus</i> .	20
Figura 4.8. Halos de Inhibición en <i>Staphylococcus aureus</i> .	21
Figura 4.9. Halos de Inhibición de <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	21
Figura 4.10. Diagrama box-whiskers de halos de inhibición por tipo de microorganismo	23
Figura 4.11. Variación del halo de inhibición de cada tipo de microorganismo para las distintas muestras de propóleo.	24
Figura 4.12. Variación del halo de inhibición de cada tipo de muestras de propóleo en relación al tipo de extracción.	24
Figura 4.13. Medias del valor de actividad antioxidante e intervalos LSD del ANOVA para los dos tipos de extracción.	26
Figura 4.14. Medias del valor de actividad antioxidante e intervalos LSD del ANOVA para los cuatro tipos de propóleo.	26
Figura 4.15. Análisis de la interacción entre el tipo de extracción, las muestras y la cantidad de antioxidantes totales obtenidos junto con los intervalos LSD.	26
Figura 4.16. Relación de cantidad total de antioxidantes con el diámetro de inhibición del halo para <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	29
Figura 4.17. Relación de cantidad total de antioxidantes con el diámetro de inhibición del halo para <i>Staphylococcus aureus</i> .	29
Figura 4.18. Relación de cantidad total de antioxidantes con el diámetro de inhibición del halo para <i>Micrococcus luteus</i> .	30
Figura 4.19. Relación de cantidad total de antioxidantes con el diámetro de inhibición del halo para <i>Listeria monocytogenes</i> .	30
Figura 4.20. Relación de cantidad total de antioxidantes con el diámetro de inhibición del halo para <i>Listeria innocua</i> .	31

Figura 4.21. Relación de cantidad total de antioxidantes con el diámetro de inhibición del halo para *Bacillus cereus*. 31

Figura 4.22. Relación de cantidad total de antioxidantes con el diámetro de inhibición del halo para *Bacillus subtilis*. 32

Índice de Tablas

1. Introducción

Tabla 1.1. Propiedades antioxidantes del propóleo. 4

Tabla 1.2. Principales componentes del propóleo con actividad biológica. 5

Tabla 1.3. Propiedades antimicrobianas del propóleo. 6

3. Material y Métodos

Tabla 3.1. Nomenclatura otorgada a cada muestra con sus respectivos lugares de origen. 11

Tabla 3.2. Origen de cada cepa bacteria y su subespecie. 12

4. Resultados y Discusión

Tabla 4.1. Tipos de Inhibiciones dadas por microorganismos y por tipos de extractos 18

Tabla 4.2. Diámetro de inhibición obtenido para las distintas bacterias con las distintas extracciones (70% y 94%) utilizadas por los tipos de extractos (M1, M2, M3 y M4) 22

Tabla 4.3. ANOVA multifactorial realizado para el halo de inhibición. 23

Tabla 4.4. Cantidades de antioxidantes totales presentes en las distintas muestras 25

Tabla 4.5. ANOVA multifactorial realizado para la cantidad de antioxidantes totales 25

Tabla 4.6. Cantidades de antioxidantes totales presentes en las distintas muestras relacionadas a su vez con la inhibición en cada microorganismo. 28

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

El propóleo es un material pegajoso, gomoso, resinoso, de color variable marrón verdoso, marrón oscuro, verde oscuro, amarillo verdoso, castaño, rojizo e incluso negro dependiendo de su origen. Su aroma puede ser placentero a yemas de especies arbóreas, miel, ceras y vainilla, pero también puede tener sabor amargo. Se obtiene de la recolección de las exudaciones o secreciones de origen vegetal (yemas, corteza, ramas, frutos jóvenes, etc.) realizada por la abeja (*Apis mellifera*). Estas exudaciones se mezclan con otros agentes como polen y enzimas dando lugar a una modificación física y química; posteriormente el producto es transportado al interior de la colmena.

1.1. Elaboración, Recolección y utilización del propóleo por la abeja

Cizmarik (1975) considera dos teorías para explicar la formación y el origen del propóleo. La Primera "Teoría de Rosh", indica que el propóleo es recolectado por las abejas de más de quince días de edad, las cuales toman las partículas resinosas que se localizan en las yemas y luego procesan mediante los movimientos de sus propias mandíbulas. La Segunda Teoría es la de Kustenmacher (1907), citado por Del Cueto (1994), que explica la formación y el origen como el resultado de la digestión de los granos de polen. Las obreras ingieren el polen y lo acumulan en una de las porciones del intestino. El proceso de formación comienza con la absorción de agua con la que los granos se fragmentan, luego se extrae el plasma con el que las nodrizas alimentan a sus crías y por último, a partir de la cubierta de los granos de polen se produce el bálsamo que, en forma de gotas de dos a tres milímetros, es eliminado por las abejas.

La recolección responde a un patrón específico. Las pecoreadoras mediante un proceso bioselector, detectan a través de sus antenas la resina en la fuente vegetal. Seguidamente, valiéndose de sus mandíbulas, la secreción de las glándulas salivares-mandibulares (ácido 10-hidroxidecenoico) y el primer par de patas lo maniobran para permitir el ablandamiento, trituración y posterior transporte a las cestillas o corbículas, para completar las dos cestillas requiere de 15 a 60 minutos. (González y Méndez, 1997; Kumazawa *et al.*, 2003).

Las abejas realizan las operaciones de recolección en general en días calurosos con temperaturas superiores a 20°C y entre las 10 a 15 horas aproximadamente, esto se debe a la maleabilidad del producto, ya que se endurece hasta los 15°C y se torna maleable a medida que la temperatura aumenta. Punto de fusión 60-70°C. Al ingresar a la colmena, las abejas se dirigen inmediatamente al lugar donde el propóleo es requerido y permanecen quietas, permitiendo a las abejas propolizadoras, tomar algunas partículas de la sustancia para comprimir y agregar cera para su posterior propolizado (Bedascarrasbure, 2000).

Las abejas emplean el propóleo colocándolo en forma de una delgada capa en las paredes internas de la colmena u otra cavidad en la que habiten (Salgado *et al.*, 2003). El propóleo es utilizado para obturar orificios y rajaduras, para reparar las paredes de las celdas, consolidar los componentes estructurales del interior de la colmena, aumentando la resistencia de cuadros y tabiques, evitar movimientos o vibraciones de los panales, reforzar sus bordes y para aislar la entrada de la colmena de las inclemencias climáticas y protegerla de sus enemigos (Orantes Bermejo, 2006), además de esto es utilizado en las grietas de la colmena como antimicrobiano tanto para bacterias, virus y hongos. (Bankova *et al.*, 1999; Bedascarrasbure *et al.*, 2006; Dausch *et al.*, 2007; Gustafson *et al.*, 1992; Hegazi, 2000; Salamanca *et al.*, 2000; Salgado *et al.*, 2003; Von Frisch, 1999; Whiterell, 1975).

1.2. Características Físico-Químicas del propóleo

En numerosos estudios, se ha determinado que, los constituyentes principales del propóleo son: cera, resinas, bálsamos, aceites esenciales, polen, además de impurezas orgánicas e inorgánicas denominadas genéricamente impurezas mecánicas (Campos, 1987; Asís, 1989 citado por Chaillou, 2005). La proporción de éstos es variable y depende de factores como la época de recolección, el origen vegetal de la resina y también es importante la raza de abejas (Meda y Mattos, 1994 citado por Chaillou, 2005).

La composición química del propóleo es sumamente compleja, puesto que cada región presenta condiciones de flora diversa, dependiendo de los fenómenos locales, influenciados por la temperatura, las precipitaciones, el tipo de suelo, la humedad relativa del ambiente y el brillo solar.

1.2.1. Composición y análisis físico-químicos del propóleo.

Un análisis primario de cualquier muestra de propóleo permitirá determinar, en líneas generales, la presencia de cera, íntimamente mezclada en proporciones de entre 20-30 %. Ciertas muestras obtenidas por raspado de cuadros presentan cantidades de cera algo superiores, entre 25-35%, la presencia de resinas y bálsamos aromáticos constituye del 40 al 55%, la presencia de aceites esenciales es entre el 5 y el 10%, el polen representa entre el 4 y 5% del peso de una muestra y por último las sustancias orgánicas y minerales constituyen un 5 % (Del Cueto, 1994); (Campos, 1987; Asís, 1989 (citado por Chaillou, 2005)). También se identificaron aminoácidos, ácidos alifáticos y sus ésteres, ácidos aromáticos y sus ésteres, alcoholes, aldehídos, flavonoides, agliconas, hidrocarburos, cetonas, terpenos y vitaminas.

Los análisis físico-químicos que se le realizan al propóleo para la determinación de su composición son los siguientes:

- **Cenizas:** Esta determinación se realiza por calcinación y por diferencia de peso. Se pesa una pequeña cantidad de muestra a temperatura ambiente en un crisol y se coloca en una mufla durante tres horas. Posteriormente se coloca en un desecador.
- **Humedad:** La humedad se determina empleando el método termogravimétrico. Se pesa una pequeña cantidad de muestra en una cápsula de porcelana y se coloca en una estufa durante tres horas. Luego se deposita en un desecador hasta peso constante.
- **Obtención del extracto etéreo:** Se realiza por extracción con éter de petróleo en un extractor Soxhlet. En un dedal de celulosa se pesa una pequeña cantidad de muestra, seguidamente se adiciona cierta cantidad de éter de petróleo en balones y se procede con el proceso de extracción durante 6 horas. Posteriormente se evapora el solvente a sequedad y el residuo obtenido es pesado.
- **Contenido de ceras:** El extracto etéreo seco se redisuelve en una disolución de Etanol: Agua (1:1). La disolución obtenida es refrigerada para precipitar las ceras. Seguidamente la mezcla es filtrada y el residuo obtenido se seca al aire y en estufa durante 24 horas.
- **Extracto etanólico:** Para la realización de este procedimiento se utiliza el residuo obtenido en el dedal de celulosa después de la extracción Soxhlet y se siguió el mismo procedimiento utilizando etanol al 96%.
- **Material insoluble:** Después de la obtención del extracto etanólico el residuo remanente en el dedal se seca en una estufa hasta peso constante y posteriormente se deja en un desecador.

- **Puntos de fusión:** Se determina utilizando un fusiómetro eléctrico, en el cual se coloca la muestra y se registró el rango de temperatura donde se inicia y finaliza la fusión.
- **Índice de oxidación:** Este índice se toma como el tiempo de decoloración de la solución del permanganato de potasio medido en segundos de la muestra.

1.3. Propiedades del propóleo

La miel, el polen, la jalea real, la apitoxina y el propóleo, poseen propiedades terapéuticas. La disciplina médica que emplea los productos de la colmena, para el tratamiento y la prevención de enfermedades se conoce como Apiterapia.

La actividad biológica de los propóleos permitirá clasificarlos como productos bio-activos, capaces de establecer múltiples combinaciones, sinérgicas entre sí. En la actualidad, la mayoría del propóleo se consume asociado con otros productos de la abeja (miel y polen). Su presencia proporciona una mayor actividad bacteriostática, mejorando las propiedades del producto elaborado (Molan, 1992).

Este último se lo vincula con la capacidad antimicrobiana, anestésico, cicatrizante y antiinflamatoria (Peña 2008; Sforcin *et al.*, 2002). El efecto antiinflamatorio es comparable a los efectos del Diclofenac (Fierro, 2000). En el tratamiento de heridas se observan resultados superiores a los obtenidos con cicatrizantes de origen sintético (Khayal *et al.*, 1993; Strehlet *et al.*, 1994). Se considera que los preparados a base de propóleo tienen la capacidad de acelerar la epitelización y división celular en la curación de heridas (Huasen *et al.*, 1987; Asis, 1989). Tsakoff (1975) constató el efecto anestésico del extracto hidroalcohólico del propóleo, que administrado en forma local resulta superior a la obtenida de novocaína al 1 %. Según Ramírez *et al.*, (2002) actualmente se utiliza el propóleo por sus propiedades cicatrizantes particularmente en dermatología, aunque todavía se busca conocer sus posibilidades.

Existen otras propiedades, tales como su efecto antioxidante (Peña, 2008; Simoes *et al.*, 2004), inmunoestimulante, inmunomodulador (Sforcin *et al.*, 2005) antiulceroso, anestésico local y hepatoprotector (Ghisalberti, 1978; Marcucci, 1995; Fierro, 2000). Se ha comprobado que el propóleo estimula la actividad de los macrófagos y aumenta el número de linfocitos incrementándose la respuesta inmune (De los Reyes, 1991). Fierro (2000), constató un aumento de linfocitos T (inmunidad celular), en ratones infectados con el virus de influenza de tipo A, demostrando que el propóleo estimula la inmunidad inespecífica. Su efecto positivo en patologías asmáticas es atribuido a su acción sobre el sistema inmune, pero también por su capacidad de inhibir la liberación de histamina (Miyataka *et al.*, 1998). También se ha demostrado el efecto del propóleo como antitumoral. Los propóleos verdes (Brasil), procedentes de *Baccharis dracunculifolia* se caracterizan por poseer en su composición química "Aterpillin c" (ácido 4-hidroxi-3, 5 diprenil cinámico), con características antitumorales debido a su citotoxicidad (Funari *et al.*, 2006; Matsuno *et al.*, 1997).

También se han demostrado sus características antitropanosomales, la guaianolido lactona ha demostrado poseer propiedades contra el *Trypanosoma cruzi* un importante parásito cardíaco de las zonas rurales de Brasil, Paraguay y Argentina. (Dantas *et al.*, 2006).

Ciertos tipos de propóleos actúan en la prevención de enfermedades como la arterioesclerosis, reuma e incluso cáncer (Fierro, 2000). Hishikawa *et al.*, (2005) hace referencia a la capacidad anti-arterosclerosis de los propóleos gracias a un éster del ácido caféico (cierto tipo de flavonoide).

Dadas estas propiedades, existen medicamentos a base de propóleo para el tratamiento de quemaduras y llagas, dermatosis, faringitis, rinitis, traqueítis, gingivitis, prostatitis, infecciones

de las vías urinarias y úlceras (Barros *et al.*, 2006), así como antiséptico y bactericida bucal (Fierro, 2000; Hegazi, 2000).

Todo esto revela que puede emplearse en las más variadas industrias como puede ser la farmacéutica, agrícola e incluso la alimentaria.

1.4. Actividad Antioxidante

Como ya se ha comentado con anterioridad, la composición química del propóleo es muy compleja y depende de la flora en el área donde es recolectado (Salamanca *et al.*, 2000), esta composición también depende de fenómenos locales, vinculados con la temperatura, las precipitaciones, el tipo de suelo, la humedad relativa, insolación y la evapotranspiración. En ese sentido, es necesario considerar la similitud en algunos componentes básicos de algunos vegetales, cuyas características particulares vendrán dadas por las diversas combinaciones de los elementos que las constituyen. (Osorio y Salamanca, 2002).

Los flavonoides y ácidos fenólicos son considerados los principales compuestos bio-activos del propóleo. Los más comunes en las plantas y en el propóleo son: apigenina, kaaempferol, pinocembrina, galangina, quercetina y hesperidina. Dichos compuestos poseen importantes propiedades antioxidantes, que reducen el riesgo de afecciones cardiovasculares (Hertog *et al.*, 1993) y el envejecimiento en humanos. También se ha encontrado un significativo número de diferentes azúcares, hidrocarburos y monoésteres (Bankova *et al.*, 1998, Negri *et al.*, 1998). Los compuestos fenólicos constituyen más del 50 % del peso total del propóleo. La literatura existente señala que la actividad principal es debida a los flavonoides, cerca de 4000 sustancias diferentes han sido registradas (Menezes, 2005), por eso la relación flavonoides-efecto biológico de los propóleos revela el interés de cuantificar estos constituyentes (Bruschi *et al.*, 2003).

Tabla 1.1. Propiedades antioxidantes del propóleo (Vargas *et al.*, 2013)

Bioactividad	Comentarios	Actividad
Antioxidante	Quelación de radicales e iones metálicos: poder reductor; inhibición de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) y radicales superóxidos (O ₂ ⁻), hidroxilo (HO ⁻), alcoxilo (RO ⁻), peróxido (ROO ⁻).	In vitro

El propóleo por sus propiedades físico-químicas es un antioxidante que arrastra radicales libres (Banskota *et al.*, 2000; Banskota *et al.*, 2001; Merino *et al.*, 1996; Paulino *et al.*, 2001; Peña, 2008). Kumazawa *et al.*, (2004) determinaron que los propóleos procedentes de Argentina, Australia, Brasil, Bulgaria, Chile, China (Hebei, Hubei, and Zhejiang), Hungría, Nueva Zelanda, Sud África, Tailandia, Ucrania, Uruguay, Estados Unidos y Uzbekistán se caracterizaban por presentar una alta actividad antioxidante.

Tabla 1.2. Principales componentes del propóleo con actividad biológica (Vargas *et al.*, 2013)

Bioactividad	Compuesto	Denominación IUPAC
Antioxidante	Acacetina	5,7-dihidroxi-2-(4-metoxifenil) croman-4-uno
	Ácido caféico	(E)-3-3(3,4-dihidroxifenol)-ácido 2-propenoico
	Ácido cinámico	(E)-3-fenil-ácido propil 2-enoico
	Ácido ferúlico	(E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) ácido propil-2-enoico
	Ácido sinapínico	(E)-3-(4-hidroxi-3.5-dimetoxifenil) ácido propil-2-enoico
	Ácido p-cumárico	(E)-3-(4-hidroxifenil)- ácido 2-propenoico
	Apigenina	5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-croman-4-uno
	Artepillin C	(E)-3-[4-hidroxi-3.5-bis(3-metil-2-butenil) fenil] ácido propenoico
	Éster fenetílico del ácido caféico (CAPE)	(E)-3-(3,4-hidroxifenil)- ácido 2-propenoico, 2-éster fenetílico
	Galangina	3,5,7-trihidroxi-2-fenilcroman-4-uno
	Kaempferol	3,5,7-trihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-croman-4-uno
	Pinocembrina	(2S)-5,7-dihidroxi-2-fenil-2.3-dihidrocroman-4-uno
	Quercetina	2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxicroman-4-uno
	Antimicrobiana	Ácido caféico
Ácido p-cumárico		(E)-3-(4-hidroxifenil)- ácido 2-propenoico
Crisina		5,7-dihidroxi-2-fenilcroman-4-uno
Éster fenetílico del ácido caféico (CAPE)		(E)-3-(3,4-hidroxifenil)- ácido 2-propenoico, 2-éster fenetil
Galangina		3,5,7-trihidroxi-2-fenilcroman-4-uno
Naringenina		(2S)-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-2,3-dihidrocroman-4-uno
Pinobanksina		(2R,3R)-3,5,7-trihidroxi-2-fenil-2,3-dihidrocroman-4-uno
Pinobanksina-3-acetato		[(2R,3R)-5,7-dihidroxi-4-oxo-2-fenil-2,3-dihidrocroman-3-yl] acetato
Antifúngica	Ácido caféico	(E)-3-3(3,4-dihidroxifenol)-ácido 2-propenoico
	Ácido ferúlico	E)-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil) ácido propil-2-enoico
	Ácido p-cumárico	(E)-3-(4-hidroxifenil)- ácido 2-propenoico
	Galangina	3,5,7-trihidroxi-2-fenilcroman-4-uno
	Pinocembrina	(2S)-5,7-dihidroxi-2-fenil-2.3-dihidrocroman-4-uno

1.5. Actividad Antimicrobiana

Todos los propóleos, muestran algún efecto o acción antibacteriana, tanto bactericida, que es la destrucción de la bacteria, como bacteriostática, que es el impedimento en su crecimiento, in vivo o in vitro (Kosalec *et al.*, 2005). Algunos demuestran ser efectivos en el control de microorganismos resistentes a antibióticos (Salgado *et al.*, 2003). Los principales responsables de esta propiedad son los flavonoides dentro de esta son la galangina y pinocembrina.

El efecto antibacteriano se observa principalmente sobre bacterias Gram positivos. (Lavie, 1975; Rojas, 1988). Según Cizmarik y Matel (1970) el ácido ferúlico presente en el propóleo se caracteriza por su acción frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos, contribuyendo así a la acción bactericida y bacteriostática. Papay *et al.*, (1985) comprobaron la actividad antibacteriana de las fracciones y los compuestos aislados del propóleo húngaro de yemas de álamo frente a las bacterias Gram positivas. Tanto Astudillo *et al.*, (2000) como Salazar

(2002) han determinado que muestras de propóleo de distinto origen geográfico son todas activas contra las bacterias de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Así mismo en bacterias fitopatógenicas, se ha demostrado su uso potencial como antibiótico, dado que el extracto de propóleo no es termosensible (Bianchini *et al.*, 1998). Chen *et al.*, (2007) señaló que los propóleos taiwaneses que poseen una alta actividad microbiana se presentan solamente en tres colores: verde, marrón verdoso y marrón oscuro, el color del propóleo depende casi en su totalidad al tipo de flora cercano que tenga

Tabla 1.3. Propiedades antimicrobianas del propóleo (Vargas *et al.*,2013)

Bioactividad	Comentarios	Actividad
Antimicrobiana	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7; <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Vibrio</i> <i>cholerae</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	In vitro
	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Shigella</i> y <i>Yersinia enterocolitica</i>	-
Antifúngica	<i>Absidia corymbifera</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus sulphureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida</i> <i>glabrata</i> , <i>C. kefyr</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. famata</i> , <i>C.</i> <i>pelliculosa</i> , <i>Colletrichum gloeosporioides</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Trichophyton</i> <i>mentagrophytes</i> , <i>Phytophthora capsisi</i> y <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Phytophthora</i> <i>parasítica</i> y <i>P. ohmeri</i> .	In vitro

Las propiedades antimicóticas han sido establecidas por numerosos autores como Cizmarik (1975) y Asis (1989). Rojas (1988) y Rojas *et al.*, (1991) analizó el propóleo sobre veinte cepas de hongos filamentosos y estableció la concentración media efectiva como fungicida en un 2,5 % de extracto alcohólico de propóleo. Rojas y Lugo (1988) evaluaron la acción antifúngica del extracto sobre 24 cepas de levadura del género *Candida*. Sosa *et al.*, (2000) determinaron las mismas propiedades mediante estudios experimentales in vitro en *Colletrotrichum sp.* Azevedo *et al.*, (1999) indicaron que el propóleo se puede emplear como antiséptico para el tratamiento preventivo de la candidiasis bucal. Quiroga *et al.*, (2006) encontraron que compuestos presentes en los propóleos de Tucumán (Argentina) contienen pinocembrina y galangina; compuestos con actividad antifúngica, con posible aplicación en reemplazo de agroquímicos a fin de evitar la alteración del equilibrio de los agroecosistemas.

Según Asis (1989) se ha demostrado que la serie de componentes de naturaleza flavonoides revelan una actividad antiviral bien definida. Hegazi (1997a) indicó los efectos antivirales y antifúngicos del propóleo. Se confirmó la acción antiviral frente al herpes tipo 1 y 2 y también ante el poliovirus. Se estableció que reduce la síntesis del ARN viral y sus responsables son los compuestos flavonoides (Amoros *et al.*, 1992). Harish *et al.*, (1997) estudiaron la capacidad del propóleo de suprimir la replicación del VIH-1 y su efecto inmunoestimulante. Astudillo *et al.*,

(2000) citan que la mayoría de los propóleos analizados han demostrado actividad antiviral contra el virus aviar de la Influenza. Hollands, *et al.*, (1988-B) se refiere a la actividad coccidiostática del propóleo y Zamora y Galardy (1988) confirmaron su efecto terapéutico sobre la escabiosis en conejos.

1.6. Toxiinfecciones alimentarias

Los brotes de toxiinfecciones alimentarias son infecciones o intoxicaciones en humanos provocados por el consumo de un alimento contaminado. La información sobre los brotes de toxiinfecciones alimentarias investigados en los estados miembros de la Unión Europea es recogida por éstos. Se ha establecido un nuevo sistema de información de los brotes por primera vez y se han dividido los brotes en brotes de toxiinfección alimentaria posibles y brotes de toxiinfección alimentaria verificados. Sólo se notifica información detallada al resto de estados en el caso de los brotes que se hayan verificado.

Durante el periodo comprendido entre 2007 a 2008, *Salmonella* fue la causa notificada más común de brotes de toxiinfecciones alimentarios en la UE. Los 22 estados miembros comunicaron 2.201 brotes de *Salmonella*, de los cuales el 26,8% fueron verificados. 590 de los brotes de *Salmonella* verificados afectaron a 8.922 personas, causaron 1.773 hospitalizaciones y 10 muertes. *S. Enteritidis* fue el serotipo implicado con más frecuencia (ACSA, 2007). Durante 2010 el número de casos reportados fue de 99.020 que fueron reportados por 27 países de la Unión Europea de los cuales fueron confirmados el 21.5% de los casos, estos datos supusieron un 8.8% menos que los notificados en 2009 de los cuales 62 casos produjeron la muerte por salmonelosis no typhoidea (EFSA, 2010). En 2013 se notificaron un total de 4.710 aislamientos de *Salmonella* no tifoidea procedentes de 60 laboratorios de 11 comunidades autónomas de España. *Salmonella* es una bacteria Gram negativa de la cual se conocen cerca de unos 2400 serotipos, que pueden ocasionar salmonelosis, cuyo origen puede deberse al consumo de carne cruda, huevos crudos o poco cocinados, el consumo de leche sin pasteurizar y otros productos similares o el consumo de algún alimento previamente contaminado.

Durante el año 2007 un total de 14 estados miembros de la UE notificaron 65 brotes por *E. coli* patógeno, de los cuales un 44,6% fueron verificados. 29 brotes por *E. coli* verificados afectaron a 541 personas y causaron 24 hospitalizaciones (ACSA, 2007). Durante 2010 fueron notificados 4000 casos en la UE, lo que supuso un aumento del 12% respecto al 2009 (EFSA, 2010). Durante 2007 también fueron notificadas toxinas bacterianas producidas por *Bacillus sp.*, *Clostridium sp.* o *Staphylococcus sp.* por 18 estados miembros de la UE como causa de 458 brotes, de los cuales un 93,2% fueron verificados. Los 427 brotes provocados por toxinas bacterianas verificados afectaron a 6.277 personas, con 345 hospitalizaciones y provocaron cuatro muertes (ACSA, 2007).

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva que se encuentra habitualmente en el ámbito agroalimentario, es importante seguir una buena práctica en la manipulación de los alimentos para evitar la contaminación con esta bacteria, ya que el *S. aureus* es una bacteria capaz de producir enterotoxinas estafilocócicas causantes de náuseas severas, calambres abdominales, vómitos y diarreas (ACSA, 2007).

A lo largo del año 2007 se notificaron pocos brotes provocados por otros agentes bacterianos como *Yersinia*, *Listeria*, *Shigella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*. Aunque su importancia como patógenos emergentes no hay que descuidarla (ACSA, 2007).

Durante el 2013 se notificaron un total de 143 casos de listeriosis procedentes de 33 laboratorios de 9 comunidades autónomas de España. La listeriosis es una infección grave causada por consumir alimentos contaminados con la bacteria *Listeria monocytogenes*, Es uno de los patógenos causante de infecciones alimentarias más violentos, con una tasa de mortalidad entre

un 20 a 30%, más alta que casi todas las restantes toxiinfecciones alimentarias. *L. monocytogenes* es una bacteria Gram positiva, cuya infección puede causar fiebre, dolores musculares, entre otros síntomas, recalando el alto riesgos para mujeres embarazadas y los recién nacidos, adultos mayores y personas con sistemas inmunológicos debilitados, esta infección puede deberse al consumo de leche no pasteurizada, quesos elaborados con leche sin pasteurizar y embutidos mal elaborados, entre otros (SIM, 2013).

Hoy en día uno de los grandes retos de la humanidad es la salud, para llegar a este objetivo se están buscando alimentos con mayores cualidades y calidades, buscando nuevos aditivos que conserven durante más tiempo el alimento sin alterar sus características, nuevos procesos que alteren menos las características de los alimentos, nuevos aditivos que protejan al alimento frente a actividad bacteriana y fúngica, sin efectos secundarios en el alimento y que garanticen la inocuidad al consumidor.

Con objeto de cumplir este último objetivo en las últimas décadas se han ido redescubriendo las propiedades antimicrobianas del propóleo, pudiendo así convertir este producto apícola en un complemento alimentario, aplicable en la industria agroalimentaria, capaz de hacer frente a bacterias que pueden causar toxiinfecciones alimentarias, llegando a prevenirlas o al menos disminuyendo su incidencia.

El primer paso que es el estudio de las diversas propiedades está más que documentado, lo siguiente es la investigación de distintas aplicaciones del propóleo como aditivo en la industria agroalimentaria.

OBJETIVOS

2. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo fue evaluar en propóleos de distintos orígenes geográficos la actividad antioxidante y antimicrobiana sobre *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella spp.*, *Citrobacter freundii*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*. Todos ellos patógenos alimentarios o microorganismos saprófitos que pueden deteriorar o disminuir la calidad de los alimentos.

Con el fin de alcanzar este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Extracción y purificación de propóleos de los distintos orígenes a diferentes concentraciones alcohólicas.
2. Cuantificación de la cantidad de antioxidantes totales de cada una de las muestras de propóleos mediante la técnica del DPPH.
3. Evaluación de la capacidad antibacteriana de los propóleos de los distintos orígenes sobre los microorganismos seleccionados.
4. Evaluación estadística de la posible relación entre la cantidad de antioxidantes totales y la actividad antimicrobiana.

2.1. Plan de trabajo

Para la consecución de los objetivos propuestos se planteó el siguiente plan de trabajo:

1. Revisión bibliográfica relacionada con el objeto de este estudio.
2. Extracción y purificación de las distintas muestras de propóleos:
 - 2.1. Extracción etanólica al 70% y purificación de los distintos propóleos a analizar.
 - 2.2. Extracción etanólica al 94% y purificación de los distintos propóleos a analizar.
3. Cuantificación de la cantidad total antioxidantes de los distintos extractos mediante el método del DPPH.
4. Cultivo de cepas bacterianas y preparación de inóculos.
5. Evaluación de la sensibilidad de los distintos microorganismos frente a las distintas muestras de propóleos mediante la técnica de antibiogramas.
 - 5.1. Evaluación de la sensibilidad de *Escherichia coli* frente a las distintas muestras.
 - 5.2. Evaluación de la sensibilidad de *Staphylococcus epidermis* frente a las distintas muestras.
 - 5.3. Evaluación de la sensibilidad de *Staphylococcus aureus* frente a las distintas muestras.
 - 5.4. Evaluación de la sensibilidad de *Salmonella Typhimurium* frente a las distintas muestras.
 - 5.5. Evaluación de la sensibilidad de *Salmonella spp.* frente a las distintas muestras.
 - 5.6. Evaluación de la sensibilidad *Citrobacter freundii* frente a las distintas muestras.
 - 5.7. Evaluación de la sensibilidad *Micrococcus luteus* frente a las distintas muestras.
 - 5.8. Evaluación de la sensibilidad *Listeria monocytogenes* frente a las distintas muestras.
 - 5.9. Evaluación de la sensibilidad *Listeria innocua* frente a las distintas muestras.
 - 5.10. Evaluación de la sensibilidad *Pseudomonas fluorescens* frente a las distintas muestras.

5.11. Evaluación de la sensibilidad *Bacillus cereus* frente a las distintas muestras.

5.12. Evaluación de la sensibilidad *Bacillus subtilis* frente a las distintas muestras.

6. Tratamiento estadístico de los datos para determinar la posible relación entre el tipo de extracción realizado en las distintas muestras con la actividad antimicrobiana y la cantidad de antioxidantes totales. Así mismo se realizó el tratamiento estadístico de los datos para determinar la relación entre la cantidad total de antioxidantes y la actividad antimicrobiana de las distintas muestras.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. Material y Métodos

3.1. Muestras de propóleos estudiadas

Se analizaron un total de 4 tipos de propóleos distintos, de los cuales 2 de ellos fueron productos comerciales que se pueden obtener en distintos comercios y los 2 restantes fueron obtenidos directamente de la colmena, por lo tanto no sufrieron ningún tipo de tratamiento salvo la conservación en un recipiente. Todas las muestras se obtuvieron en la comunidad valencia.

Las muestras fueron conservadas a 25°C en recipientes estériles y evitando su contacto directo con la luz hasta el momento del análisis.

A continuación se muestra en la tabla 3.1 con la nomenclatura que se le otorgaron a cada muestra, el tipo de producto que es cada muestra, su procedencia y observaciones necesarias para la distinción entre las muestras.

Tabla 3.1. Nomenclatura otorgada a cada muestra con sus respectivos lugares de origen

Muestra	Nomenclatura	Tipo de Producto	Origen	Observación
1	M1	Comercial en Tableta	Apisol	Zona de Montroy
2	M2	Propóleo Puro	Apicultor Particular	Zona de Ayora
3	M3	Comercial granulado	Sierraflor	Zona de Utiel
4	M4	Propóleo Puro	Apicultor Particular	Zona de Montroy

3.2. Cepas bacterianas estudiadas

En la realización del estudio se utilizaron 14 cepas de distintas bacterias, 2 de las cuales son de colección propia y las 12 cepas restantes son de referencia perteneciente a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), las cepas de colección propia fueron tomadas de trabajos previos, procedentes de la colección del Grupo de Investigación del Laboratorio de Microbiología de Alimentos. Se realizaron 2 pases subsecuentes en medio fresco PCA cada 24 h con el fin de obtener un cultivo en fase exponencial.

Tabla 3.2. Origen de cada cepa bacteria y su subespecie.

Bacteria		Cepa
<i>Staphylococcus</i>	<i>epidermidis</i>	CECT231
<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus</i>	CECT240
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i> Typhimurium	CECT4266
<i>Salmonella spp.</i>	-	Propia
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i>	CECT401
<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	CECT245
<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	CECT936
<i>Listeria</i>	<i>innocua</i>	CECT 90
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CECT418
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CECT101
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CECT515
<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	CECT378
<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>	CECT40
<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	Propia

3.2.1. Medios de cultivo

Se utilizaron medios de cultivo generales para los microorganismos de estudio, con el objetivo de estandarizar los resultados y evitar la variabilidad de los resultados por esta causa. Los medios de cultivo utilizados en el presente estudio fueron PCA (Plate Count Agar), TSA (Tryptic Soy Broth Agar) y TSB (Tryptic Soy Broth). El medio de cultivo PCA y el agar utilizado para el medio fueron suministrados por la casa comercial SCHARLAU S.L. y el medio TSB fue suministrado por la casa comercial Becton, Dickinson and Company.

Los medios que contenían agar fueron esterilizados en autoclave durante 15 min a 121°C, tras lo cual fueron atemperados en un baño hasta una temperatura de 45°C y posteriormente fueron distribuidos en placas de Petri estériles en una cámara de flujo continuo, para evitar cualquier tipo de contaminación y así garantizar la asepsia durante el proceso de manipulación.

Todos los medios de cultivo se conservaron en nevera a 4°C hasta su utilización y previamente a su utilización en los distintos ensayos, fueron atemperados a temperatura ambiente.

3.2.2. Conservación y crecimiento de las cepas estudiadas

Para el crecimiento de las cepas de *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes* se utilizó TSA, que se incubó a 37°C durante 24 horas en aerobiosis. Para el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus epidermis* y *Pseudomonas fluorescens* se utilizó PCA incubándolas a 28°C durante 48 horas en aerobiosis. Para el crecimiento de las cepas restantes se utilizó PCA, incubado a 37°C durante 24 horas en aerobiosis.

3.3. Extracción y purificación de los propóleos

Los extractos etanólicos de propóleo (EEP) se prepararon siguiendo el método basado en Laskar *et al.*, 2010 con ciertas modificaciones. Se tomaron $2 \pm 0,2$ g (previamente desmenuzado) de cada muestra de propóleo en condiciones de asepsia y se transfirieron a distintos botes de 50 mL estériles con tapón. Se añadieron 25 mL de etanol al 70% y 94%, respectivamente, realizando así dos tipos de extracto y se sometieron durante 72 horas a agitación constante a 25°C en oscuridad. Después de haber transcurrido el tiempo necesario se prosiguió con una filtración con papel de filtro normal y una segunda filtración con papel Wathman 3 mm CHR (papel utilizado en cromatografía), de la casa comercial Serviquimia S.L., lavando entre cada filtración 2 veces con 10 mL de etanol al 96%.

Posteriormente la parte sólida residual se sometió a un desecado en estufa a 37°C y el extracto filtrado se sometió a una evaporación en rotovapor a 40°C y 150 rpm para la concentración de la muestra y su posterior utilización para el cálculo de su actividad antioxidante y actividad antimicrobiana. Hasta su utilización dichos extractos se almacenaron a 25°C en oscuridad.

En la siguiente figura se observa un esquema simplificado del proceso.



Figura 3.1. Diagrama de flujo del proceso de preparación de los EPP para su posterior análisis.

3.4. Medida de la capacidad antimicrobiana

La evaluación de la actividad antimicrobiana de las distintas muestras de propóleo se realizó de forma cuantitativa mediante la técnica del antibiograma disco-placa, basado en la norma CLSI, por ser un método muy utilizado y aceptado para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos.

Dicho estudio se fundamenta en depositar los discos de papel secante impregnados con los distintos extractos etílicos de propóleo en la superficie de una placa en el cual se ha inoculado previamente el microorganismo de estudio. Una vez hayamos colocado el disco en la superficie del agar, el filtro absorberá el agua y el extracto difundirá de forma radial a través del espesor del agar formando un gradiente de concentración. Si existe efecto se observará un halo alrededor del disco.

Para la preparación de los inóculos se emplearon cultivos de 24 h de cada cepa (fase exponencial de crecimiento), dichos inóculos se realizaron mediante el método de suspensión directa de colonias. A partir de cada cultivo puro se tomaron varias colonias con un asa de siembra y se transfirió a un tubo con 10 mL del tampón PSB 1X. El tubo se agitó en vórtex a la máxima velocidad durante 15-20 s y se ajustó hasta una turbidez de MacFarland 2. Posteriormente se tomó una alícuota de 50 μ L de cada inóculo y se transfirió a un tubo de agar TSA semisólido fundido mantenido a 45°C, se agitó en un vórtex a la máxima velocidad (rpm) durante 10 segundos para una correcta distribución del inóculo de microorganismos y por último se vertió el contenido de dicho tubo rápidamente para evitar su solidificación en una placa de Petri con medio TSA, se hicieron movimientos circulares para favorecer su correcta distribución por toda la placa.

Los discos de papel secante de 6 mm de diámetro, suministrados por la casa comercial Filtros Anoa S.L., utilizados en el estudio fueron esterilizados en placas Petri de vidrio durante 15 minutos a 121°C y posteriormente se introdujeron en una cámara de secado para eliminar la humedad. Los discos se impregnaron con cada una de las cuatro muestras descritas a dos tipos de extracción alcohólicas, 70% y 94%, dichas impregnaciones se realizaron transfiriendo 20 μ L en los distintos discos secantes y dejando evaporar el etanol durante aproximadamente 5 min.

Una vez evaporados los discos impregnados con el extracto se depositaron sobre las placas de TSA ya inoculadas con los distintos microorganismos y éstas se incubaron a 24 ó 48 h y a 37°C ó 28°C dependiendo de las condiciones de crecimiento óptimo de cada bacteria. Se utilizó como control negativo un disco de papel secante impregnado con etanol al 94% y como control positivo se utilizó la propia placa, puesto que si había crecimiento pero no inhibición se consideró que dicha muestra no presentaba actividad. La inhibición se consideró positiva si se observaba un halo alrededor del disco impregnado y no se observa halo en el del control negativo. Los valores de los halos medidos se tomaron en mm, el valor registrado de cada halo de inhibición se realizó tomando la media de tres medidas para cada halo. Se consideró que no había inhibición cuando el valor fue de 6 mm lo que corresponde al diámetro del disco de papel. Cada ensayo se realizó por duplicado.

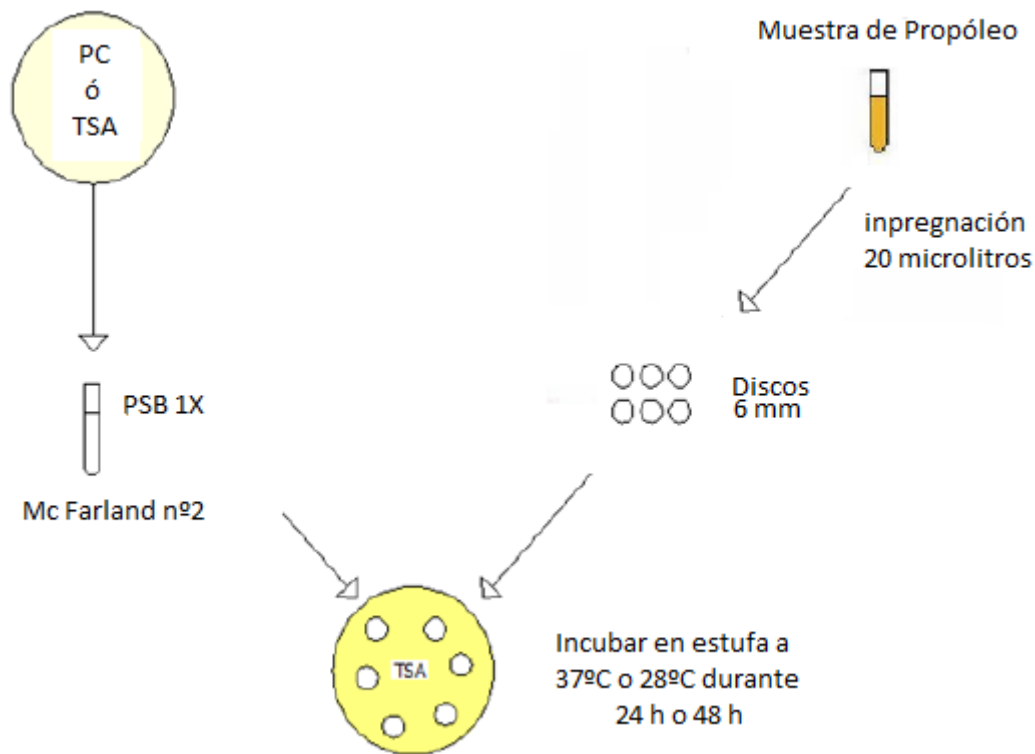


Figura 3.2. Diseño del ensayo de la actividad antimicrobiana en presencia del EEP.

3.5. Medida de la capacidad antioxidante

La actividad antioxidante (AA) del extracto etanólico de las distintas muestras de propóleo se midió según el método descrito por Shahidi *et al.* (2006) con algunas modificaciones. En este método, la intensidad del color violáceo de la disolución 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) disminuye en presencia de antioxidantes y el cambio de su absorbancia se mide espectrofotométricamente a 515 nm. A 0,1 mL de la muestra diluida en metanol se le añadieron 3,9 mL de una disolución de DPPH de 0,024 g/L y después de 30 minutos se midió la absorbancia. La actividad antioxidante (%) de las muestras de propóleo fue calculada en función de la siguiente expresión:

$$AA(\%) = \frac{At_0 - At_{30}}{At_0}$$

Donde At_0 es la absorbancia inicial del DPPH (sin muestra) y At_{30} es la absorbancia de la muestra después de 30 minutos. La medición se comparó con una curva estándar preparada con disoluciones de Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) y expresada en mg equivalentes de Trolox por gramo.

La preparación de nuestras muestras para el análisis de absorbancia se realizó, enrasando cada muestra a 50 mL con etanol en un matraz aforado, posteriormente se tomó con una pipeta electrónica 50 μ L de cada matraz aforado con cada muestras y se introdujo en un matraz aforado de 10 mL y se enraso con agua bidestilada, este paso lo realizamos para diluir la muestra debido a su alta concentración en antioxidantes, y por último se midió la absorbancia de las muestras.

La realización de la curva patrón se realizó de una disolución madre de 1000 ppm a partir de la cual realizamos una serie de diluciones para la obtención de los distintos puntos que utilizamos en dicha curva, las concentraciones tomadas fueron 10, 20, 40, 60, 80, 100 y 200 ppm.

3.6. Análisis estadístico

Se aplicó un análisis de la varianza multifactor a cada una de las variables estudiadas (diámetro de inhibición en cada microorganismo estudiado y actividad antioxidante) para evaluar la significación de la variabilidad entre los tres factores considerados: “tipo de extracción utilizado”, “tipo de microorganismo” y “tipo de propóleo”. El procedimiento LSD (Least Significance Difference) se utilizó para comprobar la existencia de diferencias estadísticas a un nivel significativo $\alpha=0,05$. El programa estadístico empleado para este estudio fue Statgraphics Centurion XVI (statpoint. Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. Resultados

Los resultados obtenidos se muestran en tres partes diferenciadas, en la primera de ellas se observan los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antimicrobiana de las distintas muestras de propóleo, en la segunda se observan los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antioxidantes y por último se estudia la relación existente entre la cantidad de antioxidantes totales presentes en cada muestras y la actividad antimicrobiana que presentan.

4.1. Estudio de la actividad antimicrobiana de las muestras de propóleos.

En el ensayo se testaron un total de 14 cepas de distintos tipos de bacterias frente a 4 muestras de propóleos de distintos origen, extraídos a 2 concentraciones de etanol distintas para comprobar su efecto. En la tabla 4.1, se muestran los resultados de inhibición obtenidos de los ensayos entre las distintas cepas de microorganismos y las distintas muestras de propóleos. Se dio como inhibición positiva aquella en la que se presenciaban halos de inhibición y no apareciera halo de inhibición en el testigo (Figuras 4.1 y 4.2).



Figura 4.1. Ejemplos de inhibición positiva (a) y control negativo (C-)

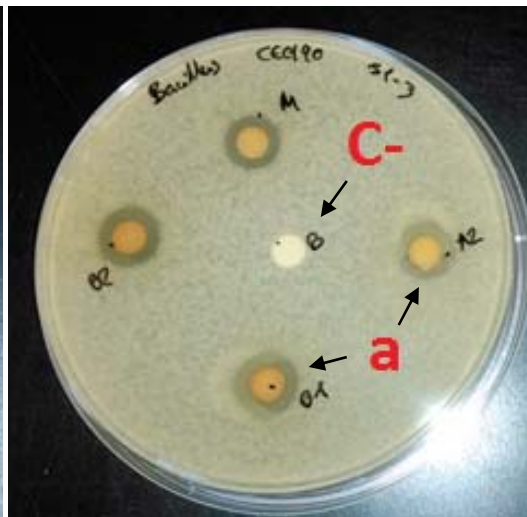


Figura 4.2. Ejemplos de inhibición positiva (b) y control negativo (C-)

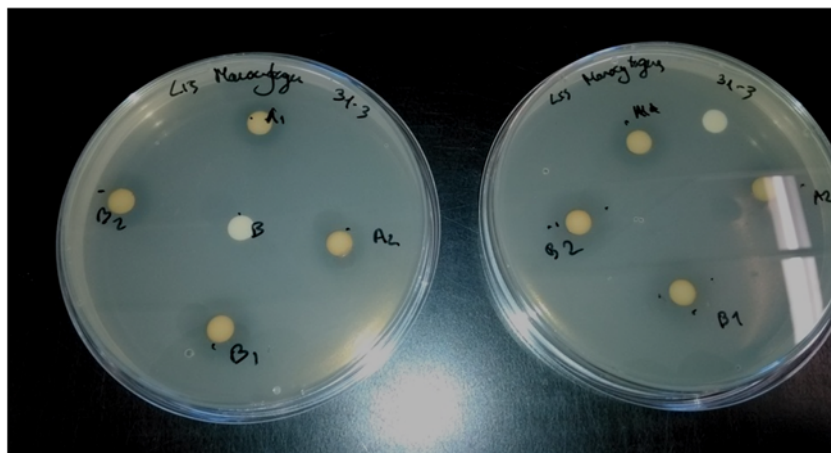
Mediante el método de inhibición empleado, disco-placa, todas las muestras inhibieron el 100% de las bacterias Gram positivas testadas. Sin embargo, en nuestro estudio dichas muestras no presentaron ningún tipo de inhibición sobre las bacterias Gram negativas ensayadas.

Tabla 4.1. Tipos de Inhibiciones dadas por microorganismos y por tipos de extractos

Microorganismos utilizados	M1		M2		M3		M4	
	70%	94%	70%	94%	70%	94%	70%	94%
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 231	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> 240	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium 4266	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i> 401	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> 245	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 936	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Listeria innocua</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> 418	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 101	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 515	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 378	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> 40	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+

Los valores obtenidos en la medida de los diámetros de los halos de inhibición se muestran en la tabla 4.3. Estos valores fueron utilizados para comprobar el efecto antimicrobiano que posee cada muestra. Los halos de inhibición más destacables se dieron en la muestra 4, en cual se dieron los diámetros de mayor tamaño. Debiéndose estos mejores resultados a la procedencia de la muestra 4 por la flora circundante de la colmena.

Todas las muestras ensayadas han mostrado efecto sobre *Listeria monocytogenes*, encontrándose la inhibición en un rango entre 9 a 13 mm de inhibición, aunque el mayor efecto lo ha mostrado tener la muestra 4 con los mayores diámetros, de 13 mm en ambas extracciones. Este resultado se considera importante debido a que es un patógeno con gran repercusión en la industria alimentaria, sobre todo en productos que no van a ser cocinados. Estos resultados coincidirían con los rangos más altos descritos en el estudio realizado por Morales *et al.*, (2008), en el cual se establecieron los rangos entre 9-12 mm y 12-16 mm.

**Figura 4.3.** Halos de Inhibición de *Listeria monocytogenes*.

Por otra parte, los valores obtenidos en la inhibición de *Listeria innocua* variaron en un rango de entre 8-12 mm, se observa que los resultados de inhibición más altos obtenidos se presentaron

en las muestras M2 y M4 provenientes directamente de la colmena. Cabe destacar que en determinadas muestras se apreció un segundo halo de inhibición como se muestra en la figura 4.4, aunque fue imposible tomar una medida debido a la poca nitidez del halo.

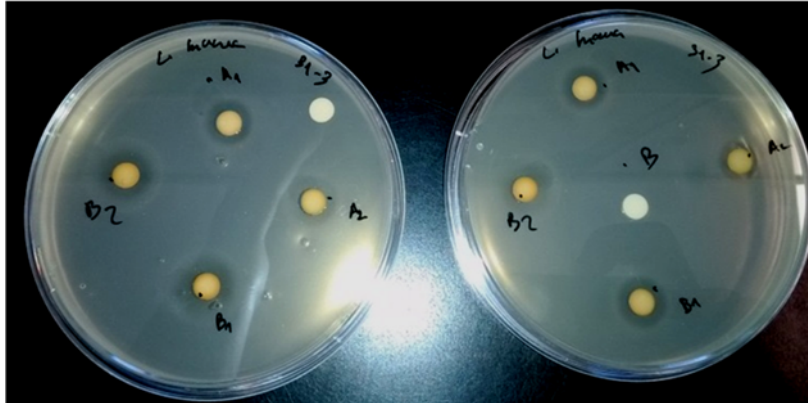


Figura 4.4. Halos de Inhibición de *Listeria innocua* con la presencia de un segundo halo.

Los resultados obtenidos en la inhibición de *Bacillus subtilis* no variaron entre las distintas muestras, estos valores oscilaron entre un rango de 7 a 8 mm de diámetro, no observándose diferencias significativas ni entre las muestras ni en el tipo de extracción utilizado. Estos resultados son inferiores a los obtenidos por Manrique 2005. En el estudio realizado por Yaghoubi *et al.*, (2007) el cual obtuvo resultados similares al nuestro, identificaron la cantidad mínima inhibitoria de esta bacteria.



Figura 4.5. Halos de Inhibición de *Bacillus subtilis*.

El rango de inhibición detectado en la bacteria *Micrococcus luteus* fue de entre 9 y 12 mm, las muestras que destacaron en la inhibición de este microorganismo fueron las muestras M3 y M4, llegando a tener 12 mm de diámetro de halo. Este resultado fue similar al realizado por Uzel *et al.*, (2005) en el cual se calcularon las concentraciones mínimas inhibitorias.



Figura 4.6. Halos de inhibición de *Micrococcus luteus*.

Los rangos de inhibición encontrados en *Bacillus cereus*, fueron muy parecidos en todas las muestras ensayadas, oscilando el rango entre 9 a 11 mm, aunque como resultado a destacar las muestras M4 y M2 fueron las que presentaron un mayor efecto inhibitorio. Menezes *et al.*, 1997 y Yaghoubi *et al.*, 2006 obtuvieron resultados similares, y además determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias y la composición de los propóleos utilizados.

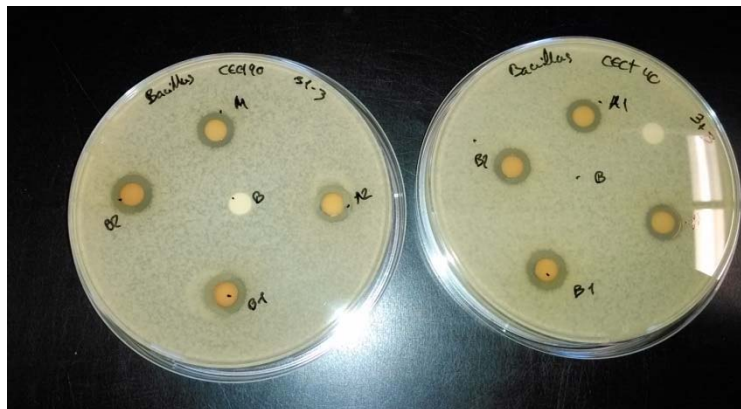


Figura 4.7. Halos de inhibición de *Bacillus cereus*.

De las inhibiciones realizadas, la bacteria que presentó un rango mayor de inhibición fue *Staphylococcus aureus* oscilando entre 11 y 14 mm. Respecto a las muestras, las M2 y M4 resultaron las más efectivas, presentando rangos de hasta 14 mm, mientras que M1 y M3, los propóleos comerciales, presentaron un efecto muy similar con diámetros de 11 mm. Los resultados fueron inferiores a los documentados por Manrique 2005. Sin embargo nuestro estudio fue similar a los estudios realizados por Yaghoubi *et al.* 2006 y por Fernandes *et al.*, 2005 en los cuales se observó el efecto frente a *Staphylococcus aureus* de muestras de propóleos y determinaron la cantidad mínima inhibitoria.

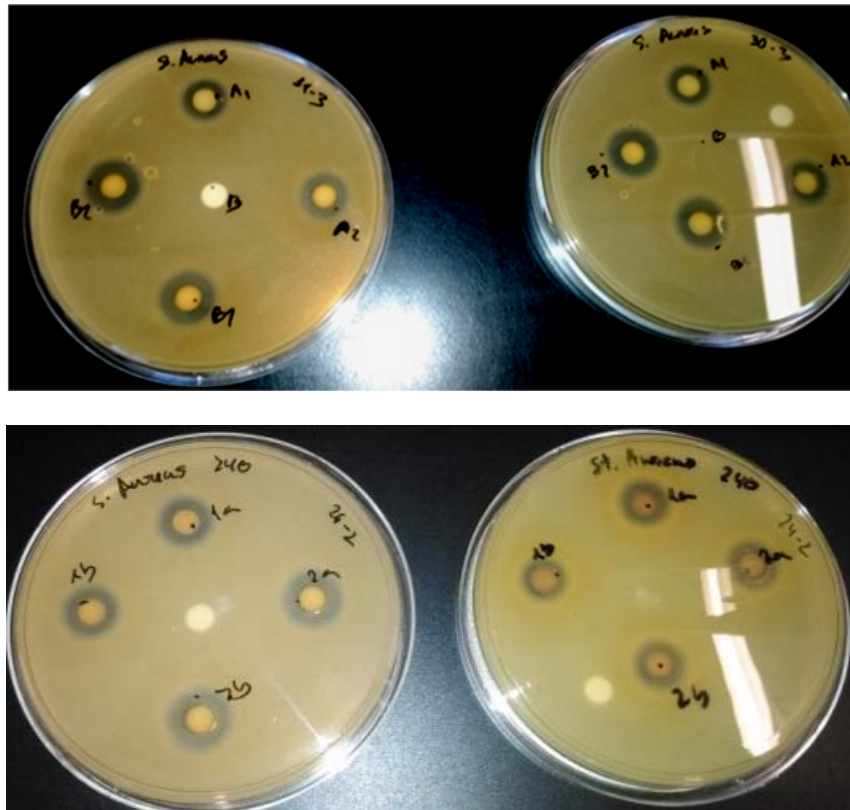


Figura 4.8. Halos de Inhibición en *Staphylococcus aureus*.

Los rangos de inhibición obtenidos en *Staphylococcus epidermidis* oscilaron entre 8 y 11 mm siendo la muestra M2 la que resultó más eficaz en su inhibición obteniéndose el diámetro más grande de los estudiados. Scazzocchio *et al.*, 2006, obtuvieron resultados acordes a este estudio calculando la cantidad mínima inhibitoria pero no el rango de inhibición para dichas concentraciones.



Figura 4.9. Halos de Inhibición de *Staphylococcus epidermidis*.

Tabla 4.2. Diámetro de inhibición obtenido para las distintas bacterias con las distintas extracciones (70% y 94%) utilizadas por los tipos de extractos (M1, M2, M3 y M4)

Microorganismos utilizados	M1				M2				M3				M4											
	70%	Media	94%	Media	70%	Media	94%	Media	70%	Media	94%	Media	70%	Media	94%	Media								
<i>Staphy. epidermidis</i> 231	9	9	9	10	9	9	11	11	11	11	10	11	8	8	8	8	8	8	9	9	9	9	9	9
<i>Staphy. aureus</i> 240	11	11	11	10	11	11	14	13	13	13	14	14	11	11	11	11	11	11	13	13	13	13	13	13
<i>S. Typhimurium</i> 4266	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i> 401	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus luteus</i> 245	10	10	10	9	10	9	11	10	11	11	9	10	11	12	12	12	12	12	12	13	12	12	13	12
<i>Listeria monocytogenes</i> 936	9	9	9	8	9	9	10	10	10	10	11	10	12	11	12	11	11	11	13	13	13	13	13	13
<i>Listeria innocua</i>	10	9	9	9	8	8	10	12	11	11	11	11	11	9	10	11	10	11	12	11	11	12	11	12
<i>Escherichia coli</i> 418	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 101	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 515	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 378	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> 40	10	9	9	10	9	10	11	11	11	10	11	10	10	10	10	10	11	10	11	11	11	11	11	11
<i>Bacillus subtilis</i>	8	8	8	7	8	7	7	7	7	7	8	7	7	8	7	7	8	7	7	8	8	8	8	8

La figura 4.10 muestra en resumen, con un diagrama de box-whiskers y para cada microorganismo, la variabilidad en el diámetro del halo de inhibición. En este diagrama se aprecia los valores medios, las medianas y el 50% de los datos (en gris). Es de destacar que el efecto es generalizado contra todas las bacterias Gram + estudiadas. Se observó que, los rangos mayores de oscilación en la inhibición se encontraron en *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Listeria innocua* y *Staphylococcus aureus*, esto es debido a la variabilidad de resultados en función de la muestra utilizada. Con relación a las Gram -, el efecto fue nulo.

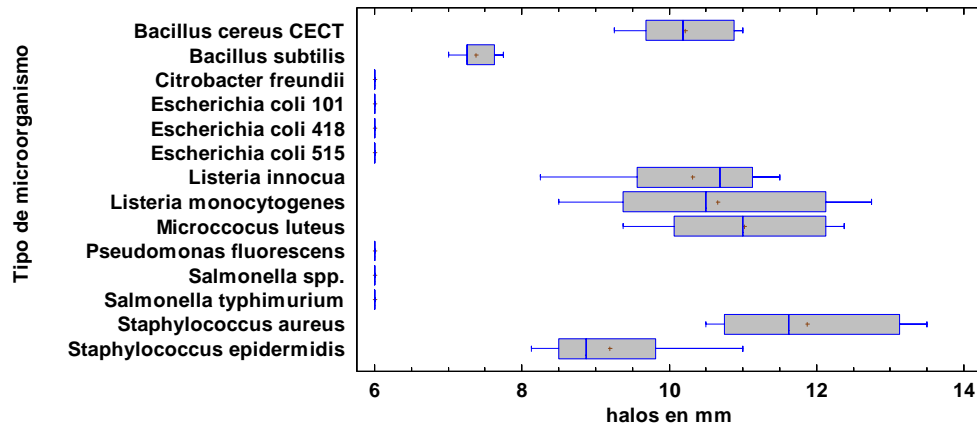


Figura 4.10. Diagrama box whiskers de halos de inhibición por tipo de microorganismo.

Se realizó un ANOVA multifactorial con el fin de evaluar si existían diferencias significativas en relación al halo de inhibición considerando los distintos microorganismos, los dos tipos de extracción aplicados y los cuatros tipos de propóleos estudiados (tabla 4.2).

La tabla 4.3 pone de manifiesto, que en relación al halo de inhibición, no existen diferencias significativas con respecto al factor “tipo de extracción” ya que el Valor-P fue mayor de 0,05. Sin embargo, el diámetro de los halos varía significativamente en función del tipo de microorganismo y el tipo de muestra de propóleo utilizado ($\alpha < 0,001$). Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Martínez et al. (2003), el cual sí realizó dos extracciones, a 70% y a 96% de etanol, en la que obtuvo diferencias significativas respecto a la actividad antimicrobiana de dichos extractos.

Tabla 4.3. ANOVA multifactorial realizado para el halo de inhibición.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: tipo de extracción	0,0113002	1	0,0113002	0,31	0,5809
B: Tipo de microorganismo	569,658	13	43,8199	1202,03	0,0000
C: Tipo de propóleo(Muestra)	13,7962	3	4,59873	126,15	0,0000
INTERACCIONES					
AB	0,146903	13	0,0113002	0,31	0,9868
AC	0,177874	3	0,0592913	1,63	0,1989
BC	44,5066	39	1,14119	31,30	0,0000
RESIDUOS	1,42174	39	0,0364548		
TOTAL (CORREGIDO)	629,719	111			

Con relación a las interacciones dobles, la tabla muestra que solo resultó significativa “tipo de microorganismo x tipo de propóleo” ($\alpha < 0,001$), es decir el halo de inhibición ocasionado para cada microorganismo varió en función del tipo de propóleo empleado. La figura 4.11 muestra de forma gráfica este hecho.

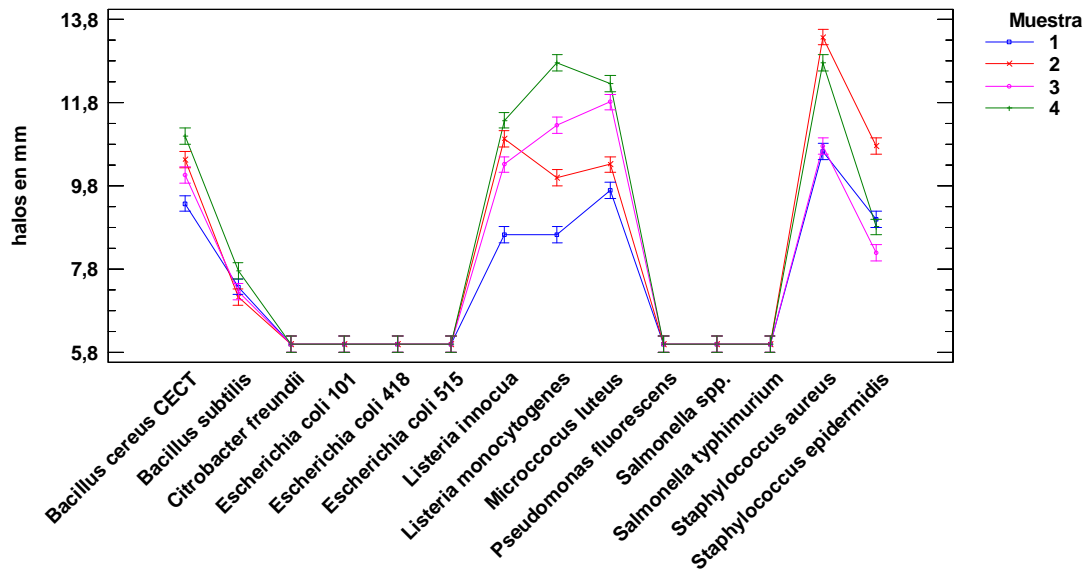


Figura 4.11. Variación del halo de inhibición de cada tipo de microorganismo para las distintas muestras de propóleo.

Las otras dos interacciones dobles no resultaron significativas, tal y como se observa en la tabla 4.3. La figura 4.12. muestra como ejemplo, que no hay diferencia en el halo de inhibición en relación al tipo de extracción, para ninguno de los tipos de propóleos considerados.

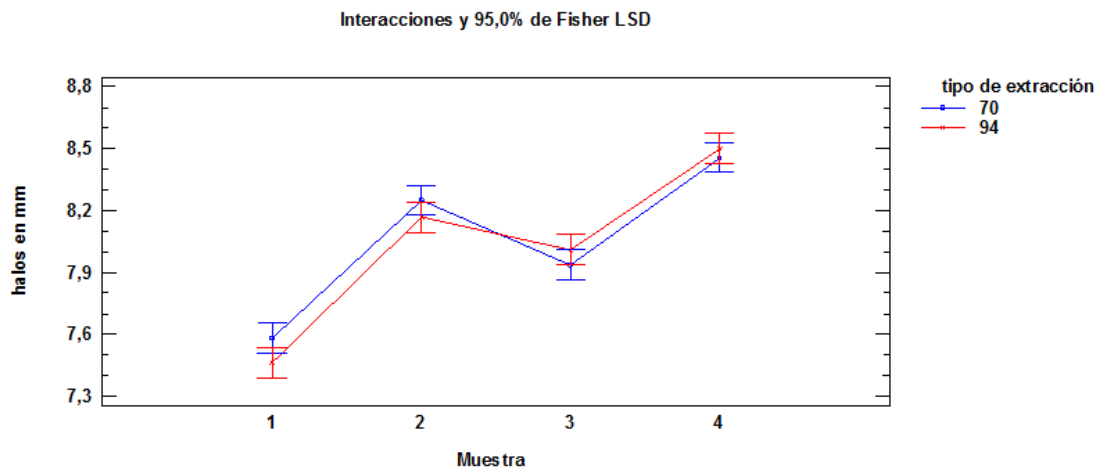


Figura 4.12. Variación del halo de inhibición de cada tipo de muestras de propóleo en relación al tipo de extracción.

4.2. Estudio de la actividad antioxidante de las muestras de propóleos.

Los valores de antioxidante total obtenido para cada muestra de propóleo (expresado en mg trolox / g muestra) y cada tipo de extracción se muestra en la tabla 4.4. La muestra M2 es la que presentó la cantidad de antioxidantes totales más alta, entre 499,97 y 511,51 mg trolox / g muestra, mientras que los valores más bajos correspondieron a M3, entre 279,41 y 246,07 mg trolox / g muestra. Este resultado es lógico ya que M2 es una muestra de propóleo puro proporcionado directamente por el apicultor y M3 es una muestra comercial. Valores intermedios mostraron M1 y M4. En este caso resulto sorprendente el resultado obtenido para M4 ya que se trata de un propóleo puro de apicultor que mostró, como anteriormente se ha visto, el mayor poder antimicrobiano.

Tabla 4.4. Cantidades de antioxidantes totales presentes en las distintas muestras

Muestras	Tipo de extracción	Media (mg trolox/g muestra)	Desviación típica (mg/g muestra)
M1	70	335,26	21,65
	94	290,43	16,66
M2	70	511,51	26,97
	94	499,97	15,62
M3	70	279,41	9,26
	94	246,07	9,86
M4	70	319,14	14,23
	94	302,42	19,76

Se realizó un ANOVA multifactorial con el fin de evaluar si existían diferencias significativas en relación a la cantidad de antioxidante, considerando los dos tipos de extracción aplicados y los cuatro tipos de propóleos estudiados (Tabla 4.5.). Esta tabla pone de manifiesto, la existencia de dichas diferencias en relación a ambos factores ya que el Valor-P en ambos casos fue menor de 0,05. De la misma manera la interacción entre ambos factores si fue significativa.

En la figura 4.13 se observa que se obtiene una mayor extracción de antioxidantes totales con etanol al 70%. Este hecho es contrario a lo observado para la actividad antimicrobiana, en la que no se mostraron diferencias significativas en relación al porcentaje de etanol aplicado. Con relación al tipo de propóleo, destaca el M2 por su mayor capacidad antioxidante, con una gran diferencia con respecto a los otros 3 (Figura 4.14).

Tabla 4.5. ANOVA multifactorial realizado para la cantidad de antioxidantes totales

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:tipo ext	19821,6	1	19821,6	431,60	0,0000
B:Muestra	973648,	3	324549,	7066,84	0,0000
INTERACCIONES					
AB					0,0000

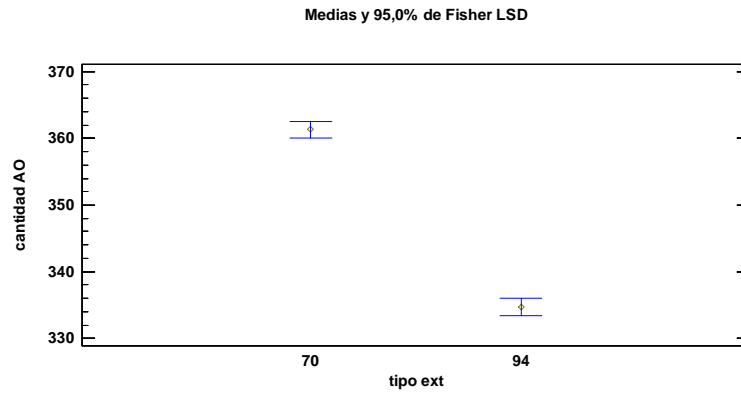


Figura 4.13. Medias del valor de actividad antioxidante e intervalos LSD del ANOVA para los dos tipos de extracción

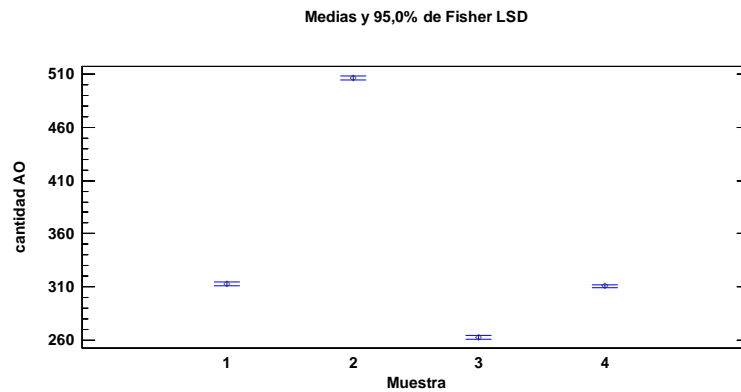


Figura 4.14. Medias del valor de actividad antioxidante e intervalos LSD del ANOVA para los cuatro tipos de propóleo

La interacción entre el tipo de extracción y las muestras de propóleo estudiadas se observa en la figura 4.15. Se obtuvo una mayor cantidad de antioxidantes totales al realizar los EEP al 70% y especialmente para M2. No se han encontrado en bibliografía resultados similares, en los que estudiaran la cantidad de antioxidantes a partir de dos porcentajes de etanol distintos en la extracción.

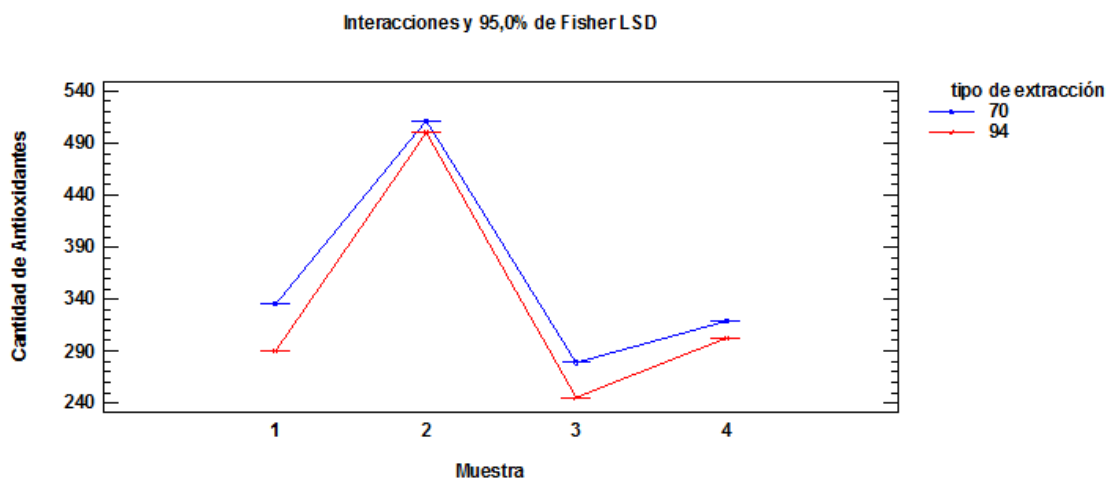


Figura 4.15. Análisis de la interacción entre el tipo de extracción, las muestras y la cantidad de antioxidantes totales obtenidos junto con los intervalos LSD.

El mayor valor que obtuvo Kumazawa *et al.*, 2003 de actividad antioxidante total en propóleo fue de $299 \pm 0,5$, menor al obtenido en el presente trabajo en la muestras M2, de mayor capacidad antioxidante.

4.3. Relación entre la actividad antioxidante y la actividad antimicrobiana de las muestras de propóleo.

El contenido de fenoles y flavonoides en propóleos es un parámetro importante que establece tanto la calidad del material como su potencial biológico, en especial para la actividad antioxidante. Se han realizado estudios en los que se ha demostrado que estos compuestos pueden actuar interrumpiendo la reacción de oxidación de lípidos, inhibiendo las reacciones de quimioluminiscencia, capturando varias especies reactivas de oxígeno. Algunos autores han demostrado que determinados compuestos con actividad antioxidante pueden tener actividad antimicrobiana (Palomino *et al.*, 2009). Por este motivo en este apartado se ha correlacionado los datos de actividad antioxidante total con la actividad antimicrobiana (diámetro de halo obtenido). En la tabla 4.6. se resumen ambos tipos de datos para todos los microorganismos y tipo de extracción.

Tabla 4.6. Cantidades de antioxidantes totales presentes en las distintas muestras relacionadas a su vez con la inhibición en cada microorganismo.

Muestra	% etanol	Media AO	desviación	medias de los halos de inhibición (mm) \pm 1 mm						
				<i>Staph. epidermis</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>
M1	70	335,26	21,65	9	11	10	9	9	9	8
	94	290,43	16,66	9	11	9	9	8	10	7
M2	70	511,51	26,97	11	13	11	10	11	11	7
	94	499,97	15,62	11	14	10	10	11	10	7
M3	70	279,41	9,26	8	11	12	12	10	10	7
	94	246,07	9,86	8	11	12	11	11	10	7
M4	70	319,14	14,23	9	13	12	13	11	11	8
	94	302,42	19,76	9	13	12	13	12	11	8

La relación entre cantidad de antioxidantes y grado de inhibición para *Staphylococcus epidermidis* se muestra en la figura 4.16. en este caso se podría destacar que la muestra más efectiva fue la muestra M2 debido a su vez a la cantidad de antioxidantes totales. Observando esta gráfica podemos decir que el diámetro de inhibición fue directamente proporcional a la cantidad de antioxidantes, por lo que a mayor cantidad de antioxidantes mayor cantidad de inhibición obtenida.

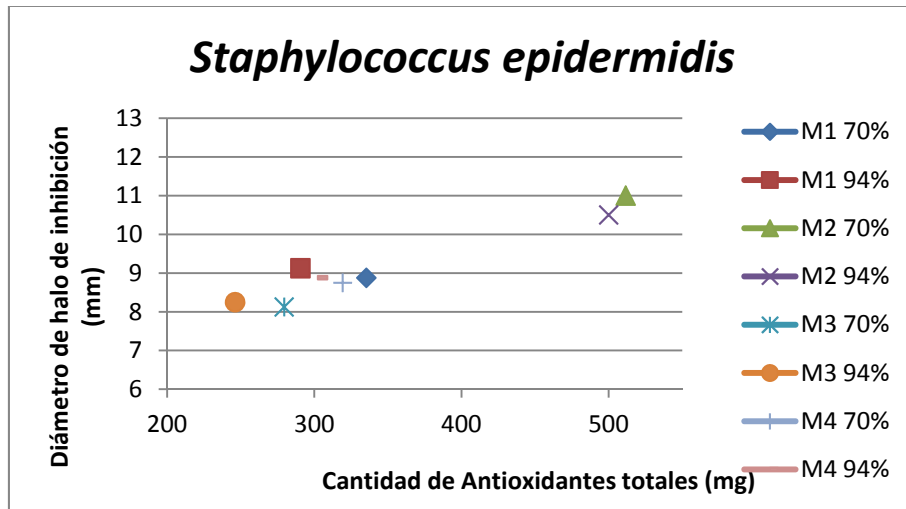


Figura 4.16. Relación de cantidad total de antioxidantes con el diámetro de inhibición del halo para *Staphylococcus epidermidis*.

La relación para *Staphylococcus aureus* se muestra en la figura 4.17, las muestras más efectivas fueron las muestra M2 y M4 aunque la cantidad de antioxidantes totales obtenidas no fueron iguales. Podemos afirmar que en este caso no se sigue una relación directa y el diámetro de inhibición tiene que ver con el tipo de antioxidante que presenta la muestra.

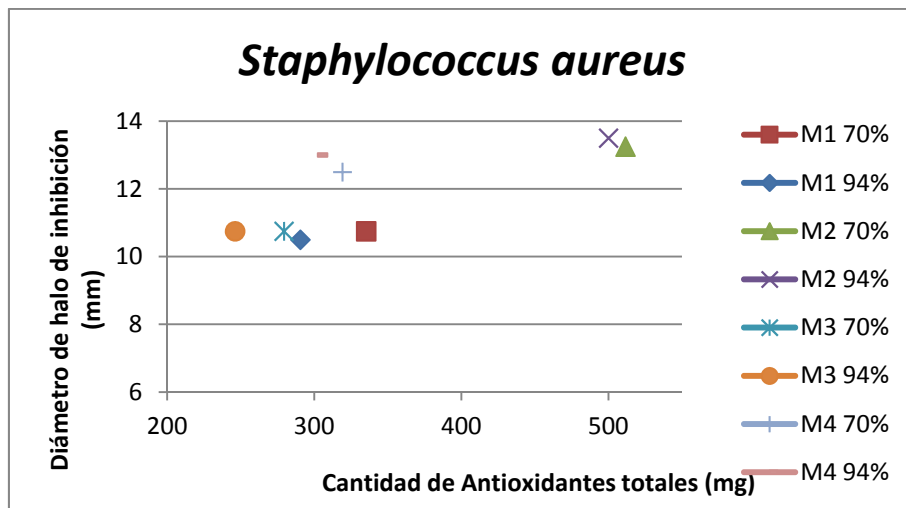


Figura 4.17. Relación de cantidad total de antioxidantes con el diámetro de inhibición del halo para *Staphylococcus aureus*.

La relación para *Micrococcus luteus* se muestra en la figura 4.18. Las muestras M3 y M4 fueron las que presentaron un mayor tamaño de inhibición y en este caso coincidió que fueron las muestras que presentaron una de las cantidades de antioxidantes totales menores. Por lo que podemos decir que el diámetro de inhibición tiene más relación con el tipo de antioxidante que presenta la muestra que con el contenido total de éstos.

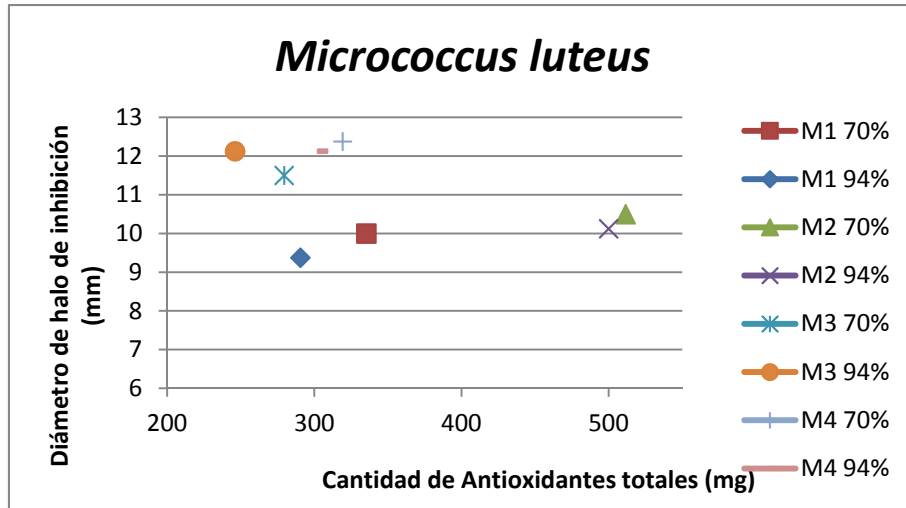


Figura 4.18. Relación de cantidad total de antioxidantes con el diámetro de inhibición del halo para *Micrococcus luteus*.

La relación para *Listeria monocytogenes* se muestra en la figura 4.19. Destacar que las muestras M3 y M4 fueron las que presentaron un mayor tamaño de inhibición (mm) y menor contenido de antioxidantes. Como ocurre en el caso anterior, podemos afirmar que el diámetro de inhibición está relacionado con el tipo de antioxidante que presenta la muestra.

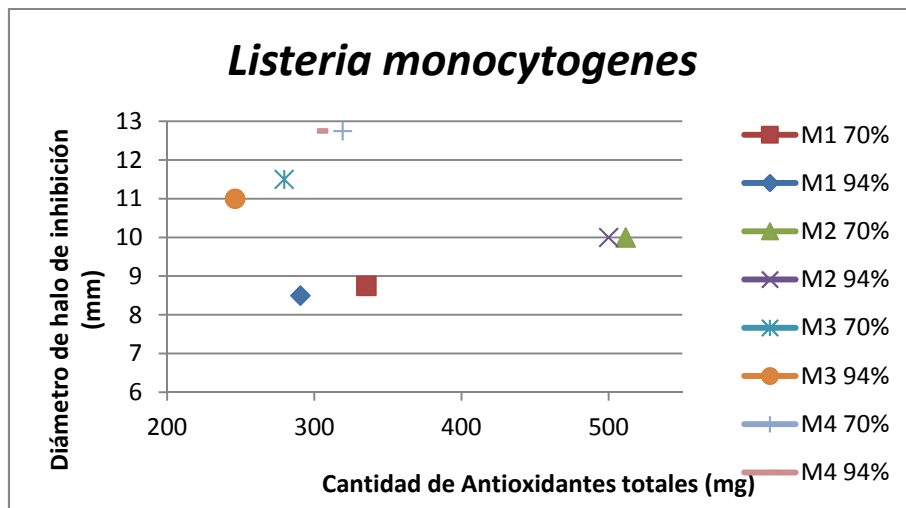


Figura 4.19. Relación de cantidad total de antioxidantes con el diámetro de inhibición del halo para *Listeria monocytogenes*.

En el caso de la relación para *Listeria innocua* que se muestra en la figura 4.20, ocurre exactamente lo mismo que en el caso de la *Listeria monocytogenes*.

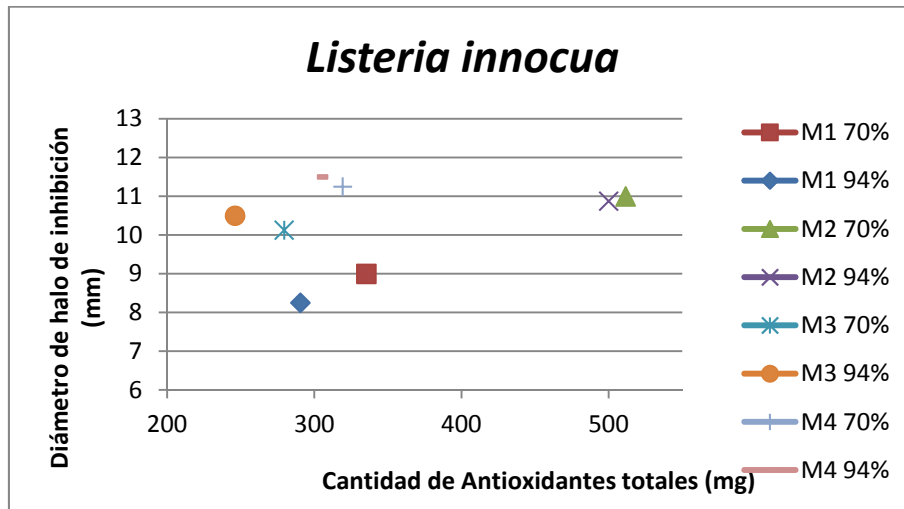


Figura 4.20. Relación de cantidad total de antioxidantes con el diámetro de inhibición del halo para *Listeria innocua*.

En el caso de *Bacillus cereus* el cual se muestra en la figura 4.21, se observa que todas las muestras presentaron una inhibición similar, aunque la cantidad de antioxidantes fuera totalmente distinta en cada muestra. Este hecho nos induce a pensar al igual que en los casos anteriores con el tipo de antioxidante que presenta la muestra.

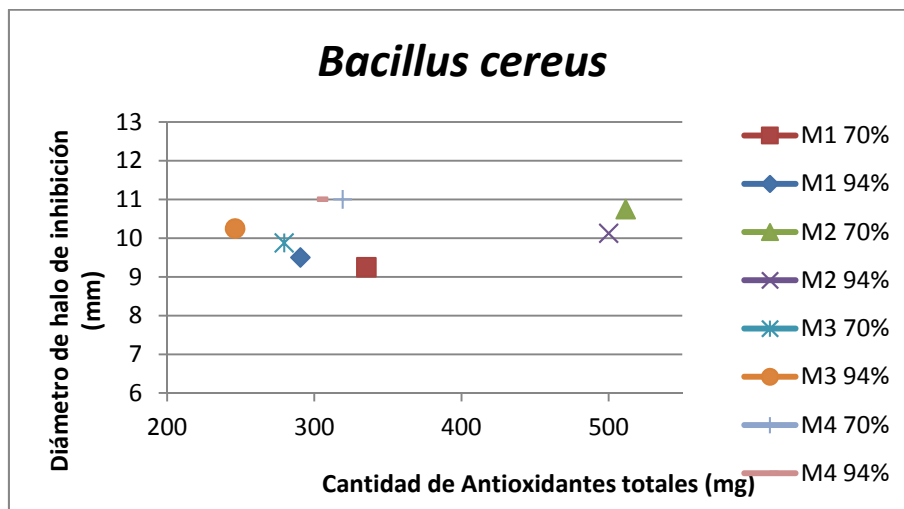


Figura 4.21. Relación de cantidad total de antioxidantes con el diámetro de inhibición del halo para *Bacillus cereus*.

Por último en el caso de *Bacillus subtilis* tal y como se muestra en la figura 4.22, todas las muestras presentaron una inhibición similar, aunque la cantidad de antioxidantes fuera bastante dispar en cada muestra. Al igual que en los casos anteriores no se sigue una relación directa entre ambos parámetros y el diámetro de inhibición está relacionado con el tipo de antioxidante que presenta la muestra.

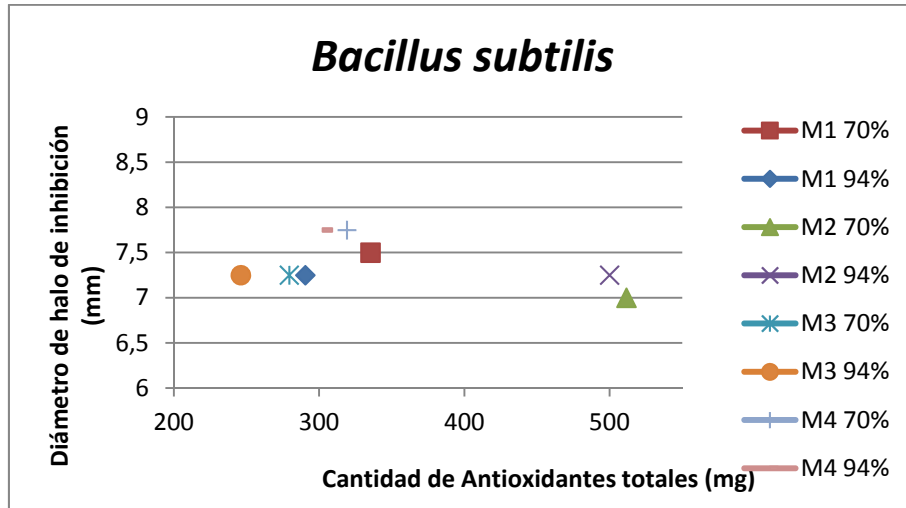


Figura 4.22. Relación de cantidad total de antioxidantes con el diámetro de inhibición del halo para *Bacillus subtilis*.

CONCLUSIONES

5. Conclusiones

- En relación a la actividad antimicrobiana, todas las muestras de propóleo analizadas han mostrado un efecto significativo en la inhibición del 100% de las bacterias Gram positivas estudiadas. Por el contrario no hubo inhibición en ninguna bacteria Gram negativa.
- Las muestras recolectadas directamente de la colmena han demostrado tener los mayores efectos antibacterianos, dependiendo del tipo de bacteria; sin embargo, las comerciales presentaron un efecto algo menor.
- Los EEP ensayados han mostrado tener efecto frente a bacterias patógenas presentes habitualmente en la industria alimentaria, como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, evidenciando su uso potencial como aditivo en la industria agroalimentaria.
- En relación a la actividad antioxidante, todas las muestras de propóleo analizadas mostraron valores importantes, especialmente una de las dos obtenidas directamente del apicultor.
- Los extractos de propóleo con etanol al 70% mostraron significativamente mayor cantidad de antioxidantes totales que los extractos de etanol al 94%. Sin embargo estas diferencias no se vieron reflejadas en la actividad antimicrobiana ya que no se vio afectado el diámetro del halo de inhibición en ambos casos.
- El efecto antimicrobiano observado para las distintas muestras de propóleo no fue directamente proporcional a la cantidad de antioxidantes presente en ellas, lo que hace pensar que el tipo de antioxidante, más que la cantidad presente, influye en el efecto antibacteriano de los propóleos.

BIBLIOGRAFÍA

- ACSA.** 2007. Informe comunitario sobre brotes de toxiinfecciones alimentarias en la Unión Europea de 2007.
- Amoros, M.; Simoes, C.; y Girre, L.** 1992. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *J. of Natural Products*, 55 (12):1732-1740.
- Antonio J. Manrique** 2005-2006 Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado Miranda, Venezuela. Efecto de la variación estacional *Zootecnia Tropical*, Vol. 24, No. 1, 2006, pp. 43-53
- Asís M.** 1989. Propóleo, el oro purpura de las abejas: Norma Ramal Cubana sobre especificaciones de Calidad del Propóleo. Centro de Información y Documentación Agropecuario, Havana, Cuba.
- Astudillo, L.; Avila, F.; Morrison, R.; Gutiérrez, M.; Bastida, J.A.; Codina, C. y Schemeda-Hirschmann, G.** 2000. Biologically active compounds from Chilean propolis. *Bol. Soc. Chil Quim.*, 45 (4): 577-581.
- Azevedo, R.; Komesu, M. y Candido, R.** 1999. Candida sp. In the oral cavity with and without lesions: maximal inhibitory dilution of propolis and periogard. *Rev. Microbiol*, 30 (4):335-341.
- B.M. Hausen, E. Wollenweber, H. Senff and B. Post** 1987 .Propolis allergy. Origin, properties, usage and literature review
- Bankova V., Boudourova-krasteva, G.; S. Forcin, J; Frete, X.; Kugujungiev, A.; Maimoni-Rodell, R.** (1999). Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from Sao Paulo state. *Zeitschrift fur Naturforsch ung*, 54 C: 401-405 (ISI).
- Bankova V., De castro S., Marucci M.** (1999). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 1:3-15.
- Bankova, V.; Christov, R. y Delgado, A.** 1998. Lignans and other constituents of propolis from the Canary Islands, *Phytochemistry*, 49:1411-1415.
- Banskota, A. H; Tezuka, Y. y Adnyana, I. K.** 2000. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *Journal of Ethnopharmacology*, Limerick, 72: 239-246.
- Banskota, A. H; Tezuka, Y. y Adnyana, I. K.** 2001. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine*, Stuttgart, 8 (1): 16-23.
- Barros, M.; Sousa, J.; Bastos, J. y Andrade, S.** 2006. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *J. Ethnopharmacol*, DOI: 10.1016/j.
- Bedascarrasbure, E; Maldonado, L.; Fierro Morales, W. y Álvarez, A.** 2006. Caracterización y normalización de propóleos argentinos. Revisión y actualización de composición y propiedades. Ed. Magna.
- Bedescarrasbure, E.** (2000). Informe del Primer año del Proyecto de caracterización físico-química de propóleos argentinos y sus extractos. PICT Nº 08-03862. IRAM esquina A3 de norma 15935- Anexo B propóleos y sus extractos.
- Bianchini, L. y Bedendo, I.** 1998. Efeito antibiótico do propolis sobre bacterias fitopatogénicas. *Sci. Agric.*, 55 (1): 149-152.
- Bruschi, M.; Franco, S. y Gremiao, M.** 2003. Application of HPLC Method for analysis of propolis extrac. *Journal of Liquid chromatography y related technologies*, 26 (14): 2399-2409.

- Chaillou, L.** 2005. Propóleos de Santiago del Estero. Características físicas y químicas. Actividad antibacteriana y antioxidante. Identificación y cuantificación de flavonoides. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía y Agroindustrias. Universidad Nacional de Santiago del Estero.
- Chen, Y.; Wu, S., Ho, K.; Lin, S.; HUANG, C. y Chen, C.** 2007. Characterisation of Taiwanese propolis collected from different locations and seasons. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88 (3): 421-419.
- Cizmarik, J. y Matel, I.** 1970. Examination of the chemical composition of propolis. *Experiencia*, 26: 713.
- Cizmarik, J.; Macicka, M. y Matel, I.** 1975. Análisis y críticas de las teorías acerca de la formación del propóleos. Rumania. *Apimondia*, pp 16-18.
- CLSI.** 2010. Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100-S20. Grebo. Capítulo 3: 6-8.
- Dantas, A.; Olivieri, B.; Gomes, F. y De Castro, S.** 2006. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. *J Ethnopharmacol*, 16; 103 (2):187-193.
- Daugusch, A.; Moraes Cleber, S.; Fort, P.; Park Yong, K.** (2007). Botanical origin of Brazilian reddish propolis and its major chemical constituents.
- De Los Reyes, R.** 1991. "Estudio del efecto inmunoregulador de un medicamento elaborado a base de propóleos en niños con trastornos de la inmunidad". In: 1er. Taller Internacional de Apiterapeúticos. La Habana, Cuba.
- Del Cueto, D. J.** 1994. Propóleos, el oro púrpura de las abejas. *Vida apícola*, 66:137-138. Buenos Aires. Argentina.
- EFSA.** 2010. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010
- Fernandes, A.; Balestrin, E.C.; Betoni, J.E.C.; De Oliveira, R.; Ribeiro, M.L. y Cezar, A.** 2005. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 100(5): 563-566.
- Fierro Morales, W.** 2000. Capacidad antioxidante de los polifenoles del propóleos. Congreso Internacional sobre Propóleos. Buenos Aires. Argentina (75-85).
- Funari, C. y Ferro, O.** 2006. Análise de propólis. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 26(1):171-178.
- Ghisalberti, E. L.** 1978. Propolis: A Review. *Bee World*, 60: 59-84.
- González, A. y Méndez, R.** 1997. Propóleos Un camino hacia la salud. La Habana, Cuba. Ed. Pablo de la Torriente. pp. 95-119.
- Gustafson, K.R.; Blunt, J.W.; Munro, M.H.; Fuller, R.W.; Mc Kee, T.C. y Cardellina, J.H.** 1992. The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea* Tetracyclon.
- H Menezes; M Bacci Jr; SD Oliveira; FC Pagnocca.** 1997. Antibacterial properties of propolis and products containing propolis from Brazil .
- Harish, Z.; Rubinstein, A.; Golodner, M.; Elmaliyah, M. y Mizrachi, Y.** 1997. Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. *Drugs Exp. Clin. Res.* 23:89-96.
- Hegazi, A. G.** 1997a. Propólis an overview. International Symposium on Apiterapy. Cairo 8-9 Th March 1997.

- Hegazi, A. G.** 2000. Propolis an overview. Congreso Internacional de propóleos. Buenos Aires. Argentina. pp. 35-53.
- Hertog, M. G. y Feskens, E. J.** 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study. *Lance*, 34: 1007-1011
- Hishikawa, K.; Nakaki, T. y Fujita, T.** 2005. Oral Flavonoid Supplementation Attenuates Atherosclerosis Development in Apolipoprotein E- Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 25: 442-446.
- Hollands, I; Torres, D y Palacios, E.** 1988b. El propóleos y sus propiedades en el tratamiento de la coccidiosis del conejo. 1er Simposio sobre los Efectos del propóleos en la Salud Humana y Animal, Varadero. Cuba. pp. 100-108.
- Khayyal, M. y Ghazaly, M.** 1993. "Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract". *Drugs under experimental y clinical research*, 16(5): 197- 203.
- Kosalec, I.; Pepeljnjak, S.; Banmaz, M. y Vladimir, K.S.** 2005. Flavonoid análisis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharm*, 55: 423-430.
- Kumazawa, S; Kamasaka, T. y Nakayam, T.** 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84 (3): 329-339.
- Kumazawa, S; Yoneda, M.; Shibata, I.; Kaneda, J.; Kamasaka, T. y Nakayam, T.** 2003. Direct Evidence for the plant Origin of Brazilian Propolis by the Observation of Honeybee Behaviour and Phytochemical Analysis. *Cherm. Pharm. Bull*; 51 (6): 740-742.
- Laskar, R.A., Sk, I., Roy, N. y Begum, N.A.** 2010. Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chem.* 122, 233–237.
- Lavie, P.** 1975. The relationship between propolis, poplar Buds (*Populus sp.*) castore. *Proc. XXV Int. Beekeeping Congr, Grenoble. Bucarest. Apimondia Publ. House*, 229-233.
- Marcucci, M. C.** 1995. Propolis: Chemical composition. Biological properties and therapeutical activity. *Apidologie*, 26:83-99.
- Matsuno, T.; Jung, S.; Matsumoto, Y.; Saito, M. y Morikawa, J.** 1997. Preferential cytotoxicity to tumor cells of 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic acid (artepillin - C). Isolated from propolis. *AnticancerRes*, 17: 3565-3568 (ISI).
- Menezes, H.** 2005. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, 72 (3): 405-411.
- Merino, N.; González, R.; González, A. y Ramirez, D.** 1996. Histopathological Evaluation on the Effect of Red Propolis on Liver Damage Induced by CCl₄ in Rats. Mexico. *Archives of Medical Research*, 27 (3): 285-289.
- Miyataka, H.; Nishik, M.; Matsumoto, H.; Fujimoto, T.; Matsuka, M.A.; Isabe, A. y Satoh, T.** 1998. Evaluation of propolis (II); effects of Brazilian and Chinese propolis on histamine release from rat peritoneal mast cells induced by compound 48/80 and ovalbumin A. *Biol Pharm Bull*.
- Molan, P.C.** 1992. The antibacterial Activity of Honey. The nature on the antibacterial activity. *Bee World*, 73 (1): 62-67.
- Morales, A.L.J; Alanis, R.; Rosas, B.T; Aceves, T.J; Contreras, M.L. y Medina, M.S.** 2008. Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de propóleos de apiarios de Jalisco contra *Listeria monocytogenes*. *Avances en la investigación científica en el Cucba*.
- Negri, G.; Marcucci, M.C.; Salatino, A. y Salatino, M.L.F.** 1998. Hydrocarbons and monoesters of propolis waxes from Brazil. *Apidologie*, 29: 305-314 (ISI).

- Orantes, F. J.** 2006. Los Propóleos en Andalucía. Grupo de Cooperación Columela - Asociación Provincial de Apicultores de Granada. Proyecto C/99/006.
- Osorio, T. y Salamanca, G.G.** 2002. Factores Climáticos Asociados al Sistema Apícola Tropical. Memorias. XXXVII. Congreso Colombiano de Ciencias Biológicas. Medellín. Colombia.
- Palomino, L.R.; García, C.M.; Gil, J.H.; Rojano, B.A. y Durango, D.L.** 2009. Determination of phenolic content and evaluation of antioxidant activity of propolis from Antioquia (Colombia). *Vitae* vol. 16 no. 3.
- Papay, V.; Toht, L. y Soltesz, M.** 1985. Actividad farmacológica de las fracciones y compuestos aislados del propóleos húngaro y las yemas de álamo. Rumania. Ed. Apimondia.. pp: 491-495.
- Paulino, N.; Carvalho, K. S. y Marcucci, M.** 2001. Avaliação da atividade antiinflamatória da própolis Plem hepatócito de rato. Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia experimental, 16. Caxambu. Anais. Caxambu: Brazilian.
- Peña, R.C.** 2008. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Cien. Inv. Agr.*, 35(1): 17-26.
- Quiroga, E.; Sampietro, D.; Soberon, J.; Sgariglia, M. y Vattuone, M.** 2006. Propolis from the northwest of Argentine as a source of antifungal principles. *J: Apil Microbiol.*
- Ramírez, C.; Rubiano, L.; Salamanca, G.G.; Clavijo, J.; Acuña, D. y Salazar, M.** 2002. "Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de propóleos sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*". Memorias XXXVII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. pp. 69-70.
- Rojas, N. y Lugo, S.** 1988. Efectos antifúngico del propóleos sobre cepas del género *Cándidas*. Primer Simposio sobre el efecto del propóleo sobre la salud humana y animal. Varadero. Cuba. pp. 42-53.
- Rojas, N.; Candelario, M. y Olivares, E.** 1991. Acción antifúngica del extracto del propóleos. Primer Simposio sobre el efecto del propóleos sobre la salud humana y animal. Varadero. Cuba, pp. 54-70.
- Salamanca, G.; Martínez, C.; Parra, E.; Martínez, T.; Rubiano, I. y Ramírez, C.** 2000. El sistema de control y puntos críticos en la extracción y beneficios de propóleos. Actas del Congreso Internacional de Propóleos. Buenos Aires. Argentina, pp. 57-65.
- Salazar, M.** 2002. Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos del propóleos sobre *Echerichia Coli* y *Staphylococcus aureus*. Memorias del XXXVII Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Colombia. pp. 69-70.
- Salgado Laurenti, C.; Sosa, A. y Pire, S.** 2003. Análisis polínico de propóleos en apiarios del Nordeste Argentino. *Apiservices*, pp. 1-3.
- Scazzocchio, F.; D'Auria, F.D.; Alessandrini, D. y Pantanella, F.** 2006. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiological Research*, Volume 161, Issue 4. pages 327–333.
- Sforcin, J.; Novelli, E. y Funari, S.** 2002. Seasonal effect of Brazilian propolis on seric biochemical variables. *J Venon. Anim. Toxins*, 8 (2): 244-254.
- Sforcin, J.; Orsi, R. y Bankova, V.** 2005. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. *J Ethnopharmacol* 98: 301- 305.
- Shahidi, F.; Liyana-Pathirana, C.M. y Wall, D.S.** 2006. Antioxidant activity of white and black sesame seeds and their hull fractions. *Food Chem.*, 99(3): 478-483.

- SIM.** 2013. Informe anual del sistema de información microbiológica 2013.
- Simões, L.; Gregorio, L.; Da Silva, A.; De Souza, M.; Azzolini, A.; Bastos, J. y Lucisano-Valim, Y.** 2004. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *J Ethnopharmacol*, 94: 59-65
- Sosa López, A.; Cebrer, M.; Avarez, C; Ramírez, S. y Rolin, H.** 2000. Búsqueda de usos alternativos del propóleos en el control de hongos fitopatógenos. *Actas de comunicaciones científicas y técnicas de la Universidad Nacional de Nordeste.*
- Sosa López, A.; Maidana, F.; Bedascarrabure, E.; Subovsky, M.; Ramírez, C. y Castillo, A.** 2000. Determinación de zinc en propóleos del nordeste argentino. *Congreso Internacional de propóleos. Memorias. Buenos Aires. Argentina, pp. 111.*
- Strehl, E.; Volpert, R.; Elsther, E.F.** 1994. "Biochemical activities of propolis extract". *Z. Naturforsch C.*, 49 (1-2): 39-43.
- Tsakoff, T.** 1975. Estudio de las propiedades anestésicas locales del propóleos y el efecto de las mismas en operaciones de perros y ovejas. *Rumania. Ed. Apimondia, pp. 162- 166*
- Uzel, A; Sorkun, K.; Öncagc, Ö.; Çoğulu, D; Gençay, Ö. y Sali'h, B.** 2005. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples.
- Vargas-Sanchez. R.D; Torrescano-Urrutia, G.R; Sanchez-Escalante, A;** 2013. El propóleos: conservador potencial para la industria alimentaria.
- Vázquez, J.C.** 2010. Caracterización botánica de los propóleos producidos en distinto origen geográfico en la Región apícola i - Cuenca del Salado, PCIA. de Buenos Aires. Tesis doctoral. Departamento de Ciencia Animal. Universidad Politécnica de Valencia.
- Von Frisch, K.** 1999. La vida de las abejas. Ed. Hemisferio Sur.
- Whitherell, P.** 1975. Otros productos de la colmena. En *Dadant e Hijos. La colmena y la abeja melífera. Ed. Hemisferio Sur.*
- Yaghoubi SMJ, Ghorbani GR, Soleimanian Zad S. y Satari R.** 2007. Antimicrobial activity of Iranian propolis and its chemical composition.
- Zamora, M. y Galardy, R.** 1988. Efecto terapéutico del propóleos para el tratamiento de la sarna en conejos. *Primer Simposio sobre los efectos del propóleos en la salud humana y animal. Varadero, Cuba. pp. 112-114*