

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Optimización de un método de obtención de extracto etanólico de propóleo en base al poder antimicrobiano

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

ELÍAS RICO LÓPEZ

ANA ISABEL JIMENEZ BELENGUER (TUTORA)
M ISABEL ESCRICHE ROBERTO (COTUTORA)

Curso Académico: 2015-2017

VALENCIA, 14 de septiembre de 2017

OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE OBTENCIÓN DE EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO EN BASE AL PODER ANTIMICROBIANO.

Elías Rico López, Isabel Escriche Roberto¹, Ana Isabel Jiménez Belenguer².

¹Instituto de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universitat Politècnica de València

²Departamento de Biotecnología. Universitat Politècnica de Valencia

RESUMEN

El propóleo es una sustancia, de aspecto resinoso, producida por la abeja (*Apis mellifera*) ampliamente utilizado por sus propiedades beneficiosas. Hay una enorme controversia en relación a la manera de obtener los extractos etanólicos del propóleo, ya que este hecho puede influir definitivamente en la mayor o menor presencia de sustancias activas en ellos. En este sentido, el objetivo del presente estudio ha sido comparar diferentes procedimientos de obtención de dichos extractos etanólicos (combinando maceración y ultrasonidos), evaluando la actividad antimicrobiana de los mismos en muestras de propóleo de diversos orígenes (Valencia y Rumanía). El análisis se llevó a cabo en 8 bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas con potencial patógeno en la industria alimentaria. La actividad antimicrobiana se analizó mediante la técnica de difusión disco placa y la cantidad mínima inhibitoria se midió mediante la realización de diluciones de las muestras. No se observaron diferencias significativas entre los diferentes procedimientos empleados para la obtención de los extractos etanólicos, por lo que se recomienda utilizar el método que implique menor tiempo y coste. Sin embargo, si se observaron diferencias significativas con respecto al tipo de propóleo. Las muestras de Valencia fueron efectivas 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 en *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, bacterias patógenas presentes habitualmente en la industria alimentaria. Este hecho pone de manifiesto que el propóleo se podría utilizar como un potencial aditivo en la industria agroalimentaria por sus propiedades antimicrobianas.

RESUM

El pròpolis és una substància, d'aspecte resinós, produïda per l'abella (*Apis mellifera*) àmpliament utilitzat per les seues propietats beneficioses. Hi ha una enorme controvèrsia en relació amb la manera d'obtenir els extractes etanòlics del pròpolis, ja que aquest fet pot influir definitivament en la major o menor presència de substàncies actives en ells. En aquest sentit, l'objectiu

d'aquest estudi ha estat comparar diferents procediments d'obtenció d'aquests extractes etanòlics (combinant maceració i ultrasons), avaluant l'activitat antimicrobiana dels mateixos en mostres de pròpolis de diversos orígens (València i Romania). L'anàlisi es va dur a terme en 8 bacteries tant Gram positives com Gram negatives amb potencial patògen en la indústria alimentària. La activitat antimicrobiana es va analitzar mitjançant la tècnica de difusió disc placa i la quantitat mínima inhibidora es va mesurar mitjançant la realització de dilucions de les mostres. No es van observar diferències significatives entre els diferents procediments emprats per a l'obtenció dels extractes etanòlics, de manera que es recomana utilitzar el mètode que impliqui menor temps i cost. No obstant això, si es van observar diferències significatives pel que fa al tipus de pròpolis. Les mostres de València van ser efectives sobre el 100% de les bacteris Gram positives estudiades; per contra, no es va obtenir inhibició en cap bacteria Gram negativa. Dins de les bacteries Gram negatives estudiades es va observar inhibició en *Staphylococcus aureus* i *Bacillus cereus*, bacteries patògenes presents habitualment en la indústria alimentària. Aquest fet posa de manifest que el pròpolis es podria utilitzar com un potencial additiu en la indústria agroalimentària per les seves propietats antimicrobianes.

ABSTRACT

Propolis is a substance, resinous in appearance, produced by the bee (*Apis mellifera*) widely used for its beneficial properties. There is a great deal of controversy as to how to obtain the ethanolic extracts of propolis, since this fact can definitely influence the presence of active substances in them. In this sense, the objective of the present study was to compare different procedures for obtaining these ethanolic extracts (combining maceration and ultrasound), evaluating the antimicrobial activity of the same in samples of propolis of different origins (Valencia and Romania). The analysis was carried out on 8 bacteria both Gram positive and Gram negative with pathogen potential in the food industry. The antimicrobial activity was analyzed using plate disc diffusion technique and the minimal inhibitory amount was measured by performing dilutions of the samples. There were no significant differences between the different procedures used to obtain ethanolic extracts, so it is recommended to use the method that implies less time and cost. However, if significant differences were observed with respect to propolis type. The Valencia samples were effective on 100% of the Gram positive bacteria studied; on the contrary, no inhibition was obtained in any Gram negative bacteria. Among the Gram negative bacteria studied, inhibition was observed in *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*, pathogenic bacteria commonly found in the food industry. This fact shows that propolis could be used as a potential additive in the agro-food industry because of its antimicrobial properties.

Key words : Propolis, *Staph. aureus*, *B. cereus*, *Staph. epidermidis*, *M. luteus*, *L. innocua* antimicrobial activity, minimum inhibitory amount, Gram positive.

INTRODUCCIÓN

El propóleo es una sustancia, de aspecto resinoso, producida por la abeja (*Apis mellifera*) a partir de secreciones de origen vegetal (yemas, corteza, ramas, frutos jóvenes, etc.) y de otros agentes como polen, cera (25-35%), aceites esenciales (5-10%), y otros componentes minoritarios (sustancias orgánicas, minerales, ácidos alifáticos y sus ésteres, ácidos aromáticos y sus ésteres, alcoholes, aldehídos, flavonoides, agliconas, hidrocarburos, cetonas, terpenos y vitaminas). (Campos, 1987; Asís, 1989; Chaillou, 2005; Vázquez, 2010). El origen geográfico y botánico, así como la climatología, temperatura, precipitaciones, suelo, humedad, etc. influyen en su composición, color (marrón verdoso, marrón oscuro, verde oscuro, amarillo verdoso, castaño, rojizo, negro) y sabor (a yemas de especies arbóreas, miel, ceras, vainilla, sabores extraños, amargos). Campos, 1987; Asís, 1989; Cueto, 1994; Chaillou, 2005).

En la actualidad, el propóleo se consume, por sus importantes propiedades terapéuticas: antioxidantes, antimicrobianas, anestésicas, cicatrizantes, antiinflamatorias, inmunoestimulantes, antiulceroso, anestésico local, hepatoprotector (Ghisalberti, 1978 Molan, 1992; Marcucci, 1995; Fierro, 2000; Sforcin et al., 2002; Peña, 2008) (Simoes et al., 2004; Sforcin et al., 2005 Peña, 2008). La actividad antiinflamatoria es comparable al efecto del diclofenaco (Fierro, 2000). El poder cicatrizante es superior al obtenido con sustancias de origen sintético (Khayal et al., 1993; Strehl et al., 1994; Ramírez et al., 2002). El propóleo en la curación de heridas es incluso capaz de acelerar la epitelización y división celular (Huasen et al., 1987; Asís, 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 %. A raíz de 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 su uso extendido como antiséptico y bactericida bucal (Fierro, 2000; Hegazi, 2000).

Todos los propóleos, muestran en mayor o menor medida, algún tipo de efecto antibacteriano, tanto bactericida (destrucción de la bacteria), como bacteriostático (impedimento del crecimiento de las bacterias), in vivo o in vitro (Kosalec et al., 2005). La Tabla 1 muestra alguno de los compuestos presentes en propóleos, con demostrada actividad biológica. Algunos de estos compuestos han demostrado ser efectivos en el control de microorganismos resistentes a antibióticos (Salgado et al., 2003).

Se estima que los flavonoides galangina y pinocembrina son unos de los principales responsables de la actividad antimicrobiana.

Tabla 1. Principales componentes del propóleo con actividad biológica (Vargas *et al.*, 2013)

Bioactividad	Compuesto	Denominación IUPAC
	Ácido caféico	(E)-3-(3,4-dihidroxifenol)-ácido 2-propenoico
	Ácido p-cumárico	(E)-3-(4-hidroxifenil)- ácido 2-propenoico
	Crisina	5,7-dihidroxi-2-fenilcroman-4-uno
	Éster fenilico 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
	Antimicrobiana	Pinobanksina
Pinobanksina-3-acetato		[(2R,3R)-5,7-dihidroxi-4-oxo-2-fenil-2,3-dihidrocroman-3-yl] acetato
Pinocembrina		(2S)-5,7-dihidroxi-2-fenil-2,3-dihidrocroman-4-uno
Quercetina		2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxicroman-4-uno
Antifúngica	Ácido caféico	(E)-3-(3,4-dihidroxifenol)-ácido 2-propenoico
	Ácido ferúlico	E)-3-(4-hidroxil-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

El efecto antibacteriano del propóleo (Tabla 2) se observa principalmente sobre bacterias Gram positivas (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.

Tabla 2. 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. kefyi</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

No existe un método estandarizado o procedimiento para la extracción de los compuestos activos del propóleo, ya que cada laboratorio aplica diferentes técnicas de extracción (Vargas *et al.*,2013), hecho que complica la comparación de los resultados. Por este motivo, en el presente trabajo, orientado y enfocado dentro del marco alimentario, se pretende aportar información sobre cuál sería el más efectivo para la extracción etanólica de compuestos activos del propóleo. Siendo este el primer paso para la estandarización o normalización de dicho proceso.

En este sentido, el objetivo general del presente trabajo ha sido valorar la efectividad de diferentes métodos de obtención de extractos etanólicos de propóleos, de distintos orígenes geográficos, evaluando la actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella spp.*, *Micrococcus luteus*, *Listeria innocua*, *Escherichia coli*, y *Bacillus cereus*. Todos ellos patógenos alimentarios o microorganismos saprófitos que pueden deteriorar o disminuir la calidad de los alimentos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de propóleos estudiadas

Se analizaron un total de 5 tipos de propóleos puros distintos obtenidos directamente de la colmena, procedente de diversas regiones de Rumania (3 muestras de la región de Suceava), y dos zonas de la Comunidad Valenciana, (Gestalgar y Montroy).

La tabla 3 muestra la nomenclatura que se le otorgaron a cada muestra, su procedencia, la región de la que se obtuvo y observaciones necesarias para la distinción entre las muestras.

Tabla 3. Nomenclatura otorgada a cada muestra con sus respectivos lugares de origen

Muestra	Nomenclatura	Origen	Región	Observación
1	16002	Rumania	Suceava	Apicultor particular
2	16004	Rumania	Suceava	Apicultor particular
3	16016	Valencia	Gestalgar	Melazahar
4	16048	Valencia	Montroy	Melazahar
5	16053	Rumania	Suceava	Apicultor particular

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

Cepas bacterianas estudiadas

En la realización del estudio se utilizaron 8 cepas de distintas bacterias (tabla 4), únicamente una de ellas era de colección propia y las 7 cepas restantes eran 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 (Plate Count Agar) cada 24 horas con el fin de obtener un cultivo en fase exponencial.

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.

Tabla 4. 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>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>	CECT245
<i>Listeria</i>	<i>innocua</i>	CECT 90
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	CECT418
<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>	CECT40

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.

Para el crecimiento de las cepas de *Listeria innocua* se utilizó TSA, que se incubó a 37°C durante 24 horas en aerobiosis. Para el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus epidermis* y 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.

Extracción y purificación de los propóleos

En este estudio se emplearon 4 tipos de extracción diferentes, a 3 concentraciones diferentes. La Tabla 5 muestra los diferentes tipos de extracción realizados en este estudio, la nomenclatura empleada a lo largo de todo el ensayo y el tiempo empleado en cada una de las etapas.

Tabla 5. Nomenclatura otorgada a cada tipo de extracción

Tipo de extracción	Nomenclatura	Abreviatura	Tiempo
Maceración	M0	M	24 h
Maceración + Maceración	M1	MMR	24 h + 24 h
Maceración + Ultrasonidos	M2	MU	24 h + 30 min
Ultrasonidos + Ultrasonidos	M3	UU	30 min + 30 min

Los extractos etanólicos de propóleo (EEP) se prepararon siguiendo el método basado en Laskar et al., 2010 con ciertas modificaciones. En todos los casos se tomaban $1 \pm 0,01$ g de propóleo, previamente pulverizados en condiciones de asepsia, y se añadían 30 mL de etanol al 70%. Una vez realizado este paso, se prosiguió de diversa forma en función del tipo de extracción:

- 1) M0: se colocaba en agitación durante 24 horas en oscuridad) y posteriormente se filtraba (papel Wathman 3mm CHR, Serviquimia S.L.)lavandoentre cada filtración 2 veces con 10 mL de etanol al 70% y llevando el volumen final de muestra a 100 mL.
- 2) M1: se siguieron los mismos pasos descritos para el método M0, añadiendo después de este segundo proceso de filtración, una centrifugación durante 5 min a 5000 rpm,a 5°C. Una vez centrifugado, el sobrenadante se volvía a disolver en 30 mL de etanol al 70% y se volvía a someter a un proceso de maceración durante 24 h, tal y como se ha descrito anteriormente.
- 3) M2: se llevó a cabo siguiendo todo el procedimiento seguido en el proceso M0, realizando un proceso adicional de ultrasonidos durante 30 minutos a temperatura ambiente y filtración con filtro Wathman 3mm CHR.
- 4) M3: Una vez el propóleo en etanol, someterlo a un proceso de ultrasonidos durante 30 min y temperatura ambiente, una vez realizado este proceso, haremos una centrifugación y un filtración, a las condiciones antes descritas y por último un proceso de ultrasonidos durante 30 min.

Todas estos extractos se llevaron a un volumen final de 100 mL y se evaporaron en rotavapor a 40°C y 150 rpm hasta alcanzar la dilución 1/10 y su posterior dilución a las concentraciones 1/50 y 1/100 para la evaluación de la actividad antimicrobiana.

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 de difusión disco-placa, basado en la norma CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), (CLSI, 2014) método de disco-placa del CLSI, por ser un método muy utilizado y aceptado para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos. Este 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 se colocaba el disco en la superficie del agar, el filtro absorbía el agua y el extracto difundía de forma radial a través del espesor del agar formando un gradiente de concentración. Si existía 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 McFarland₂. Posteriormente se tomó una alícuota de 50 µL 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 homogeneización del inóculo de microorganismos y por último se vertió el contenido de dicho tubo rápidamente 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 Anويا 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 cinco muestras descritas a los cuatro tipos de extracción alcohólicas, M0, M1, M2 y M3, todas ellas al 70%, dichas impregnaciones se realizaron transfiriendo 20 µL 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 70% 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. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Análisis estadístico

Se aplicó un análisis de la varianza multifactorial (ANOVA) a cada una de las variables estudiadas (diámetro de inhibición en cada microorganismo estudiado) 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 =0,05. El programa estadístico empleado para este estudio fue Statgraphics Centurion XVI (statpoint. Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). Se analizaron un total de 4 tipos de propóleos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos al enfrentar los propóleos frente a los microorganismos se muestran en las tablas 6. Se dio como inhibición positiva aquella en la que se presenciaban halos de inhibición y no apareciera halo de inhibición en el testigo (Figura 1).

Mediante el método de inhibición empleado, disco-placa, las muestras 16016, 16048 y 16053 mostraron halo de inhibición en todas las cepas de bacterias Gram positivas testadas. Mientras que las muestras 16002 y 16004 solo presentaron inhibición en el género *Staphylococcus* y en valores muy bajos. Sin embargo, en el presente estudio ninguna de las muestras de propóleo estudiadas presentó efecto de inhibición sobre las bacterias Gram negativas ensayadas.

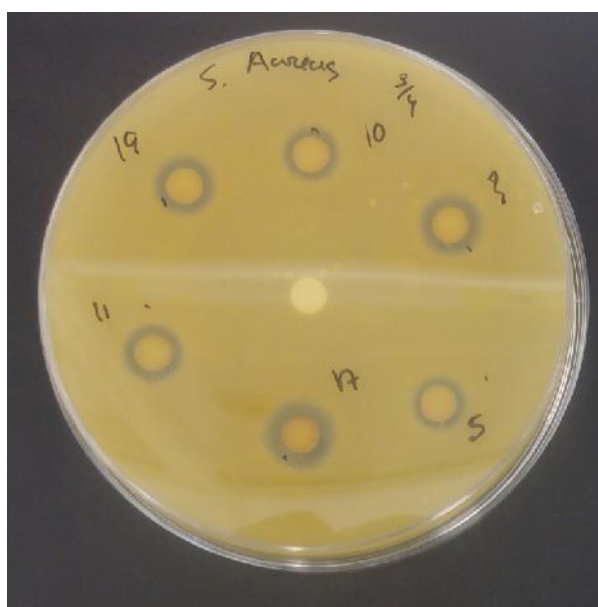


Figura 1. Placa inoculada donde se observa inhibición positiva en todas las muestras.

La medida de los diámetros de los halos de inhibición se muestra en la tabla 6. Estos valores indican el efecto antimicrobiano que posee cada muestra de propóleo. El valor de 6 mm, corresponde al propio diámetro del disco y no indica inhibición. Los halos de inhibición más destacables se dieron en la muestra 16048, en la cual se observaron los mayores diámetros (8,71 mm).



Tabla 6. Resultados de los halos en mmpara las diferentes muestras: 16002,16004 y16016.

Dilución	16002											
	Dilución 1/10				Dilución 1/50				Dilución 1/100			
Tipo de extracción	M0	M1	M2	M3	M0	M1	M2	M3	M0	M1	M2	M3
<i>Stafilococcus epidermidis 231</i>	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Stafilococcus aureus 240</i>	6,75	6,50	6,50	6,50	6,00	6,00	6,00	6,50	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Salmonella typhimurium 4266</i>	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Salmonella spp.</i>	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Micrococcus luteus 245</i>	6,50	6,50	6,50	6,50	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Listeria innocua</i>	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Escherichia coli 418</i>	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Bacillus cereus CECT 40</i>	6,50	6,50	6,50	6,50	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
16004												
<i>Stafilococcus epidermidis 231</i>	6,00	7,25	7,25	7,25	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Stafilococcus aureus 240</i>	7,00	7,00	7,00	7,00	6,00	6,50	6,50	6,50	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Salmonella typhimurium 4266</i>	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Salmonella spp.</i>	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Micrococcus luteus 245</i>	6,50	6,50	6,50	6,50	6,00	6,50	6,00	6,50	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Listeria innocua</i>	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Escherichia coli 418</i>	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Bacillus cereus CECT 40</i>	6,00	6,50	6,50	6,50	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
16016												
<i>Stafilococcus epidermidis 231</i>	9,00	7,50	7,50	7,50	6,50	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Stafilococcus aureus 240</i>	10,75	10,00	10,50	10,50	10,00	9,00	8,50	8,50	7,75	8,00	7,50	7,50
<i>Salmonella typhimurium 4266</i>	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Salmonella spp.</i>	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Micrococcus luteus 245</i>	9,00	9,50	9,00	9,00	7,00	7,50	7,00	7,50	6,50	6,00	6,00	6,00
<i>Listeria innocua</i>	8,50	7,50	7,50	7,50	7,50	6,00	6,00	6,00	6,50	6,00	6,00	6,00
<i>Escherichia coli 418</i>	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Bacillus cereus CECT 40</i>	10,00	9,50	9,00	9,50	8,00	7,50	7,50	8,00	6,75	6,50	6,50	6,50
16048												
<i>Stafilococcus epidermidis 231</i>	9,50	8,50	8,50	8,50	7,00	8,50	8,50	8,50	6,50	8,00	7,50	7,50
<i>Stafilococcus aureus 240</i>	11,50	11,50	11,50	11,50	9,25	11,00	10,00	9,00	8,00	10,00	9,50	9,00
<i>Salmonella typhimurium 4266</i>	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Salmonella spp.</i>	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Micrococcus luteus 245</i>	10,00	9,00	10,00	9,00	8,00	9,00	8,50	8,50	6,00	7,50	8,00	7,50
<i>Listeria innocua</i>	9,00	9,00	8,50	8,50	7,25	8,50	8,00	8,00	6,50	8,00	8,00	7,50
<i>Escherichia coli 418</i>	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Bacillus cereus CECT 40</i>	10,75	10,00	10,00	10,00	9,00	9,50	9,00	9,00	7,00	7,50	8,00	6,50
16053												
<i>Stafilococcus epidermidis 231</i>	8,25	8,00	8,00	8,00	6,00	6,50	6,50	6,50	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Stafilococcus aureus 240</i>	10,25	7,50	7,00	7,50	8,50	6,50	6,50	6,50	7,50	6,00	6,00	6,00
<i>Salmonella typhimurium 4266</i>	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Salmonella spp.</i>	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Micrococcus luteus 245</i>	8,50	6,50	6,50	6,50	7,50	6,00	6,00	6,00	6,50	6,00	6,00	6,00
<i>Listeria innocua</i>	8,00	7,50	7,50	7,50	6,50	7,00	7,00	7,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Escherichia coli 418</i>	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Bacillus cereus CECT 40</i>	9,25	7,00	6,50	7,00	7,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00

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 cuatro tipos de extracción aplicados, las tres diluciones realizadas y las cinco muestras de propóleos estudiados.

El estudio estadístico 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 ($<0,001$). Por último, mencionar que sí existen diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes diluciones utilizadas, esto es lógico puesto que disminuimos la cantidad de compuestos que tienen efecto sobre los microorganismos y reducimos su concentración por debajo de la concentración mínima inhibitoria para ese microorganismo.

Para las muestras analizadas, sí encontramos que existen diferencias estadísticamente significativas, siendo la muestra 16048 la que mayores diferencias presentó, como puede observarse en la figura 2.

Medias y 95,0% de Fisher LSD

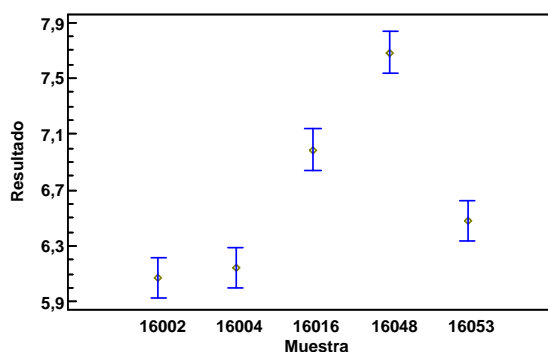


Figura 2. Diagrama de Fisher para los tipos de muestras.

En la figura 3 vemos cómo con respecto al tipo de extracción, no se observaron diferencias significativas, sin embargo, si profundizamos en los datos la extracción M0, tiene un valor mayor en los halos de inhibición, aunque no sean estadísticamente significativo.

Medias y 95,0% de Fisher LSD

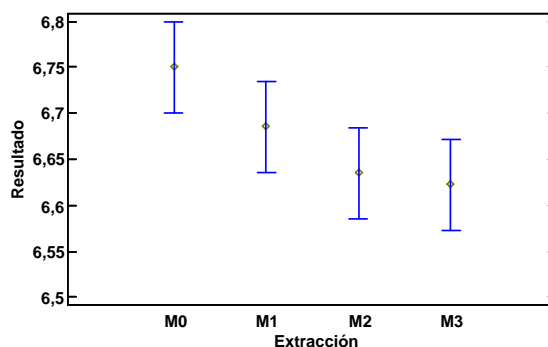


Figura 3. Diagrama de Fisher para los tipos de extracción.

Para la variable "dilución", se observaron diferencias estadísticamente significativas, entre la dilución 1/10 y las demás, lo cual es lógico ya que es la dilución más concentrada (Figura 4).

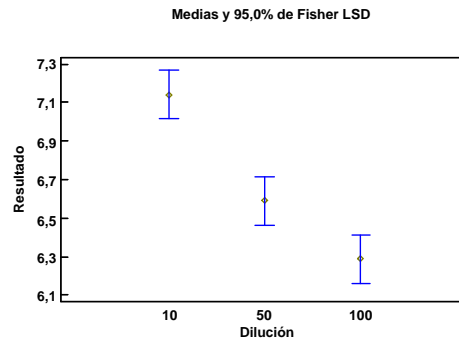


Figura 4. Diagrama de Fisher para los tipos de dilución.

Con relación a las interacciones dobles, la tabla muestra que solo resultó significativa "tipo de microorganismo por tipo de muestra" siendo $<0,001$, es decir el halo de inhibición ocasionado para cada microorganismo varió en función del tipo de muestra empleado, como se observa en la figura 5. Esto quiere decir, que dependiendo del tipo de muestra que estemos empleando para el mismo tipo de microorganismo, estadísticamente se observa que existen diferencias significativas en el efecto que tienen las cinco muestras sobre el mismo microorganismo. Este hecho manifiesta que los distintos orígenes de los propóleos están en relación directa con su composición en sustancias antioxidantes y por tanto con su actividad antimicrobiana.

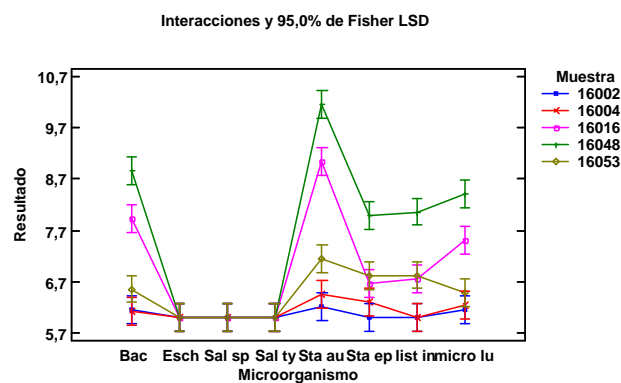


Figura 5. Interacciones dobles entre muestras y tipo de microorganismos.

Las otras dos interacciones dobles no resultaron significativas, tal y como se observa en el estudio estadístico. La figura 6 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. Este hecho puede ser debido a que la variación en los distintos componentes debido a la dilución

de los mismos no influye tanto en la actividad antimicrobiana, posiblemente debido a que actúan a bajas dosis.

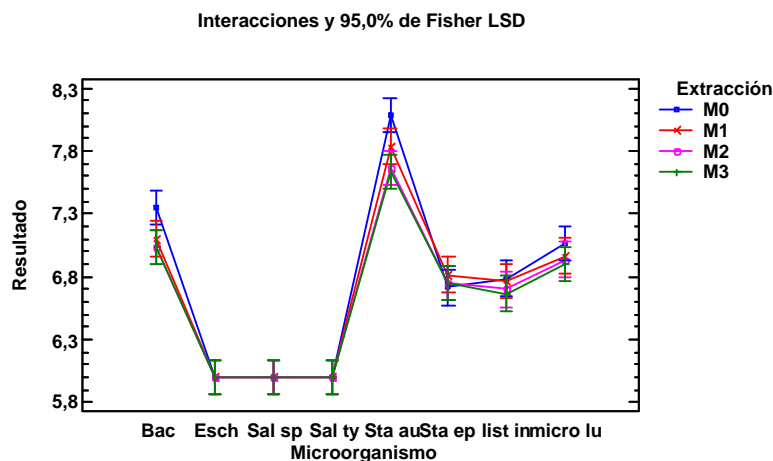


Figura 6. Interacciones dobles entre tipo de extracción y tipo de microorganismos.

Una vez analizados los datos estadísticos, analizaremos en mayor profundidad, la variable "microorganismo" y que efecto tiene en el halo de inhibición las variables "tipo de extracción" y "dilución".

Todas las muestras ensayadas han mostrado efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus* 240, en un rango entre 6,5 a 11,50 mm de inhibición, aunque el mayor efecto lo ha mostrado tener la muestra 16048, obtenida en la zona de Montroy, con los mayores diámetros, de 11,50 mm, principalmente en la extracción M0, aunque el resto de tipos de extracción también fueron muy efectivos. La concentración mínima inhibitoria se encuentra entre la dilución 1/50 y 1/100 para las muestras 16016, 16048 y 16053, mientras que para el resto estuvo entre las diluciones 1/10 y 1/50, obteniendo los mejores resultados en el tipo de extracción M0 para las tres muestras que presentaron efecto antimicrobiano, los resultados se muestran en la figura 7. Este resultado se considera importante debido a que es un patógeno con gran repercusión en la industria alimentaria, sobre todo porque es un patógeno relacionado con la manipulación de los alimentos por parte de los operarios. Los resultados de la inhibición fueron inferiores a los estudiados por Manrique 2006. También se obtuvieron resultados inferiores a los expuestos por Yaghoubi et al. 2006 y por Fernandes et al., 2005.

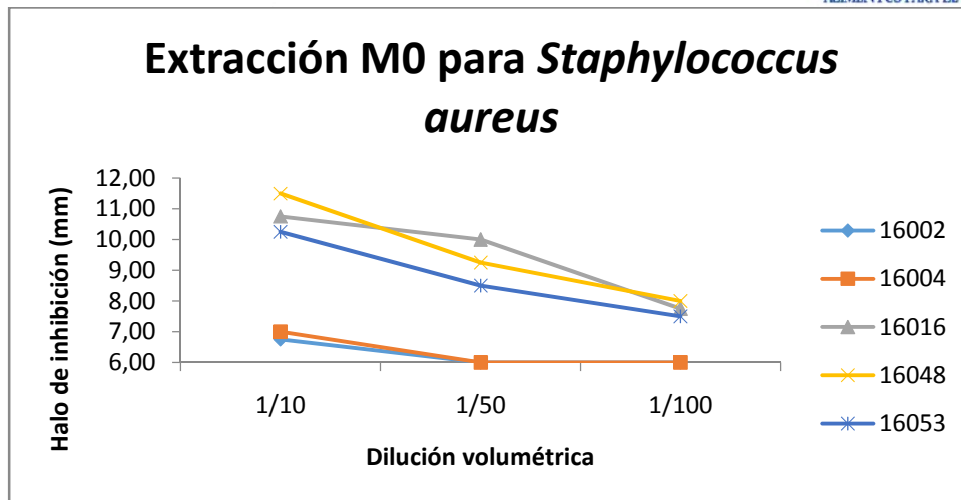


Figura 7. Concentración mínima inhibitoria para la extracción M0.

Por otra parte, los valores obtenidos en la inhibición de *Listeria innocua* variaron en un rango de entre 7,25 a 9 mm. Se observa que los resultados de inhibición más altos obtenidos se presentaron en las muestra 16048, sin embargo, las muestras 16016 y 16053 también presentaron un alto nivel de inhibición. Cabe mencionar que aunque estas muestras tenían una procedencia muy diferente, Gestalgar y Rumania respectivamente, presentaron un poder antimicrobiano similar. Por otra parte, las muestras 16002 y 16004 no presentaron ningún tipo de inhibición, ambas muestras son de la zona de Rumanía. Constatamos que la concentración mínima inhibitoria se encuentra entre la dilución 1/50 y 1/100, obteniendo los mejores resultados en el tipo de extracción M0 para las tres muestras que presentan efecto antimicrobiano (Figura 8).

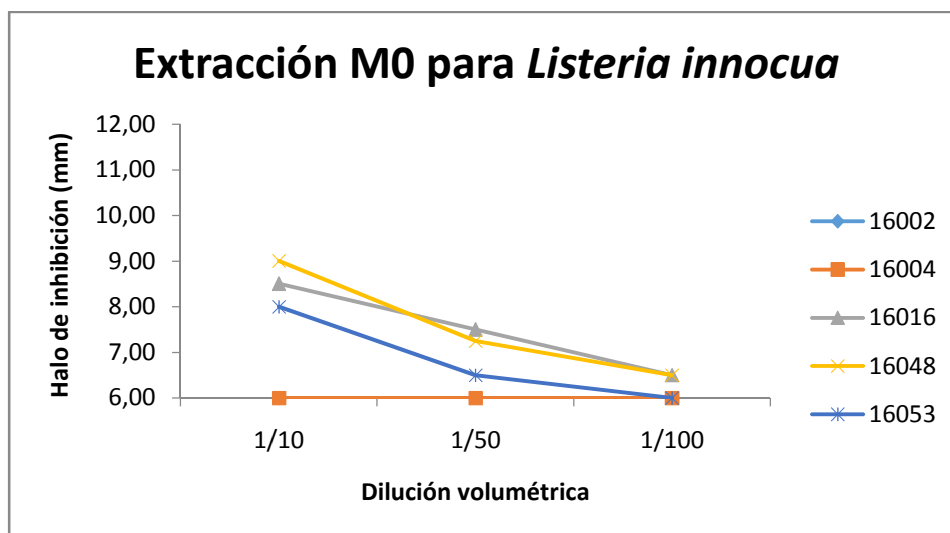


Figura 8. Concentración mínima inhibitoria para la extracción M0.

El rango de inhibición detectado en la bacteria *Micrococcus luteus* osciló entre 6,5 y 10 mm. Las muestras que destacaron en la inhibición de este microorganismo fueron 16016 y 16048 (ambas de Valencia), llegando a

tener unos valores de entre 9 y 10 mm de diámetro de halo. Se puede presuponer que la diferencia en cuanto a efecto inhibitorio entre las muestras pertenecientes a la región de Valencia frente a las pertenecientes a la región de Rumania, se debe a la presencia de determinada flora que se encuentra en una región y en la otra no, o bien la abundancia de la misma es distinta. Este resultado fue inferior al obtenido por Uzel et al., (2005). En el presente estudio, se encontraron los mejores resultados de inhibición en el método de extracción M1, comprobando a su vez, que las concentraciones mínimas inhibitorias para las muestras que tienen efecto antimicrobiano se encuentran entre las diluciones 1/10 y 1/50 (Figura 9).

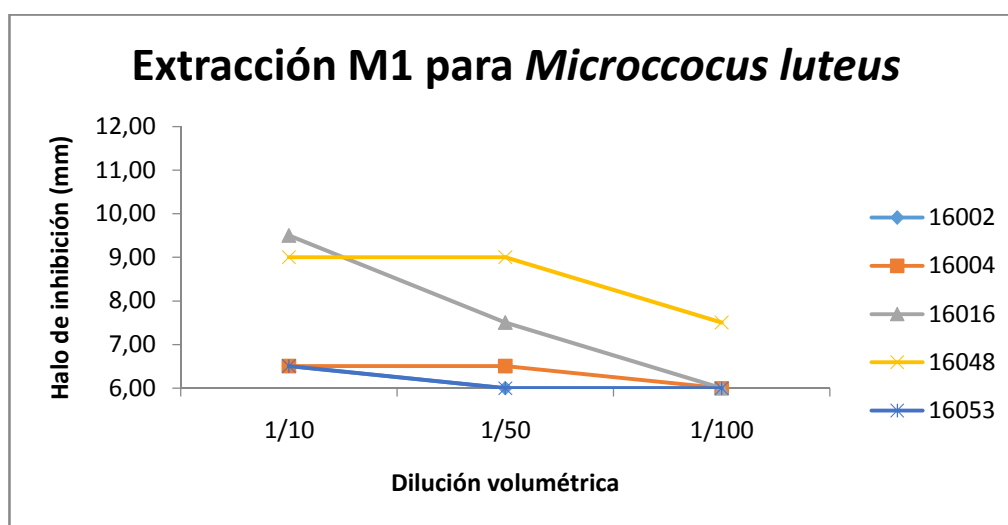


Figura 9. Concentración mínima inhibitoria para la extracción M1.

Los rangos de inhibición encontrados en *Bacillus cereus* oscilaron de entre 6,5 a 10,75 mm. Destacan las muestras 16016 y 16048 por presentar un mayor efecto inhibitorio. En este caso, podemos hacer la misma suposición realizada anteriormente, esta es que la diferencia en cuanto a efecto inhibitorio entre las muestras pertenecientes a la región de Valencia frente a las pertenecientes a la región de Rumania, se debe a la presencia de determinada flora que se encuentra en una región y en la otra no, o bien la abundancia de la misma es distinta. sin embargo, en este caso no es tan acusado, dicho efecto, ya que la muestra 16053, tuvo un resultado de inhibición muy alto, muy próximo a la muestra 16016. Menezes et al., 1997 y Yaghoubi et al., 2006, obtuvieron resultados similares en propóleos de Perú y Argentina, respectivamente. Se verificó que la concentración mínima inhibitoria se encontraba entre la dilución 1/50 y 1/100 para las muestras 16016, 16048 y 16053, y la 1/10 y 1/50 para la muestra 16002. Se obtuvieron los mejores resultados en la extracción M0 para las tres muestras ya que presentaban el mayor efecto antimicrobiano (Figura 10).

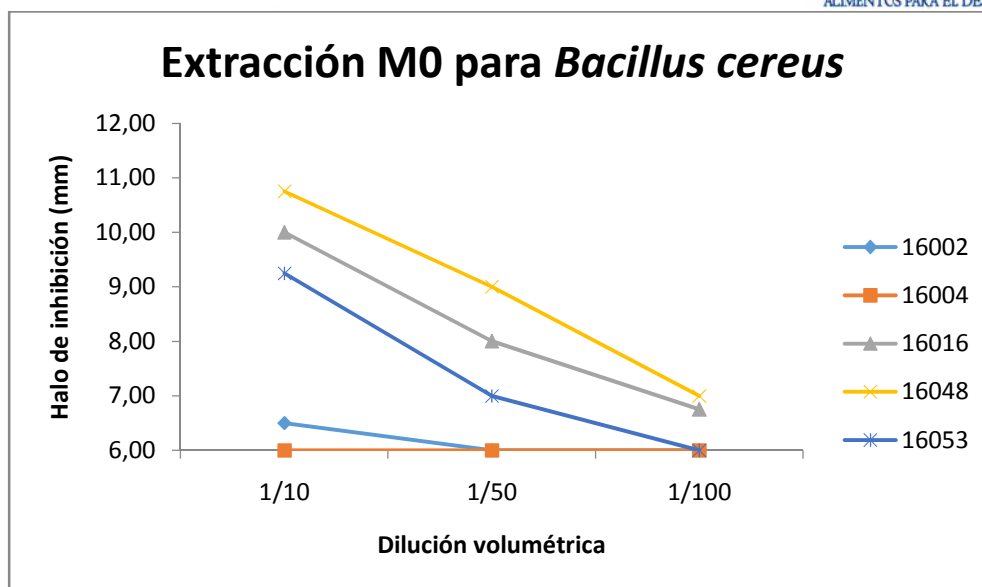


Figura 10. Concentración mínima inhibitoria para la extracción M0.

Los rangos de inhibición obtenidos en *Staphylococcus epidermidis* oscilaron entre 7,25 y 9 mm siendo la muestra 16016 la que resultó más eficaz en su inhibición. Sin embargo, la muestra que mejores resultados de inhibición mostró fue la 16048, con un halo de 8 mm. Ambas muestras procedían de Valencia y alrededores. Para este tipo de microorganismo el método de extracción más efectivo resultó ser el método M0 para las muestras que presentaron el mayor índice de inhibición, en este caso las muestras 16016, 16048 y 16053. Por último, para dichas muestras la concentración mínima inhibitoria se encontraba entre la dilución 1/50 y 1/100 (Figura 11).

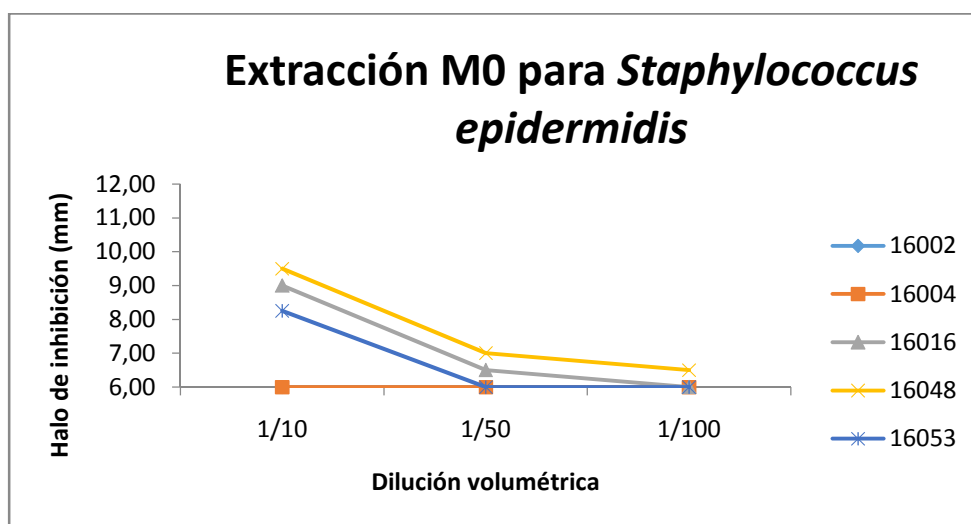


Figura 11. Concentración mínima inhibitoria para la extracción M0.

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; como queda patente en nuestro

estudio, se obtuvieron resultados similares. 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*, a diferencia del presente estudio, en el que solo se observó un efecto frente a *Staphylococcus aureus* y no sobre *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) señalaron 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 del tipo de flora de la zona en la que se recolecte.

CONCLUSIONES

Ninguna de las muestras de propóleo estudiadas presentó efecto de inhibición sobre las bacterias Gram negativas ensayadas.

Las muestras 16016, 16048 y 16053, con origen en la Comunidad Valenciana, mostraron halo de inhibición en todas las cepas de bacterias Gram positivas testadas, siendo el mayor efecto en la dilución 1/10.

La muestra 16048, de la zona de Montroy, fue la que mayor efecto manifestó, llegando a alcanzarse halos de 11,50 mm, encontrándose diferencias significativas con las otras muestras estudiadas.

Las muestras 16002 y 16004, ambas procedentes de Rumanía, presentaron únicamente una baja inhibición en el género *Staphylococcus* y a diluciones altas, indicando que el origen geográfico del propóleo y por tanto su composición son determinantes en su actividad.

El método de extracción M0, resultó ser un poco más efectivo, aunque existen diferencias estadísticamente significativas entre métodos de extracción empleados, por lo que se debería proponer como más adecuado el que implique una menor relación de coste/tiempo.

El microorganismo *Bacillus cereus*, presentó la mayor inhibición, aunque sin diferencias significativas entre *Staphylococcus epidermidis* y *Micrococcus luteus*, siendo todos ellos microorganismos implicados en brotes de toxiinfección y en deterioro del producto, por lo que se podría estudiar el posible uso como aditivo en la industria agroalimentaria.

Debido a la dificultad en la comparación entre estudios y la gran variabilidad de la metodología empleada en los análisis, es necesario establecer un método estandarizado, por el cual se pueda valorar la calidad de los propóleos en cualquier parte del mundo, por la cual podamos evitar fraudes.

Una vez establecida la actividad antimicrobiana sería necesario proseguir estudiando otros componentes activos como son los compuestos antioxidantes presentes en los distintos propóleos. De esta manera se

dispondrá de criterios objetivos para comparar entre tipos de propóleos y poder valorar este producto en los mercados internacionales.

BIBLIOGRAFÍA

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.

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.

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.

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.

CLSI. 2014. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement.

Fierro Morales, W. 2000. Capacidad antioxidante de los polifenoles del propóleos. Congreso Internacional sobre Propóleos. Buenos Aires. Argentina (75-85).

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.

Hegazi, A. G. 2000. Propópolis an overview. Congreso Internacional de propóleos. Buenos Aires. Argentina. pp. 35-53.

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.

Manrique A.J. 2006. Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado Miranda, Venezuela. Efecto de la variación estacional. *Zootecnia Trop.*, 24(1): 43- 53.

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.

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.

Peña, R.C. 2008. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Cien. Inv. Agr.*, 35(1): 17-26.

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.

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.

Uzel, A; Sorkun, K.; Öncagc, Ö.; Ço ulu, 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.

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

Yaghoubi SMJ, Ghorbani GR, Soleimanian Zad S. y Satari R. 2007. Antimicrobial activity of Iranian propolis and its chemical composition.