



Evaluación de la actividad antimicrobiana y sensorial del propóleo utilizado como desinfectante en áreas pecuarias

Evaluation of the antimicrobial and sensory activity of propolis used as a disinfectant in livestock areas

Pulido Luz Marina ¹

Mendoza Yira ²

Martínez Alfredo ³

Resumen

El propóleo es un producto de la colmena formado por resinas que las abejas recolectan de las plantas.

Estudios revelan que posee propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antifúngicas, entre otras. El objetivo de este estudio fue analizar la capacidad antimicrobiana del propóleo utilizado como principio activo de un desinfectante y su efecto a nivel sensorial. El experimento se realizó recolectando propóleo de apiarios en el departamento del Atlántico. Se realizó extracción con alcohol etílico al 96% y por medio de agitación y filtración se obtuvo extracto que se secó en estufa de secado por 2 h a 70 °C para eliminar el solvente y obtenerlo seco. De este extracto se prepararon soluciones de propóleo a diferentes concentraciones y se realizó test de inhibición in vitro en placa con discos de papel impregnados con

propóleo para obtener la concentración inhibitoria frente a *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Se preparó el desinfectante a partir del extracto etanólico a una concentración del 15% y se utilizó en las superficies del área de ordeño de la finca El Caney, se tomaron muestras por hisopados antes y después de la desinfección y los resultados mostraron disminución en el crecimiento de aerobios mesófilos (flora total), de igual forma que el hipoclorito de sodio a 100 ppm utilizado habitualmente. En el análisis estadístico de Anova y Tukey se presentaron diferencias significativas entre las soluciones preparadas y los microorganismos utilizados, al igual que en los resultados de la desinfección. Se realizaron análisis sensoriales al producto elaborado, el cual presentó aceptación por parte de los panelistas con relación a los atributos color y olor obteniendo un promedio de 7,9; 8,0; respectivamente con relación a la escala hedónica de 9 puntos.

¹ Bacterióloga, Magister en Seguridad Alimentaria y Nutricional. Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Centro para el desarrollo agroecológico y agroindustrial, Instructor, Sabanalarga, Atlántico. Grupo GIPAMA - lpulidop@sena.edu.co.

² Microbióloga, Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Centro para el desarrollo agroecológico y agroindustrial, Instructor, Sabanalarga, Atlántico. Grupo GIPAMA. - yimeva@misena.edu.co

³ IMVZ, Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Centro para el desarrollo agroecológico y agroindustrial, Instructor, Sabanalarga, Atlántico. Grupo GIPAMA. - jalfredom@misena.edu.co



Palabras claves

Acción inhibitoria, antimicrobiano, sensorial, aerobios mesófilos.

Abstract

Propolis is a product of the hive formed by resins that bees collect from plants. Studies reveal that it has antioxidant, antimicrobial and antifungal properties, among others. The objective of this study was to analyze the antimicrobial capacity of propolis used as an active ingredient of a disinfectant and its effect at the sensory level. The experiment was conducted by collecting propolis from apiaries in the department of Atlántico. Extraction was carried out with 96% ethyl alcohol and by means of stirring and filtration, an extract was obtained which was dried in a drying oven for 2 h at 70 ° C to remove the solvent and obtain it dry. From this extract, propolis solutions were prepared at different concentrations and an in vitro inhibition test was carried out on a plate with paper discs impregnated with propolis to obtain the inhibitory concentration

against Salmonella typhimurium, Escherichia coli and Staphylococcus aureus. The disinfectant was prepared from the ethanol extract at a concentration of 15% and was used on the surfaces of the milking area of the El Caney farm, samples were taken by swabs before and after disinfection and the results showed a decrease in growth of mesophilic aerobes (total flora), in the same way as the sodium hypochlorite at 100 ppm commonly used. In the statistical analysis of Anova and Tukey there were significant differences between the prepared solutions and the microorganisms used, as well as in the results of the disinfection. Sensory analyzes were carried out on the elaborated product, which presented acceptance by the panelists regarding the color and smell attributes, obtaining an average of 7.9; 8.0; respectively in relation to the hedonic 9-point scale.

Keywords

Inhibitory, antimicrobial, sensory, mesophilic aerobic action .

Introducción

Los productos desinfectantes son sustancias químicas que se utilizan para eliminar los microorganismos patógenos y no patógenos, actúan de diferentes formas sobre diversos organelos de las células microbianas causando daños irreversibles Vargas, R., Torrescano & Sánchez, A. (2013) (Tolosa, 2002)

El uso de sustancias químicas, tal como se describió anteriormente, tiene sus desventajas sobre todo por la utilización indiscriminada, desde hace más de seis décadas se ha considerado un nuevo problema en salud pública por las repercusiones cada vez más acentuadas para la salud.

Actualmente, se están ensayando sustancias naturales como el propóleo, definido como un producto de la colmena formado por resinas que las abejas recolectan de plantas. Estudios revelan que posee propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, anti-alérgicas y antitrombóticas y que depende de su origen botánico, de su composición química, del sitio geográfico donde fue recolectado, de su edad y método de extracción. Una de las propiedades más importante del propóleo es su actividad antimicrobiana, la cual se le atribuye fundamentalmente a los flavonoides que posee, los cuales son aproximadamente unos 38. Esto ha sido descrito por Tolosa & Cañizares, (2002), como 12 derivados del ácido benzoico, 14 derivados del alcohol cinámico y el ácido cinámico, 12 componentes entre alcoholes, cetonas y fenoles, 7 terpenos, 11 esteroides, 7 azúcares y 2 aminoácidos, además de galangina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, éster bencil del ácido p-cumárico y mezclas de ésteres del ácido cafeico (García, Medina, Delgado, Truffin, & Gómez, 2007).

En la actualidad, el propóleo se utiliza en la industria de medicamentos, cosméticos, productos de aseo y en la producción de alimentos. Es importante anotar que se ha reportado la aplicación del propóleo

como bioconservante en productos alimenticios, tales como frutas (Quintero, Falguera & Muñoz, 2010), chorizo (Gutiérrez & Suárez (2012), pescado (Valencia et al., 2012.) y yogur (Carrera, Henry, Marquez & Espinoza, 2016).

En este estudio se evaluó In Vitro la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de propóleo contra *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, de igual forma se analizó la acción desinfectante sobre superficies en áreas pecuarias.

Adicionalmente, se realizaron pruebas sensoriales del producto para medir la residualidad de color y olor sobre las superficies sobre las cuales se aplicó. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Materiales y Métodos

El estudio realizado fue de tipo experimental desarrollado en laboratorio.

Extracción del propóleo

El propóleo colectado provenía de apiarios de zonas veredales del municipio de Baranoa, Atlántico. Estos se transportaron hasta el laboratorio de microbiología del Centro para el Desarrollo Agroecológico y Agroindustrial Cedagro Sena, Regional Atlántico. Se pesaron 100 g de propóleo a los cuales se les agregó 400 mL de alcohol etílico al 96% (grado alimenticio) para realizar la extracción del propóleo. La muestra preparada se colocó en un plato de agitación por 2 horas con rotación permanente a 400 RPM. Al cabo de este tiempo se dejó en reposo por 12 horas protegido de la luz mediante papel aluminio.

Posteriormente se decantó el líquido con embudo y papel filtro No 4 en un erlenmeyer y fue sometido nuevamente al proceso anteriormente mencionado. Al final se obtuvieron dos extractos que se colectaron en un recipiente protegido de la luz.



Preparación de las soluciones de propóleo

El propóleo obtenido de la extracción se llevó a cabo en estufa y se dejó secar por una hora para eliminar el exceso de alcohol. Una vez obtenido el extracto seco se pesaron 5 g, 10 g y 15 g y se aforó hasta 100 ml con agua destilada estéril para obtener concentraciones de 50 mg/ml, 100 mg/ml y 150 mg/ml respectivamente.

Test de halo de inhibición

Una vez preparadas las soluciones de propóleo se evaluó la actividad antimicrobiana utilizando el test de halo de inhibición. Para esto fueron empleadas placas de Petri con agar Müeller Hinton, se tomaron alícuotas de los cultivos de los microorganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* preparados previamente en caldo BHI y se agregaron en tubos con solución salina estéril que posteriormente se compararon con el 0,5 escala de Mac Farland (1,5 x 10⁸ UFC). Las especificaciones de los microorganismos con líneas estandarizadas ATCC (American Type Culture Collection) con especificaciones: Para *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 lote 363-231-4, para *Escherichia coli* ATCC 25922 lote 335-164- 3, para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 lote 360-256- 1.

Posteriormente, se tomaron cajas de Petri provistas de agar Mueller Hinton las cuales se sembraron masivamente en la superficie con hisopados de los microorganismos ya mencionados. Previamente, se impregnaron discos de papel filtro whatman N° 3 estériles (5 mm de diámetro) con las concentraciones de propóleo establecidas y se dejaron secar a 60°C por 2 h para eliminar restos de humedad.

Estos discos fueron colocados en las placas previamente inoculadas. Adicionalmente, se contó con un tratamiento control (papel filtro con alcohol etanólico) y otro tratamiento blanco (disco sin adición de compuestos). Todas las placas se llevaron a incubación por 24 h a 37 °C. La figura 1 ilustra el procedimiento.

Figura 1. Test de inhibición en placas de agar



Fuente: Autores.

Preparación del desinfectante

Se tomó el extracto de propóleo y se preparó el desinfectante según el resultado obtenido en el test de inhibición de la siguiente proporción (0,15%):

Extracto de propóleo 30 g
Agua destilada estéril 200 ml Se prepararon en frascos color ámbar con un volumen de 200 ml cada uno.

Aplicación del desinfectante, muestreo y análisis de aerobios mesófilos

Se realizaron dos tipos de procedimientos de desinfección y muestreo en las áreas pecuarias (bovinos):

Uno utilizando un desinfectante habitual como el hipoclorito de sodio a 100 ppm y se tomaron muestras antes de la desinfección y después de la desinfección por el método del hisopado y se sembraron en profundidad en agar plate count para recuento de aerobios mesófilos.

El otro procedimiento se realizó utilizando el desinfectante de propóleo (15%), se tomaron muestras antes y después de la desinfección por el método del hisopado y se sembraron en profundidad en agar plate count para recuento de aerobios mesófilos.

Ambos se incubaron a 35°C +/- 2 °C por 24. 48h, luego se realizaron las lecturas correspondientes.

Análisis sensorial

La prueba se realizó en áreas pecuarias (bovinos) de la finca el Caney del Sena Cedagro, para ello se concertó con voluntarios, mediante una escala hedónica de 9 puntos (en donde 9 corresponde a “me gusta extremadamente” y 1 corresponde a “me disgusta extremadamente”, tomando el punto 4 como el punto de aceptación intermedia

Análisis estadísticos

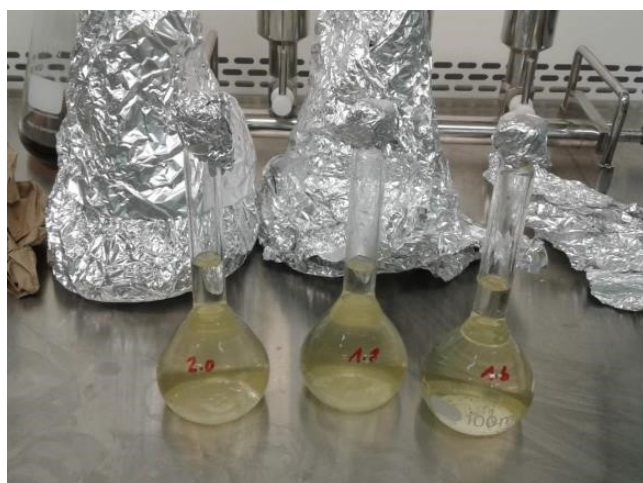
Los resultados obtenidos se organizaron en una hoja de Excel y fueron analizados estadísticamente mediante ANOVA de dos factores, test de media de Tukey al nivel del 5% de probabilidad.

Resultados

Extracción del propóleo: El extracto que se obtuvo fue de color ámbar y olor característico.

Preparación de las soluciones de propóleo: Las soluciones preparadas se conservaron en refrigeración.

Figura 2. Soluciones de propóleo



Fuente: Autores.

Resultados del test de halo de inhibición

Transcurrido el tiempo de incubación se midieron los halos de inhibición y se reportaron en milímetros (mm).

Se midieron los halos con una regla de diámetros, y se compararon según escalas Duraffourd

- Para un diámetro inferior a 8 mm, se otorga la característica nula (-)
- Para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm, se lo define como sensibilidad imite (Sensible = +)
- Un diámetro entre 14 y 20 mm, se lo encasilla como medio (muy sensible =++)
- Finalmente para un diámetro superior a 20 mm el microorganismo es sumamente sensible (+++), (Aigaje, 2017).

En la comparación de los halos de inhibición con la escala Duraffourd se obtuvo lo siguiente:

En la concentración de 150 mg/ml presentó la acción sobre la E.coli, Salmonella y S. aureus en la categoría SENSIBLE +, mientras que en las concentraciones de 50 mg/ml y 100 mg/ml fue nula para Salmonella y E. coli.

Según lo anterior la concentración de 150 mg/ml fue la escogida por ser la concentración en que se presentó actividad microbiciada. Los resultados de las medias del test de halo de inhibición se representan en la Tabla 1.



Tabla 1.

Resultados test de halo de inhibición

	Concentración propóleo			
	50 mg/ml	100 mg/ml	150 mg/ ml	0 mg/ml (Blanco)
Salmonella typhimurium	7,33*	8,00	9,3	0,00
Escherichia coli	6,00	7,33	8,0	0,00
Staphylococcus aureus	8,00	9,00	11	0,00

Fuente: Elaboracion propia

Se presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos para todos los microorganismos.

Análisis de aerobios mesófilos

Los resultados microbiológicos de la prueba realizada se describen en la tabla 2.

Tabla 2.

Resultados microbiológicos antes y después de desinfección

Desinfectante	Antes de desinfección UFC	Después de desinfección UFC
Hipoclorito de sodio 100 ppm	12	3
Hipoclorito de sodio 100 ppm	10	0
Hipoclorito de sodio 100 ppm	10	0
Hipoclorito de sodio 100 ppm	8	0
Hipoclorito de sodio 100 ppm	12	2
Propóleo 15%	8	1

Propóleo 15%	11	2
Propóleo 15%	5	0
Propóleo 15%	13	2
Propóleo 15%	9	2

Fuente: Elaboracion propia

La desinfección con propóleo al 15% mostró disminución en el crecimiento de los aerobios mesófilos pos desinfección, de igual forma ocurrió con el desinfectante habitual (hipoclorito de sodio a 100ppm).

Estadísticamente se presentaron diferencias significativas entre los dos grupos y entre cada uno de ellos.

Análisis sensoriales

Para los análisis sensoriales no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) en los atributos de color y olor, siendo aceptadas por los colaboradores de la prueba.

Discusión

En este experimento se demostró que el propóleo posee actividad antimicrobiana al inhibir in vitro microorganismos como E. coli, Salmonella y S. aureus, la concentración donde se observó el efecto microbicida fue 150 mg/ml. Otros autores utilizaron concentraciones cercanas al de este trabajo (Gutiérrez, 2012) y (Chen, Yue-Wen, & Chou, Cheng-Chun, 2005).

El extracto de propóleo presentó mayor actividad frente a S. aureus comparado con los microorganismos utilizados, estos resultados coinciden con los anotados por Vargas, R., Torrescano, G. & Sánchez, A., (2011). Previamente, se ha indicado que la actividad antibacteriana de los propóleos es debida a la presencia de compuestos fenólicos, especialmente flavonoides,

ácidos fenólicos y sus ésteres (Carrillo, M., Castillo, L., & Mauricio, R., 2011).

Según los resultados obtenidos, se evidencia que el propóleo utilizado en este experimento es de alta efectividad, ya que posee actividad bacteriostática y bactericida sobre bacterias en general aerobias mesófilas y sobre Gram negativas, lo cual es un hallazgo importante debido a que el propóleo en otras regiones del mundo sólo es efectivo contra bacterias Gram positivas, tal como lo describe Gill, Pirelli, Alvarado, Arias & Blumenthal (2012).

En cuanto al muestreo pre y pos desinfección, se observaron diferencias entre los tratamientos realizados, el crecimiento de aerobios mesófilos disminuyó con la aplicación del desinfectante a base de propóleo. Igual comportamiento presentó el desinfectante hipoclorito de sodio a 100 ppm.

El uso de extracto etanólico de propóleo al 15% como desinfectante no afecta las características sensoriales de las superficies muestreadas en los atributos de olor y color

Referencias

- Adeyinka, A. R. (2015). Application of phytochemical extracts and essential oils in food products: A review. . *International Journal of Biotechnology and Food Science*, 31- 35.
- Aguilar- González, A., & Y López- Malo, A. (2013). Extractos y aceites esenciales de clavo de olor y su potencial aplicación como agente antimicrobiano. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 3-5.
- Aigaje, A. (1 de febrero de 2017). Efectividad antimicrobiana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (tipo) al 25, 50, 100 % frente a *Porphyromonas gingivalis*. (I. 2.-8. Dom. Cien., Ed.) Dom. Cien., ISSN: 24778818, Vol. 3, núm. 1, enero, 2017 , 3-20.
- Calderón, A. M. (2009). Determination of Protection Factors for Bovine Mastitis in Farms Managed Under the Double Purpose System in the Municipality of monteria. . *Medicina Veterinaria* 12, 61- 68.
- Carrera, Q., & Henry, R. M. (06 de 12 de 2016). Evaluación del extracto etanólico como conservante en queso cabaña. Obtenido de : Biblioteca digital Zamorano: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/5947/1/AGI-2016-T011.pdf>
- Cotés- Rojas, D. D. (2014). Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific Journal of tropical Biomedicine*, 20- 22.
- Choi, Y., Noh, D., Cho, S., & Suh HJ, K. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *Food Science & Technology*. 39, 756-761. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.05.015>
- García, M., Medina, R. H., Delgado, M., Truffin, E., & Gómez, R. (2007). Actividad in vitro del Propóleos frente a patógenos bacterianos aislados de infecciones humanas. *Latin American Journal of Pharmacy*, 100-102. Obtenido de : https://www.researchgate.net/profile/Ricardo_Medina5/publication/242311764_Actividad_in_vitro_del_Propoleos_frente_a_Patogenos_Bacterianos_aislados_de_Infecciones_Humanas/links/02e7e532cfe3b6f2ea000000.pdf
- González, A. A. (2013). Extractos y aceite esencial de clavo de olor y su potencial utilización como agente antimicrobiano en alimentos. . *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 35- 41.



- Gonzalo, V. T., & Morales C, S. (2017). Resistencia antibiótica de patógenos bacterianos aislados de mastitis clínicas en bovinos de crianza intensiva. *Revista electrónica de veterinaria*, Volumen 18, No 12 pp 1- 12.
- Granados, C. &. (2014). Evaluación de la Actividad Antioxidante del Aceite Esencial Foliar de *Myrcianthes leucoxyla* de Norte de Santander (Colombia). . *Información tecnológica*, 25(3), 11-16.
- Gutiérrez, C. &. (2012). Efecto conservante de propóleos en chorizos. *Vitae*, 159-161.
- Jácome Jurado, J. A. (1 de 05 de 2019). <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/10707>. Obtenido de Repositorio universidad de las Américas: <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/10707>
- Quintero, C., Falguera, V., & Muñoz, A. (2010). Películas y recubrimientos comestibles: Importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola. *Revista Tumbaga*, 93-118.
- Ramírez, N. G. (2001). Prevalencia de mastitis en vacas lecheras lactantes en el municipio de San Pedro de los Milagros, Antioquia. . *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 14(1), , 76–87.
- Rangel, A. C., Rodríguez, V. R., Bernate, g. A., & Velilla, S. M. (2011). Prevalencia de mastitis bovina en sistemas de doble propósito en Montería (Colombia): etiología y susceptibilidad antimicrobiana. *Revista Colombiana de ciencias pecuarias*: 24, 19- 28.
- Sánchez, M. (2013). *Bazar de Especies*. New York: Palibrio.
- Suárez, H., Jiménez, Á., & Díaz, A. (2014). Physicochemical Evaluation of Cachama Fillets (*Piaractus brachypomus*) Preserved with Propolis during Storage. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 67(1), 7229-7236. doi: <https://doi.org/10.15446/rfnam.v67n1.42653>
- Tolosa, S. &. (2002). Obtención caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica*, 37- 55. Obtenido de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4373730>
- Valencia, A., Robles, R., Garibay, A., Galvez, J., Salas, M., Jiménez, M., & Velazquez, C. (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chem.* 131, 645651.
- Vargas, R., Torrescano, .., & Sánchez, A. (2013). El propóleos: conservador potencial para la industria alimentaria. *Interciencia*, 38 (10), 705-711. Obtenido de : <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33929482003>
- Yenis Ibeth Pastrana-Puchel, A. M.-V.-C. (2015). Efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre los patógenos. *Bioteecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, Vol 15 (No. 1), (56-65). doi:doi: [http://dx.doi.org/10.18684/BSAA\(15\)56-65](http://dx.doi.org/10.18684/BSAA(15)56-65)