



Estudio preliminar sobre la sobrevivencia del *Staphylococcus* en butifarras previamente tratadas con propóleo.

Preliminary study on the survival of *Staphylococcus* in sausages previously treated with propolis.

Luz Marina Pulido Peñaloza¹

¹*Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Centro para el desarrollo agroecológico y agroindustrial, Bacterióloga/Magister en SAN, cra 16F #45 F 38, Barranquilla, Colombia.*

lpulidop@sena.edu.co

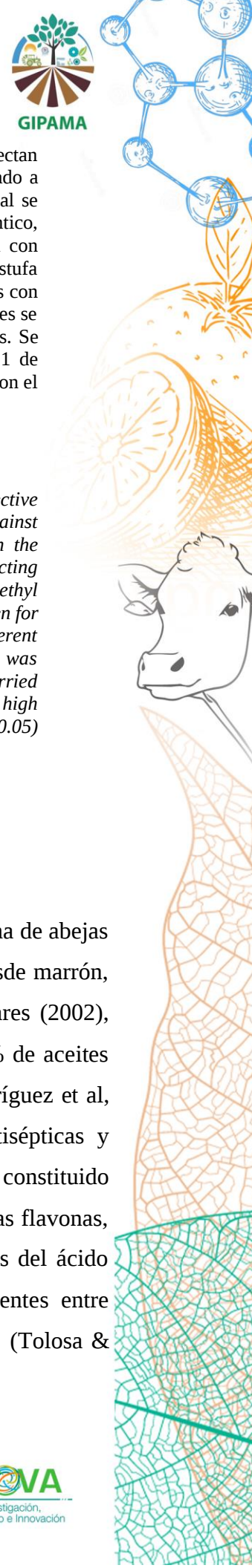
<https://orcid.org/0000-0002-0816-4363>

Alfredo Martínez Jaraba²

²*Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Centro para el desarrollo agroecológico y agroindustrial, MVZ/ Especialista en alimentación Bovina. Calle 41 #13- 58, Soledad- Colombia.*

amartinezj@sena.edu.co

<https://orcid.org/0000-0002-8263-7712>



Resumen— El propóleo es un producto de la colmena formado por resinas que las abejas recolectan de las plantas. En este estudio se analizó la capacidad antimicrobiana del propóleo adicionado a butifarras frente al *Staphylococcus aureus*. Es un estudio experimental de laboratorio, el cual se realizó en el laboratorio de microbiología del Centro CEDAGRO del SENA regional Atlántico, 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. Se elaboraron butifarras con cuatro tratamientos distintos: natural (T1), nital (T2), propóleo (T3) y alcohol (T4); a las cuales se les inoculó una suspensión con *S. aureus* y se guardaron en refrigeración a 10°C por 21 días. Se realizaron recuentos de *S. aureus* a los diferentes tratamientos y en los días 0, 7, 14 y 21 de preparación. Los resultados nos muestran un alto recuento en los días 0 y 7 para los T1 y T4, con el propóleo se observó disminución y diferencias significativas ($p<0,05$) entre los tratamientos.

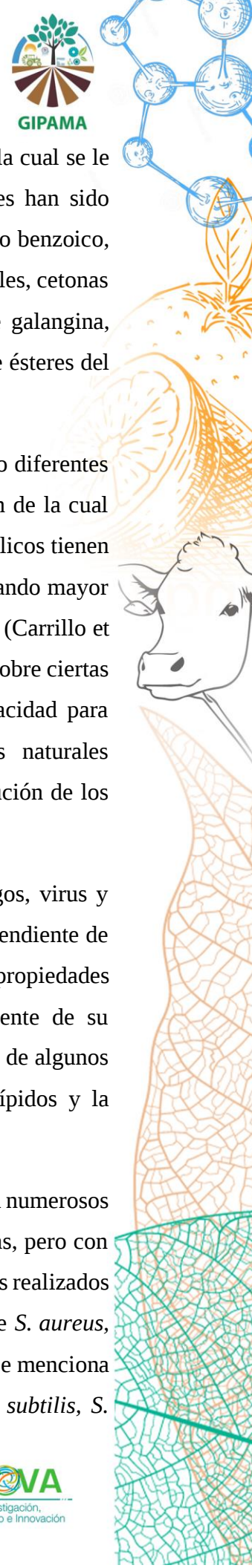
Palabras clave— Acción inhibitoria, antimicrobiano, conservante, cárnicos, propóleo.

Abstract— Propolis is a hive product made up of resins that bees collect from plants. The objective of this study was to analyze the antimicrobial capacity of propolis added to sausages against *Staphylococcus aureus*. It is an experimental laboratory study, which was carried out in the microbiology laboratory of the CEDAGRO Center of the Atlantic regional SENA, collecting propolis from apiaries in the department of Atlántico. Extraction was carried out with 96% ethyl alcohol and by stirring and filtration the extract was obtained, which was dried in a drying oven for 2 h at 70 °C to eliminate the solvent and obtain it dry. Sausages were made with four different treatments: natural (T1), nital (T2), propolis (T3) and alcohol (T4); to which a suspension was inoculated with *S. aureus* and stored refrigerated at 10°C for 21 days. *S. aureus* counts were carried out at the different treatments and on days 0, 7, 14 and 21 of preparation. The results show a high count on days 0 and 7 for T1 and T4, with propolis a decrease and significant differences ($p<0.05$) were observed between treatments.

Keywords: Inhibitory action, antimicrobial, preservative, meat, propolis.

1. INTRODUCCIÓN

El propóleo constituye junto con la miel, la cera y la jalea real productos de la colmena de abejas milíferas, es una mezcla de resinas que puede presentar diversos colores que van desde marrón, verdes, rojas, negras o blancas dependiendo de la fuente y según Tolosa y Cañizares (2002), contiene principalmente 55% de resinas y bálsamos aromáticos, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales y 5% granos de polen, además de vitaminas, proteínas y minerales (Rodríguez et al, 2020). Es utilizado ampliamente en diversas industrias por sus propiedades antisépticas y fungicidas, (Mendizábal & Cuya, 2021). Químicamente es muy complejo, constituido químicamente por 18 componentes principalmente del tipo flavonoide, tales como, las flavonas, flavones y las flavononas. Se han reportado alrededor de 38 flavonas, 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, (Tolosa & Cañizares, 2002).

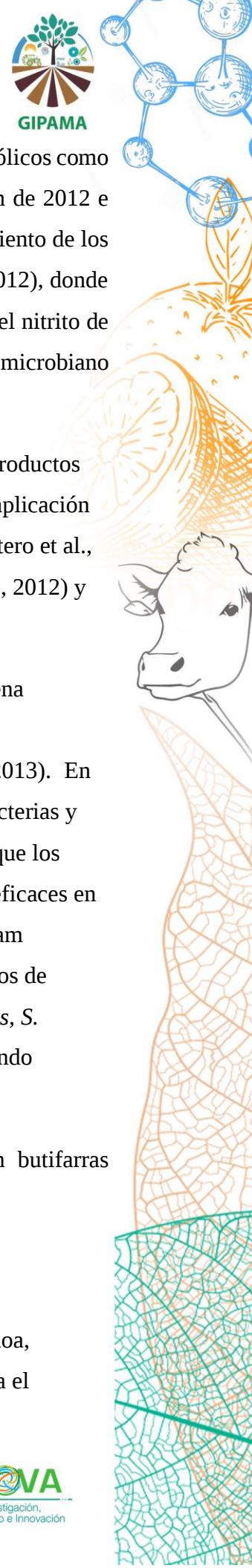


Una de las propiedades más importante del propóleo es su actividad antimicrobiana, la cual se le atribuye fundamentalmente a los flavonoides, aproximadamente unos 38, las cuales han sido descrita por Pinagote (2024); Tolosa & Cañizares (2002) como 12 derivados del ácido benzoico, 14 derivados del alcohol cinámico y el ácido cinámico, 12 componentes entre alcoholes, cetonas y fenoles, 7 terpenos, 11 esteroides, 7 azúcares y 2 aminoácidos (5), además de galangina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, éster bencil del ácido p-cumárico y mezclas de ésteres del ácido cafeico (García et al., 2007).

De los estudios realizados por algunos investigadores con el propóleo se han obtenido diferentes resultados que afirman de su actividad antibacteriana, la cual dependerá de la región de la cual proviene el propóleo y del solvente con que se extrajo. Se dice que los extractos etanólicos tienen una mayor actividad antibacteriana en comparación con los extractos acuosos, mostrando mayor susceptibilidad hacia las bacterias Gram positivas que a las bacterias Gram negativas (Carrillo et al., 2011), (Berlanga, 2021). Se ha demostrado el efecto de los extractos de propóleos sobre ciertas bacterias y hongos, así como patógenos de interés alimentario, tiene además, capacidad para prevenir o retardar reacciones de oxidación, considerándolos como productos naturales potencialmente atractivos para ser utilizado como conservador alimentario en sustitución de los aditivos químicos de origen sintético. (Vargas et al., 2013).

El efecto del propóleo sobre una gran variedad de microorganismos (bacterias, hongos, virus y levaduras) ha sido ampliamente comprobado y se ha demostrado que el efecto es dependiente de la composición química. Según (Macías & Yunda, 2015), además de las propiedades antimicrobianas del propóleo, tiene actividad antioxidante que depende directamente de su composición. Estas propiedades son las responsables de proporcionar mayor vida útil de algunos productos alimenticios, ya que actúa disminuyendo reacciones de oxidación de lípidos y la contaminación por microorganismos patógenos en especial bacterias y hongos.

En ensayos *in vitro* se ha demostrado que los extractos de propóleos son activos frente a numerosos microorganismos, siendo más eficaces en un gran número de bacterias Gram positivas, pero con limitada actividad sobre Gram negativas, algunos estudios lo demuestran como aquellos realizados en varias regiones de Corea donde se encontraron que éstos tenían alta actividad sobre *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. typhimurium* y *C. albicans*, (Choi et al., 2006). En otras investigaciones se menciona la reducción *in vitro* en el número de microorganismos (*S. aureus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *S.*



typhimurium y *C. albicans*), atribuyendo esta actividad al contenido de compuestos fenólicos como los flavonoides (Velazquez et al., 2007). Estudios experimentales en Colombia, datan de 2012 e incluyen ensayos del propóleo con diversos tipos de alimentos, ya sea como recubrimiento de los empaques o añadiéndolo al proceso como conservante, tal como apunta Gutiérrez, (2012), donde se estableció la capacidad biopreservante del propóleo en chorizos y se comparó con el nitrito de sodio, resultando actividad del propóleo similar al nitrato por controlar el crecimiento microbiano en el alimento.

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 et al., 2010), chorizo (Gutiérrez & Cortés, 2012), (Gonzales, 2018), pescado (Valencia et al., 2012) y yogur (Carrera & Henry, 2016), (Barreto, 2019).

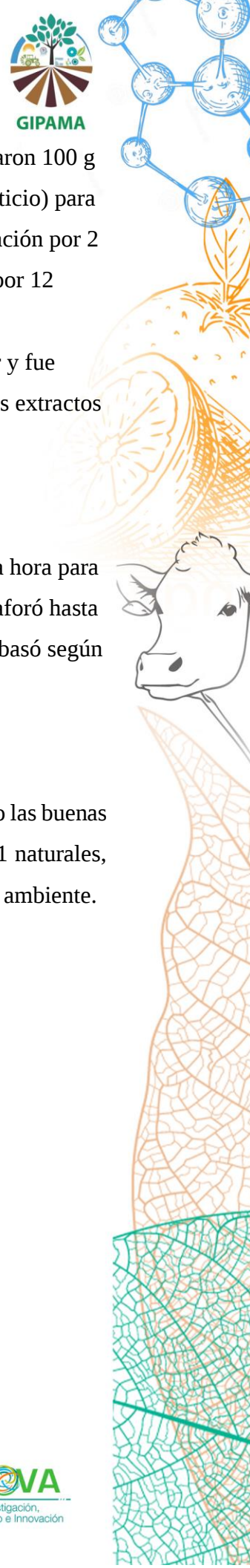
Uno de los bioconservantes ensayados es el propóleo. Este es un producto de la colmena formado por resinas que las abejas recolectan de plantas. Estudios revelan que posee propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antifúngicas, entre otras (Vargas et al., 2013). En este contexto, se ha demostrado el efecto de los extractos de propóleo sobre ciertas bacterias y hongos, así como patógenos de interés alimentario. Ensayos *in vitro* han demostrado que los extractos de propóleos son activos frente a numerosos microorganismos, siendo más eficaces en un gran número de bacterias Gram positivas, pero con limitada actividad sobre las Gram negativas (Carrillo et al., 2011). Es así como investigaciones con extractos de propóleos de algunas regiones de Corea revelan actividad antimicrobiana sobre *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. typhimurium* y *C. albicans*, de la misma forma que estudios de otras regiones incluyendo latinoamérica (Rodríguez et al., 2012).

En este estudio el objetivo fue evaluar la sobrevivencia del *Staphylococcus* en butifarras previamente tratadas con extractos etanólicos con propóleo.

2.METODOLOGÍA

Extracción del propóleo

El propóleo colectado provenía de apiarios de zonas veredales del municipio de Baranoa, Atlántico. El experimento se realizó en 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 mezcla 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 15 g y se aforó hasta 100 ml con agua destilada estéril para obtener la concentración de 150 mg/ml, esta se basó según los estudios realizados por Pulido, (2021) y Baquerizo et al, (2024).

Preparación de las butifarras

Se preparan las butifarras con igual formulación (tabla 1) y procedimiento, manteniendo las buenas prácticas de manufactura. Se preparan según los diferentes tratamientos a analizar. T1 naturales, T2 con nitral, T3 con propóleo, T4 con alcohol al 96%. Se dejan enfriar a temperatura ambiente.

Tabla 1. Formulación butifarras

MATERIAS PRIMAS	T1	T2	T3	T4
Harina de trigo	2,00%	2,00%	2,00%	2,00%
Pimentón	2,20%	2,20%	2,20%	2,20%
Pimienta picante	0,20%	0,20%	0,20%	0,20%
Sal	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%
Tripas	1,12%	1,12%	1,12%	1,12%
Nitral		0,30%		
Propóleo 150 mg/ml			15 ml/kg	
Alcohol 96%				15 ml/kg

Fuente: Propia



Inoculación del *S. aureus* en las butifarras

Se utiliza una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 lote 360-256- 1, la cual se pre-enriqueció en 5 ml de caldo BHI (24 h a 37 °C), y posteriormente, la suspensión se transfirió a un matraz con 200 ml de caldo BHI, incubándose a 37 °C. De este cultivo se tomó una alícuota que se transfiere en un tubo con solución salina estéril, comparándose con la escala de Mcfarland 0,5 correspondiente a $1,5 \times 10^8$ cel/ml (Figura 1).



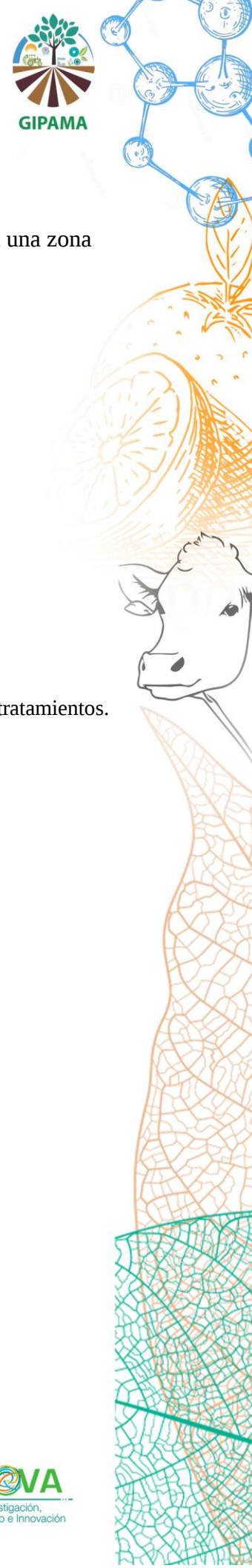
Figura 1. Suspensión del *S. aureus* en caldo BHI

Fuente propia

Una vez preparada la suspensión del *S. aureus* se procedió a inocularlo uniformemente en las butifarras utilizando 100 μ l para cada butifarra (25 g), de forma similar fue realizado por Rosales & Guamán, (2016) y Rivera et al (2024), llevándolas posteriormente a refrigeración máximo 4° C. El anterior procedimiento fue similar para los cuatro tratamientos.

Análisis microbiológico para determinar la supervivencia del *S. aureus*

Para determinar la supervivencia del microorganismo se procedió a realizar el análisis microbiológico utilizando agar Baird Parker, al cual se le adicionó yema de huevo y telurito de potasio al 0,1%, manteniendo pH de 6,8 para los requerimientos metabólicos del *S. aureus*. Previo al análisis, se realizaron diluciones del alimento con agua peptonada 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} tomando 10 g de las butifarras y 90 ml de diluyente, se homogenizó en stomacher y se transfieren alícuotas de las diluciones sucesivamente según lo descrito en el Manual de procedimientos del INVIMA, posterior a esto se sembró 0,1 ml de cada dilución obtenida con asa desechable estéril, se distribuyó uniformemente sobre la superficie de agar, las cajas se incubaron a 37° C por 24- 48 horas. Se realizó por triplicado siguiendo el cronograma ya establecido de 0, 7, 14 y 21 días de preparación.



3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Terminado el tiempo de incubación se realizó el conteo de colonias con las siguientes características: negras con borde incoloro, convexas, rodeadas de una zona opaca, con una zona clara externa correspondientes al *S. aureus*.

Los promedios de los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2, en UFC/g.

Tabla 2. Recuentos microbianos en UFC

Tratamiento	Tiempo en días			
	0	7	14	21
T1	11033	16867	13400	7333
T2	15000	9733	473	100
T3	11167	8767	290	17
T4	14600	18267	13067	4867

Fuente propia

Las figuras 2 y 3 muestran las cajas de cultivos con los resultados de *S.aureus* en los distintos tratamientos.

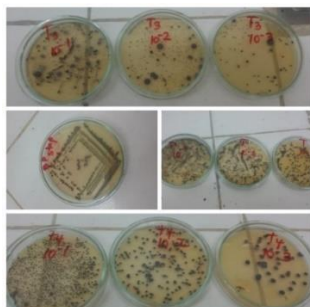


Figura 2. Supervivencia *S. aureus* día "0"

Fuente propia

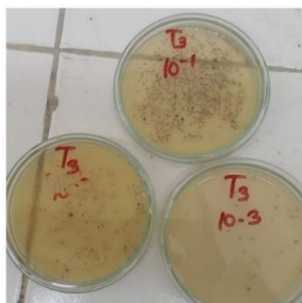


Figura 3. Supervivencia *S. aureus* día 7

Fuente propia

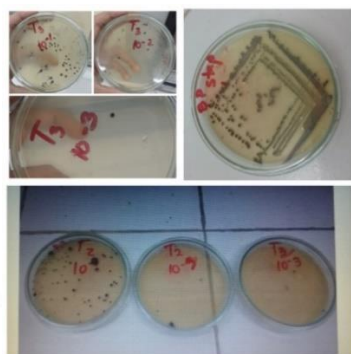


Figura 4. Supervivencia *S. aureus* día 14

Fuente propia

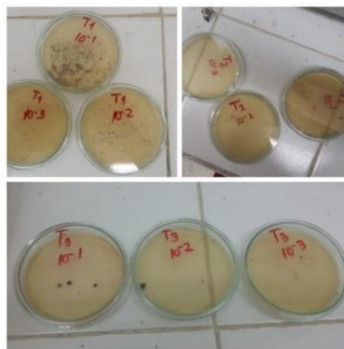


Figura 5. Supervivencia *S. aureus* día 21

Fuente propia

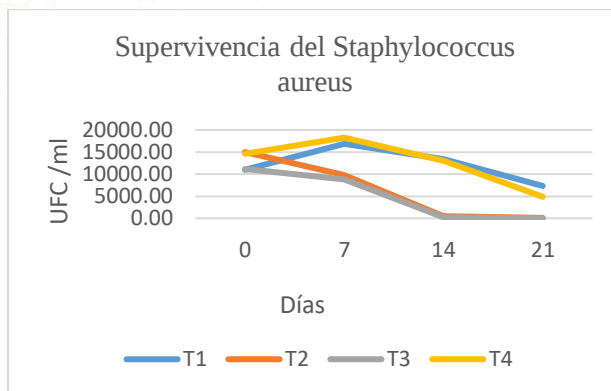
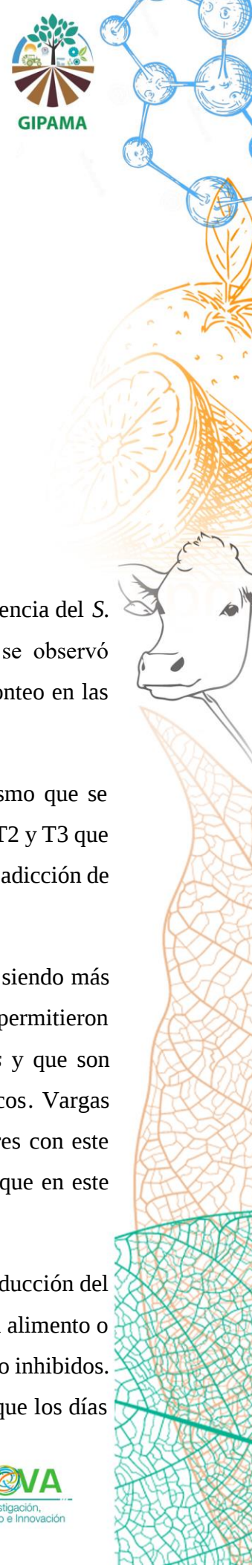


Figura 6. Gráfica Supervivencia de *S. aureus* en los distintos tratamientos

Fuente propia

La Figura 6, muestra el comportamiento de los diferentes tratamientos frente a la presencia del *S. aureus*, en el día "0" todos presentaron recuentos altos del microorganismo, no se observó inhibición en ninguno de los casos, el resultado se obtuvo utilizando las reglas de conteo en las cajas de dilución 10^{-2} .

Para el día 7, T1 y T4 presentaron un aumento en el crecimiento del microorganismo que se relaciona con la no presencia de sustancias con efecto microbicida, no siendo así para T2 y T3 que mostraron reducción del número de UFC de *S. aureus* directamente relacionado con la adicción de nitral y propóleo respectivamente.

Hay una evidente reducción del crecimiento del microorganismo a partir del día 14, siendo más notorio en T2 y T3 por la presencia de sustancias microbicidas, estos resultados permitieron evidenciar que los extractos de propóleos tienen una fuerte acción sobre *S. aureus* y que son comparables con el efecto que tiene el nitral en la conservación de derivados cárnicos. Vargas (2010), ha reportado en hamburguesas con carne de bovinos resultados muy similares con este experimento, aunque pudo observar fase estacionaria con los extractos de propóleo que en este trabajo no se manifestó.

Al llegar el día 21 se pudo observar que en todos los tratamientos hay una marcada reducción del crecimiento microbiano, que puede ser debido a que los nutrientes han declinado en el alimento o por efectos de la prolongada temperatura de refrigeración los microorganismos han sido inhibidos. Cabe anotar que el pH de las butifarras presenta una tendencia a la acidez a medida que los días



de fabricación avanzan lo que podría afectar el crecimiento del *S. aureus*, de esta misma forma Rivera et al (2024) lo apreció en su investigación.

También se pudo observar que los diferentes tratamientos presentaron diferencias por las reacciones. A continuación, se detallan.

La figura 7, representa la reacción llevada a cabo en el producto con el tratamiento 1 sigue una reacción de linealidad de primer orden para el parámetro microbiológico de recuento de *S.aureus*. Esto quiere decir que conforme transcurre el tiempo, se generan crecimiento. El incremento en el valor de este parámetro es significativo. El comportamiento está determinado por la ecuación generada en la figura de primer orden.

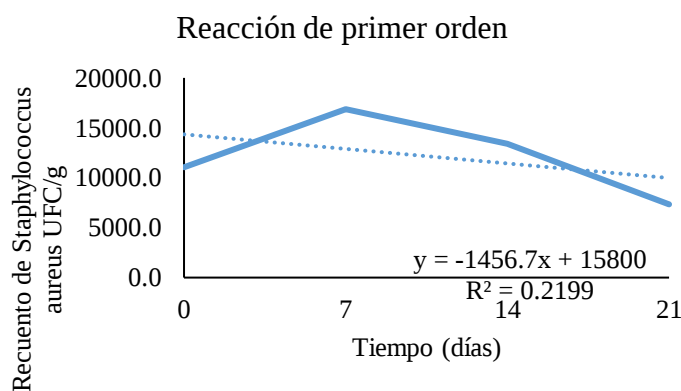


Figura 7. Tratamiento 1. Reacción de primer orden

Fuente propia

En la figura 8, la reacción evidenciada que el tratamiento 2 sigue un comportamiento de reacción de orden cero. La ecuación que mejor representa esta reacción es la de la figura de orden cero.

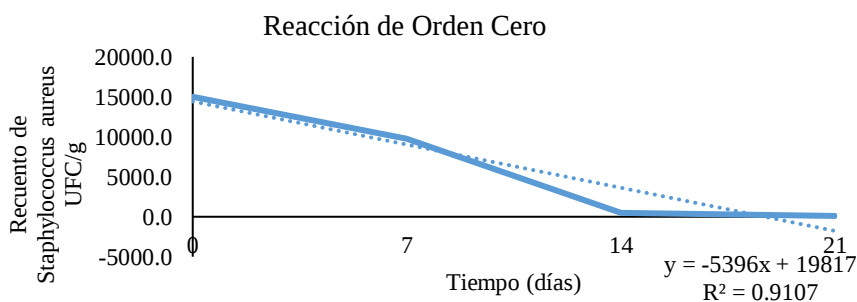


Figura 8. Tratamiento 2. Reacción de orden cero

Fuente propia



Los tratamientos 3 y 4 siguen la misma reacción de orden cero.

4. CONCLUSIONES

En este experimento se demostró que el propóleo posee actividad antimicrobiana al inhibir el *S. aureus*, en la masa cárnica de las butifarras, la concentración donde se observó el efecto bacteriostático fue 150 mg/ml. Otros autores utilizaron concentraciones cercanas al de este trabajo (Gutiérrez & Cortés, 2012) y (Lu, Cheng y Chou 2005). Chumbiray (2023), Moreta y Amarilis (2022), (Pinargote et al, 2024), (Alayo Huatay, 2013), también demostraron el efecto de inhibición del *S. aureus* frente al propóleo.

El extracto de propóleo presentó mayor actividad frente a *S. aureus* comparado con los microorganismos utilizados, estos resultados coinciden con los anotados por Vargas et al., (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 et al., 2011).

En este estudio preliminar se trabajó con el propóleo solo teniendo en cuenta las propiedades de este como antimicrobiano frente a *S. aureus*, en otras investigaciones se evaluarán otras variables importantes para la aplicación como bioconservante, aquellas relacionadas con la afectación sensorial en el alimento y el potencial de inhibir otros microorganismos como por ejemplo de hongos, tal como lo registró Oroño et al, (2023), Baquerizo et al, (2024).

5. AGRADECIMIENTO

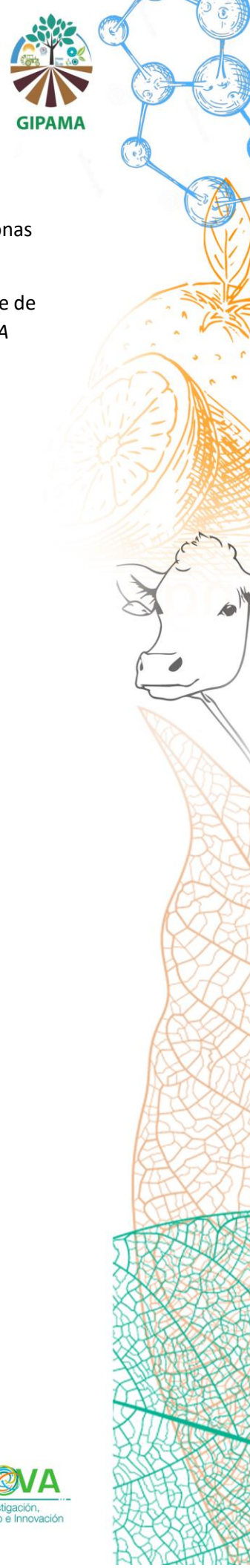
Mis agradecimientos al Centro para el Desarrollo Agroecológico y Agroindustrial por permitir el desarrollo de la investigación y el crecimiento a la formación de los aprendices.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agurto Mendizábal, J. C. (2021). Actividad antimicrobiana del extracto etanólico liofilizado de propóleo procedente de Ayacucho y Huaral frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. *Doctoral dissertation, Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, <https://hdl.handle.net/20.500.12672/16527>



- Alban Moreta, L. A. (2022). Evaluación del efecto antibiótico in-vitro del extracto hidroalcohólico de propóleo de abejas (EHAPA) sobre bacterias ATCC causantes de Metritis Bovina. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/18036>, UDCTIPEC;20T01653.
- Baquerizo Figueroa, J. P. (2024). Efecto preservante del extracto etanólico de propoleo en un alimento fermentado. *Dominio de de las ciencias* 10 (2), 375- 388
<https://doi.org/10.23857/dc.v10i2.3807>.
- Berlanga, M. G. (2021). Efecto de los complementos alimenticios con propóleo en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* aislados de la microbiota de personas sanas. *RESCIFAR Revista Española de Ciencias Farmacéuticas*, 2(1), 13-22.
- Chumbiray Velasquez, M. E. (2023). Chumbiray Velasquez, M. E. P., & Ochoa Castro, C. E. (2023). Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del propóleo frente a *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. <https://doi.org/10.21142/tl.2023.2883>,
<https://hdl.handle.net/20.500.12805/2883>.
- García Bernal, M. M. (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_vitrodel_Propoleos_frente_a_Patogenos_Bacterianos_aislados_de_Infecciones_Humanas/links/02e7e532cfe3b6f2ea000000.pdf
- Gonzales García, B. F. (2018). Elaboración de chorizo de alpaca (*Vicugna pacos*) con adición de extracto etanólico de propóleo (Gr. propolis). <https://repositorio.lamolina.edu.pe/items/6921f2fd-7538-4514-bee9-23ad60d03013>, <https://hdl.handle.net/20.500.12996/3295>.
- Gutiérrez Cortés, C. &. (2012). Efecto conservante de propóleos en chorizos. *Vitae*, 19(1), S159-S161.
- Mendizábal J., C. A. (2021). Actividad antimicrobiana del extracto etanólico liofilizado de propóleo procedente de Ayacucho y Huaral frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, Doctoral dissertation.
- Oroño, A. G. (2023). (2023). Desarrollo de un alimento cárnico embutido saludable con el agregado de extracto acuoso de propóleo (EAP) como conservante. *Ciencia, Docencia Y Tecnología Suplemento*, 13(15), . Recuperado a partir de <https://ojs-act.uner.edu.ar/index.php/Scdyt/article/view/1769>.
- Pinargote Anchundia, E. G. (2024). Actividad antimicrobiana in vitro del propóleo en el control de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* . *Bachelor's thesis, Calceta: ESPAM MFL*., 31.
- Pulido, L. M. (2021). Evaluación de la actividad antimicrobiana y sensorial del propóleo utilizado como desinfectante en áreas pecuarias. *Revista Gipama*, 3(1), 89-96.
- Quintero, C. J. (2010). Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola. . *Tumbaga*, 1(5), 93-118.
- Rivera, J. C.-G.-E.-E. (2024). Actividad bacteriostática del propóleo y geopropóleo en salchichas contaminadas por *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. *Journal of Behavior and Feedingof*



Behavior and Feeding, Volumen 4, núm. 7(núm. 7), pp. 71-76.
doi:<https://doi.org/10.32870/jbf.v4i7.49>ISSN: 2954-4947

Rodríguez Pérez, B. P. (2020). Actividad antibacteriana de propóleos con la adición de chalconas sintéticas. . *Acta universitaria*, 30.

Rodríguez, Y. S. (2012). Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento del Atlántico, Colombia. . *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 15(2), , 303–311.
<https://doi.org/10.31910/rudca.v15.n2.2012.828>.