

EVALUACIÓN PRELIMINAR *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL PROPÓLEO FRENTE A PATÓGENOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

IN VITRO PRELIMINARY EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PROPOLIS AGAINST PATHOGENS CAUSING FOODBORNE DISEASES

¹ Luz Marina Pulido Peñaloza,

² Alfredo Del Cristo Martínez Jaraba,

³ Oscar Javier Jeréz Rojas

Recibido: 15-03-2019

Aceptado: 12-12-2019

Resumen

El propóleo es uno de los productos esenciales de la colmena de abejas, entre sus propiedades fundamentales se encuentra la actividad antimicrobiana por su compleja constitución química. Actualmente se utiliza en la industria de medicamentos, cosméticos, productos de aseo y en la producción de alimentos. Se han reportado aplicaciones del propóleo como bioconservante en productos alimenticios, tales como frutas, cárnicos y lácteos. El objetivo de este estudio fue analizar la capacidad antimicrobiana del propóleo frente a patógenos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). El experimento se realizó utilizando propóleo colectado de veredas de Baranoa, Atlántico. Se realizaron extracciones utilizando alcohol etílico al 96%, se sometió a agitación y filtración. Obtenido el residuo, se seca en horno y posteriormente se prepararon diferentes concentraciones (1.6, 1.8 y 2.0 mg/mL) a las cuales, se les midió la actividad antimicrobiana mediante un test de difusión en agar contra *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Del análisis microbiológico *in vitro* se observó halo de inhibición de 6 mm correspondiendo a la concentración de 1.6 mg/mL. Siendo más efectivo sobre

- 1 Colombiana. Bacterióloga- Universidad Metropolitana. Especialista en Gestión de la Calidad- Magíster en Seguridad alimentaria y Nutricional- Universidad del Atlántico SENA - Centro para el Desarrollo Agroecológico y Agroindustrial CEDAGRO, Regional Atlántico. Instructor- Investigador SENNOVA. Email: lpulidop@sena.edu.co
- 2 Colombiano- Médico Veterinario y Zootecnista- Universidad de Córdoba. Especialista en Gerencia agroempresarial- Universidad Santo Tomás SENA - Centro para el Desarrollo Agroecológico y Agroindustrial CEDAGRO, Regional Atlántico. Instructor- Investigador SENNOVA. Email: amartinezj@sena.edu.co
- 3 Colombiano- Ingeniero de Alimentos- Universidad de Santander SENA - Centro para el Desarrollo Agroecológico y Agroindustrial CEDAGRO, Regional Atlántico. Instructor- Investigador SENNOVA. Email: ojrr@misen.edu.co



microorganismos gram positivos *S. aureus* que sobre los gram negativos *S. typhimurium* y *E. coli*.

Palabras claves: Antimicrobiano, apiarios, enfermedades transmitidas por alimentos, propóleo, patógeno.

Abstract

Propolis is one of the essential products from beehive, among its fundamental properties antimicrobial activity can be found due to its complex chemical constitution. Propolis is currently used in the industry of medicines, cosmetics, personal care and food products. Propolis applications as a bioconservative in food products, such as fruits, meat and dairy products have been reported. The objective of this study was to analyze the antimicrobial capacity of propolis against pathogens causing foodborne diseases (FBD's). The experiment was performed using propolis collected from villages in Baranoa, Atlántico. Extractions were performed using 96% ethyl alcohol, subjected to stirring and filtration. Once the residue was obtained, it was dried in an oven and subsequently different concentrations (1.6, 1.8 and 2.0 mg / mL) were prepared at which the antimicrobial activity was measured by an agar diffusion test against *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. In vitro microbiological analysis 6 mm inhibition halo was observed corresponding to the concentration of 1.6 mg / mL. Being more effective on gram positive microorganisms *S. aureus* than on gram negative *S. typhimurium* and *E. coli*.

Keywords: Antimicrobial, apiaries, foodborne diseases, propolis, pathogen

Introducción

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son el síndrome originado por la ingestión de alimentos y/o agua, que contengan agentes

etiológicos en cantidades tales que afecten la salud del consumidor a nivel individual o grupos de población, (INS, 2016).

Las ETA constituyen uno de los problemas sanitarios más comunes y de mayor impacto sobre la salud de las personas en el ámbito mundial. Afectan, principalmente, a la población pobre, niños, mujeres embarazadas y ancianos. La aparición de brotes de ETA podría perjudicar tanto al comercio como al turismo, provocando pérdidas de ingresos, desempleo y demandas. Además, el deterioro de los alimentos ocasiona pérdidas, costos y puede influir, negativamente, en el comercio y en la confianza de los consumidores (World Health Organization, 2015).

Aunque las enfermedades transmitidas por los alimentos causan morbilidad en los países desarrollados, la carga principal recae en los países en desarrollo. Lo anterior, teniendo en cuenta que la población de los países en desarrollo es más propensa a sufrir de enfermedades transmitidas por alimentos, debido a varias razones como el tratamiento descuidado de los alimentos (falta de cocción, aseo, mezcla de alimentos en buen estado con los que se encuentran en mal estado) y la falta de acceso al agua potable, ya que esta es necesaria para la preparación de alimentos, la limpieza del hogar etc. Otro factor fundamental que interviene en la aparición de estas enfermedades es el transporte inadecuado y almacenamiento de los alimentos. No obstante, el más importante es la falta de conciencia sobre prácticas alimentarias seguras e higiénicas (World Health Organization, 2015).

Las buenas prácticas de manufactura en la elaboración de los alimentos es pieza fundamental para el control y prevención de la ETA, sumado al uso de conservantes, los cuales se definen como sustancias químicas que se utilizan en cantidades reguladas y cuyo fin es mantener la vida útil del alimento impidiendo el crecimiento de los

microorganismos patógenos y no patógenos, que actúan de diferentes formas sobre diversos organelos de las células microbianas causando daños irreversibles (Vargas, R., Torrescano & Sánchez, A. 2013).

La producción de alimentos en la actualidad, se ha enfocado en la fabricación de alimentos inocuos con la tendencia a utilizar compuestos naturales, entre ellos aceites esenciales de clavo de olor, canela, orégano, tomillo y otros como el quitosano y propóleo.

El propóleo es un producto de la colmena formado por resinas que las abejas recolectan de plantas. Estudios revelan que posee propiedades antioxidantes, antimicrobianas y anti fúngicas, entre otras (Vargas, Torrescano & Sánchez, 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, Castillo, & Mauricio, 2011).

Químicamente, el propóleo es muy complejo, constituido 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 importantes del propóleo es su actividad antimicrobiana, que se le atribuye fundamentalmente a los flavonoides, aproximadamente unos 38, que han sido descritas 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 pcumárico y mezclas de ésteres del ácido cafeico (García, Medina, Delgado, Truffin, & Gómez, 2007).

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, Noh, Cho, & Suh HJ, 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, Navarro, Acosta, & Angulo, 2007).

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).

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



similar al nitrato por controlar el crecimiento microbiano en el alimento.

Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue analizar la capacidad antimicrobiana del propóleo frente a patógenos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Por medio de esta se precisa un estudio preliminar para el inicio de otras aplicaciones con el propóleo.

Materiales y métodos

Es un estudio de tipo experimental, realizado en laboratorio.

Extracción del Propóleo

El experimento se realizó usando propóleo obtenido en un apiario en las inmediaciones de Mergua, municipio de Baranoa (Atlántico).

El propóleo colectado fue trasladado hasta el laboratorio microbiológico y fisicoquímico del SENA CEDAGRO en Sabanalarga (Atlántico), donde se le realizaron dos extracciones con etanol al 96%, de la siguiente manera: se pesaron 100 g de propóleo y se agregaron 400 mL de alcohol etílico al 96%, sometiendo a agitación en equipo de rotación por 2 h, se dejó en reposo por 12 h y luego pasado por filtro de papel. El residuo obtenido fue sometido nuevamente a extracción con alcohol etílico al 96%. A partir de allí, los dos extractos obtenidos se mezclaron y se colocaron en horno de secado por 2 h a 70 °C para eliminar el solvente y obtenerlo seco.



Figura 1. Propóleo extraído.
Fuente. Elaboración propia.

Para la preparación de las diferentes soluciones de propóleo se trabajó con material de vidrio y agua destilada estéril. A partir del extracto seco se pesaron 6 g del propóleo y se aforó hasta 100 mL en un matraz obteniéndose una concentración de 60 mg/mL. A partir de esta solución, se prepararon las diferentes concentraciones de propóleo (1,6 mg/mL, 1.8 mg/mL y 2.0 mg/mL).

Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro del propóleo

Para los análisis microbiológicos se utilizaron cepas de microorganismos en caldo BHI (caldo infusión cerebro corazón), agar Müeller Hinton para la prueba de difusión en placa y la escala de Mac Farland al 0.5 (1.5×10^9 células) para la comparación de concentración de microorganismos.

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.

Se realizó la prueba de difusión en agar in vitro de la siguiente manera:

Se tomaron de 3 a 4 colonias de los microorganismos *S. typhimurium*, *E. coli* y *S. aureus* que se encontraban en agar nutritivo y se colocaron en tubos con 5 mL de solución salina estéril, se dejó en reposo por algunos minutos y se comparó con la escala de Mac Farland al 0.5. Posteriormente, cada caja de Petri provista de agar Mueller Hinton fue inoculada con un microorganismo específico utilizando siembra masiva. A continuación, se utilizaron discos de papel filtro whatman N° 3 estéril impregnados con las concentraciones de propóleo establecidas y se dejaron secar a 60°C por 4 h para eliminar restos de humedad. Estos discos fueron colocados en el centro de las placas previamente inoculadas. Adicionalmente, se

contó con un tratamiento de control (papel filtro con alcohol etanólico) y otro tratamiento blanco (disco sin adición de compuesto). Todas las placas se llevaron a incubación por 24 h a 37 °C.

Análisis estadístico

Los análisis se realizaron por triplicado y los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente aplicando ANOVA y test de TUKEY.

Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro del propóleo

Los resultados de la prueba se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Promedio de las mediciones de los halos de inhibición propóleo vs microorganismos patógenos

	Concentración de propóleo			
	1,6 mg/dl	1,8 mg/dl	2,0 mg/dl	Blanco
<i>Salmonella typhimurium</i>	7,33*	8,0	9,33	0,0
<i>Escherichia coli</i>	6,0	7,33	8,0	0,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	8,0	9,0	11,0	0,0

*mm

Fuente. Elaboración propia

Se toma como referencia la lectura del halo de inhibición de 6 mm por ser la concentración mínima donde se observó el efecto bactericida del propóleo; otros experimentos realizados por Gutiérrez & Suárez (2012) encontraron resultados similares. La presencia del halo de inhibición indica que las bacterias evaluadas son sensibles a la concentración de propóleo a la que fue enfrentada y la ausencia de dicho halo tiene nula efectividad.

Discusión: evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro del propóleo

En la Figura 2 se muestra que el extracto de propóleo presentó mayor actividad frente bacterias gram positivas como el *S. aureus* que frente a bacterias gram negativas como la *E. coli* y *S. typhimurium*. Vargas, Torrescano. & Sánchez (2011) registraron resultados similares. La actividad antibacteriana de los propóleos se da gracias a la presencia de compuestos fenólicos, especialmente flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres. (Carrillo, Castillo & Mauricio, 2011).

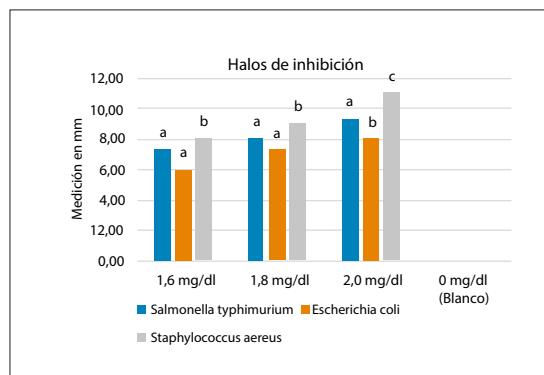


Figura 2. Halos de inhibición

Fuente. Elaboración propia

Se presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las diferentes concentraciones de propóleo y microorganismos.

La concentración más baja que registró en este el primer halo de inhibición es de 1.6 mg/ml mostrando un diámetro de 6 mm, este resultado es similar a estudios realizados previamente por Gutiérrez & Suárez (2012), Chaillou & Nazareno (2009) y Lu & Chen (2005).

Es importante anotar que el propóleo utilizado presenta actividad bactericida sobre los microorganismos gram negativos utilizados en este estudio, que lo convierte en un hallazgo importante, ya que ha demostrado ser más efectivo sobre gram positivos, como lo manifiestan estu-



dios previos de Gill, Pirelli, Alvarado, Arias & Blumenthal (2012).

Con relación al control utilizado (alcohol 96%) se observa que no produce inhibición, concluyendo que el alcohol utilizado como solvente no es el responsable de la acción inhibitoria frente a los microorganismos. El blanco utilizado es un disco de papel filtro sin ninguna sustancia impregnada y no presentó inhibición alguna en el experimento. Los controles de los microorganismos reportaron abundante crecimiento, lo que da validez a los resultados. De igual forma, los controles de los medios de cultivos utilizados tuvieron cero recuentos de unidades formadoras de colonias.

Conclusión

- 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 mínima donde se observó el efecto microbicida fue 1,6 mg/dl. Otros autores como Gutiérrez (2012) y Chen, Yue-Wen, & Chou, Cheng-Chun (2005) utilizaron concentraciones cercanas a la de este trabajo.
- 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).
- El propóleo utilizado en este experimento resultó eficaz contra tres patógenos importantes causantes de ETA.
- Por ser un experimento preliminar y no con-

cluyente es importante realizar otras pruebas como la concentración mínima inhibitoria (CMI) y (CMB).

Referencias bibliográficas

- Carrera, Q. & Henry, R. M. (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>
- Carrillo, M., & Castillo, L. &. (2011). Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina (México). 2128. doi:dx.doi.org/10.4067/S0718-07642011000500004.
- Chaillou, L. & Nazareno, M. (2009). Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. *Food Science and Technology*, 1422-1427. doi: 10.1016/j.lwt.2009.03.002
- Choi, Y., Noh, D., Cho, S. & Suh HJ, K. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *Food Sci. Technol.* 39, 756-Sci. Technol. 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_vitrodel_Propoleos_frente_a_Patogenos_Bacterianos_aislados_de_Infecciones_Humanas/links/02e7e532cfe3b6f2ea000000.pdf
- Gil, M., Perelli, A., Alvarado, R. & Arias, Y. &. (2012). Actividad bacteriostática y bactericida de la tintura de propóleo sobre bacterias enteropatógenas. *Salus Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud.*, 24. Obtenido de www.scielo.org.ve/pdf/s/v16n3/art06.pdf
- Gutiérrez, C. &. (2012). Efecto conservante de propóleos en chorizos. *Vitae*, 159-161. INS. (2016). Vigilancia y análisis del riesgo en salud pública. Bogotá: ins.
- Lu, L.-C. & Chen, Y.-W. C. (2005). Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*, 213-220. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodMICRO.2014.12.017>

- Quintero, C., Falguera, V. & Muñoz, A. (2010). Películas y recubrimientos comestibles: Importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola. *Revista Tumbaga*, 93-118.
- Reyes, A., Rodríguez, P., Torres, C. T., & Vázquez, J. &. (2015). *Efectos Nocivos de Nitritos y Nitratos Contenidos en los Alimentos Sobre Ser Humano*. Obtenido de https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs204.pdf
- Tolosa, S. & Cañizares, E. (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. & Velázquez, C. (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chem.* 131, 645-651.
- Vargas, R. T. (2013). El propóleo: conservador potencial para la industria alimentaria. *Redalyc Org*, 5-6.
- Velásquez, C., Navarro, M., Acosta, A. & Angulo, A. (2007). Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1747-1756.
- World Health Organization. (2015). Global task force on cholera control. Cholera outbreak. Obtenido de World Health Organization.: http://www.who.int/cholera/task_force/en/https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs204.pdf