

**Efecto antibacterial del propóleo sobre
Listeria monocytogenes in vitro y en la
superficie de melón (*Cucumis melo*)**

**Erick Benjamin Vicente Ramirez
Victor Manuel Escobar González**

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2012

ZAMORANO
DEPARTAMENTO DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Efecto antibacterial del propóleo sobre
Listeria monocytogenes in vitro y en la
superficie de melón (*Cucumis melo*)**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por:

**Erick Benjamin Vicente Ramirez
Victor Manuel Escobar González**

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2012

Efecto antibacterial del propóleo sobre *Listeria monocytogenes in vitro* y en la superficie de melón (*Cucumis melo*)

Presentado por:

Erick Benjamin Vicente Ramirez
Victor Manuel Escobar González

Aprobado:

Mayra Márquez, Ph.D.
Asesora principal

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Director
Departamento de Agroindustria Alimentaria

Blanca Carolina Valladares, M.Sc.
Asesora

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

RESUMEN

Escobar González, V. M. y Vicente Ramirez, E. B. 2012. Efecto antibacterial del propóleo sobre *Listeria monocytogenes*, *in vitro* y en superficie de melón (*Cucumis melo*). Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería en Agroindustria Alimentaria. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 21 p.

El propóleo es una sustancia resinosa que ha mostrado propiedades capaces de actuar contra bacterias patógenas. Este estudio evaluó la susceptibilidad *in vitro* de *Listeria monocytogenes* a extracto etanólico de propóleo (EEP) (13.29 y 26.58 mg/mL), etanol y agua, combinado con pH 5 y 7 a temperaturas de 4 y 25°C. Luego se evaluó el EEP (26.58 mg/mL) a pH 5 contra *L. monocytogenes* inoculada en la superficie de melón (SM) a 4 °C. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con arreglo trifactorial con medidas repetidas en el tiempo (MRT) y un diseño completo al azar con MRT, para el análisis *in vitro* y sobre la SM, respectivamente. Los resultados mostraron que EEP a 26.58 mg/mL actuó como bacteriostático y bactericida, dependiendo de las condiciones expuestas. Una mayor susceptibilidad se observó a pH 5 que a pH 7. Adicionalmente, a pH 7 se observó más susceptibilidad a 25°C que a 4°C. Sin embargo, a pH 5, el efecto fue inverso, lo cual se atribuyó a la respuesta de *L. monocytogenes* a las condiciones del medio. Sobre la SM, el efecto del EEP se observó en las primeras 24 horas, luego el efecto fue bacteriostático para los tres tratamientos. En conclusión el propóleo tuvo un efecto antibacterial *in vitro* contra *L. monocytogenes*, el cual fue influenciado por el pH y la temperatura. Pero no mostró efectividad para eliminar *L. monocytogenes* sobre la SM. Se recomienda su evaluación en alimentos con pH menor o igual a 5.

Palabras clave: Etanol, Gram positiva, patógeno, pH, temperatura.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos.....	v
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4 CONCLUSIONES.....	14
5 RECOMENDACIONES.....	15
6 LITERATURA CITADA.....	16
7 ANEXOS	19

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Descripción de concentraciones de extracto etanólico de propóleo (EEP) y sus testigos, agua y etanol (EtOH), evaluadas <i>in vitro</i> contra <i>L. monocytogenes</i>	4
2. Descripción de tratamientos evaluados sobre <i>L. monocytogenes in vitro</i>	6
3. Descripción de tratamientos evaluados sobre <i>L. monocytogenes</i> inoculada sobre la superficie de melón.	6
4. Recuento de <i>L. monocytogenes</i> expuesta a caldo universal de Pre Enriquecimiento (UPE), con 13.29 mg/mL (EEP13), 26.58 mg/mL (EEP26), agua o etanol (EtOH), influenciado por el pH del medio y la temperatura de incubación.	7
5. Recuento de <i>L. monocytogenes</i> inoculada sobre superficie de melón y tratado con extracto etanólico de propóleo (EEP) a pH 5 y almacenado a 4°C.	12
Figuras	Página
1. Comportamiento de <i>L. monocytogenes in vitro</i> , en contacto con extracto etanólico de propóleo (EEP13 =13.29 mg/mL y EEP26= 26.58 mg/mL) y sus testigos, agua y etanol (EtOH), a través del tiempo.	8
2. Comportamiento de <i>L. monocytogenes</i> inoculada sobre melón (<i>Cucumis melo</i>) y almacenada a 4°C durante 96 h, después de tratar la superficie con propóleo.	12
Anexos	Página
1. Estimación de costos variables de soluciones de extracto etanólico de propóleo.	19
2. Recuento de <i>L. monocytogenes</i> expuesta a caldo universal de preenriquecimiento (UPE), adicionado con extracto etanólico de propóleo (EEP), agua o etanol, influenciado por el pH del medio, la temperatura y tiempo de exposición.	20
3. Resumen del análisis de varianza de Fase 1 (<i>in vitro</i>). Diseño de bloques completos al azar con arreglo trifactorial y medidas repetidas en el tiempo.	21

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS) han ganado importancia debido al impacto global a nivel económico y de salud que generan. De acuerdo al centro para el control y prevención de enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) de Estados Unidos, en el 2011 se estimó que en ese país, cada año, 31 patógenos, causan alrededor de 37.2 millones de enfermedades. Aproximadamente 3.6 millones de las enfermedades son causadas por bacterias transmitidas por alimentos, reportando 865 muertes, causadas principalmente por *Salmonella* no tifoidea, *Toxoplasma gondii*, *Norovirus*, *Campilobacter spp.* y *Listeria monocytogenes* (Scallan *et al.* 2011).

Para listeriosis (infección ocasionada por esta bacteria), se han reportado tasas de mortalidad de 39%, siendo esta más elevada en la población mayor a 70 años, llegando hasta 46% (McLauchlin *et al.* 2004). También se ha reportado mayor susceptibilidad relacionada a la condición de salud, afectando principalmente a personas inmunosuprimidas tales como personas con cáncer, trasplante de órganos, SIDA, ancianos y mujeres embarazadas (ILSI Research Foundation 2005).

L. monocytogenes es una bacteria Gram positiva, no formadora de esporas, anaeróbica facultativa y catalasa positiva. Puede crecer en un amplio rango de temperatura, que va desde -0.4 a 50°C. Es capaz de resistir pH, que van desde 4.5 a 7 cuando se incuba a 30°C (Farber y Peterkin 1991). Se encuentra distribuida en varios alimentos, clasificándolos en dos tipos: los que no favorecen el crecimiento de la bacteria (pH<4.4, aw <0.92 o alimentos congelados) y los que si lo favorecen, como la leche, pescado ahumado, sushi, vegetales y frutas no ácidas tales como papaya, sandía y melón. Estableciendo límites de <0.04 y <100 UFC/g para los alimentos que favorecen y los que no favorecen el crecimiento de la bacteria, respectivamente (FDA 2008).

Se ha encontrado presencia de *L. monocytogenes*, en frutas y vegetales, tales como lechuga, brócoli, naranja, tomate, espárrago y melón. Y algunos brotes ocasionados por las mismas, como el de Boston 1979, reportando 23 individuos afectados, en 8 hospitales distintos (Harris *et al.* 2003). En cuanto al melón, se ha demostrado la presencia de *L. monocytogenes* sobre la superficie del mismo, en donde es capaz de sobrevivir hasta 15 días a 4°C (Bowen *et al.* 2006). También se reporta que al momento de realizar el corte del melón, *L. monocytogenes* puede contaminar la pulpa, en donde puede crecer hasta 8 log UFC/g en 24 horas a 30°C (Penteado y Leitão 2004).

En septiembre del 2011, se reportó un brote de listeriosis relacionado con melones en Estados Unidos, este tuvo presencia en 28 estados, reportándose 147 infectados, 30 muertos y un aborto. Categorizándolo como el caso de enfermedades transmitidas por

alimentos con más muertes en Estados Unidos en los últimos 90 años (Center for Disease Control and Prevention 2011). Estudios realizados sobre la superficie melón (*Cucumis melo*), han evaluado tratamientos de desinfección como peróxido de hidrogeno (5%) y cloro (1000 ppm), para reducir la carga de *L. monocytogenes*. Detectando <2 UFC/cm² después del tratamiento, partiendo de una carga inicial 5.5 Log UFC/cm². Evitando así la presencia de la bacteria en la pulpa después del cortado (Ukuku y Fett 2002).

Se han evaluado compuestos capaces de eliminar o inhibir el crecimiento de la bacteria, tales como nisina, amonios cuaternarios y cloro (Gandhi y Chikindas 2007). De acuerdo a tendencias actuales, se busca reducir el uso de compuestos sintéticos, sustituyéndolos por compuestos naturales. Por lo que se han investigado compuestos, como aceites esenciales de canela, pimiento, limón, entre otros (Lis Balchin y Deans 2003). Así mismo se ha estudiado el extracto etanólico de propóleo (EEP), el cual ha mostrado resultados positivos como antibacterial contra bacterias Gram positivas (Temiz *et al.* 2011).

El propóleo es una sustancia resinosa recolectada por las abejas de las resinas de los árboles, sustancia que posee propiedades antioxidantes, antibacteriales, antifúngicas y antivirales. Debido a la presencia de compuestos aromáticos, fenólicos, principalmente flavonoides a los que se les atribuye la actividad antibacterial (Kaewmanee y Rachtanapun 2011). Es importante mencionar que el propóleo posee diferentes características físicas, químicas y propiedades biológicas de acuerdo a su ubicación geográfica y estación del año (Bogdanov 2012).

Yang *et al.* (2006), reportaron una concentración de 60 µg/mL de propóleo proveniente de Taiwan, como bactericida sobre *L. monocytogenes*, incubada a 37°C por 12 horas, partiendo de una carga de 5 Log UFC/mL. Velazquez *et al.* (2007), determinaron que el propóleo del desierto de Sonora, inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes* a concentraciones de 400 µg/mL, incubado a 36°C por 48 h. Se ha demostrado que las propiedades antibacteriales sobre *L. monocytogenes* varía según la región y a la época en que es recolectado, mostrando diferencias a una concentración de 7.5 µg/mL, a una carga de 7 Log UFC/mL a 37°C por 6 h (Lu *et al.* 2003).

Estudios realizados, en Italia, reportan que propóleo a 0.6% en una salchicha oriental, alargó la vida de anaquel de 12 a 21 días, sobre microorganismos proteolíticos, lipolíticos, hongos y levaduras, almacenada a 5°C (Ali *et al.* 2010). En honduras, se comparó el efecto antimicrobiano de EEP contra benzoato de sodio sobre *Aspergillus spp.* en mermelada de mango, sin embargo se obtuvieron resultados estadísticamente iguales con respecto al uso de benzoato de sodio, debido a las barreras que el producto posee (Gerónimo 2009).

Los objetivos de este estudio fueron:

- Evaluar el efecto antibacterial del EEP sobre *L. monocytogenes in vitro*.
- Evaluar el efecto de concentración, pH, temperatura y tiempo sobre la susceptibilidad de *L. monocytogenes* al EEP *in vitro*.
- Evaluar el efecto antibacterial del EEP sobre la superficie de melones (*Cucumis melo*) inoculados con *L. monocytogenes*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación. El propóleo utilizado para este estudio se obtuvo de la Planta Apícola. El extracto etanólico de propóleo y estudios microbiológicos se desarrollaron en el laboratorio de patógenos del Laboratorio de Microbiología de Alimentos Zamorano (LMAZ). Ubicados en la Escuela Agrícola Panamericana, Valle de Yeguaré, San Antonio de Oriente, km 30, carretera a Danlí.

Extracción etanólica de propóleo (EEP). La muestra de propóleo fue recolectada durante la época seca del 2011, mediante mallas plásticas de sarán colocadas en el interior de la colmena. Se almacenó el propóleo a 0°C durante una semana con lo que se obtuvo una textura quebradiza para poder removerlo con facilidad de la malla. Se pesaron 200 g de propóleo en una balanza analítica Fisher Scientific Science Education y se mezcló con un litro de etanol al 95% en un Erlenmeyer de 2 L. Se agitó a 150 rpm a temperatura ambiente durante 48 horas en una agitadora automática Standar Analog Shaker.

Luego se filtró utilizando una bomba al vacío Buchi V-710 y filtros de papel Whatman No.42. Después se almacenó el extracto obtenido a 4°C protegido de la luz. Finalmente se determinó la cantidad de sólidos del EEP, llevándolo a sequedad, mediante un vertido de 10 ml de tintura de propóleo en un plato petri Pirex®, colocándose dentro de una Incubadora Fisher Scientific a 45°C durante 24 horas. Se obtuvo una concentración final de sólidos de 132.9±0.24 mg/mL.

Preparación del Inóculo de *L. monocytogenes*. Se utilizó *L. monocytogenes* proporcionada por el Laboratorio de Microbiología de Alimentos Zamorano (LMAZ), conservada en medio agar de soya tripticasa (TSA, por sus siglas en inglés) inmersa en glicerol y almacenada a temperatura de refrigeración. La bacteria la obtuvo el LMAZ mediante una donación de la Universidad Autónoma de Honduras. Fue utilizada en el estudio titulado “Optimización de dos protocolos de reacción en cadena de polimerasa para la detección de *L. monocytogenes*”, en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología Aplicada, Zamorano (Latorre 2008).

El cultivo de almacenamiento se mantuvo en medio TSA cubierto con aceite mineral. Para la preparación del cultivo de trabajo se obtuvo una asada del cultivo de almacenamiento y se transfirió a 10 mL de caldo Caldo Universal de Pre enriquecimiento (UPE)®. Se homogenizó en un Vortex-T Genie 2 Scientific Industries e incubó en una Incubadora Thermo Scientific a 35°C por 24 horas. Se realizaron dos transferencias consecutivas antes de utilizar el inóculo.

Fase 1: Estudio de susceptibilidad de *L. monocytogenes* a propóleo *in vitro*. Para la evaluación de la concentración de EEP se prepararon 16 muestras, las cuales contenían 1.14 g de medio UPE, en 24 mL de agua destilada en botellas de vidrio. Se esterilizaron y se les agregó una alícuota de 6 mL de EEP a concentraciones de 132.9 y 66.45 mg/mL, resultando en una concentración final del caldo de 26.58 (EEP26) y 13.29 mg de EEP/mL (EEP13) respectivamente. Se prepararon otras muestras donde se agregaron 6 mL de etanol al 95% (EtOH) y agua como controles (Cuadro 1). Cada frasco fue agitado vigorosamente con la mano durante 1 minuto.

Cuadro 1. Descripción de concentraciones de extracto etanólico de propóleo (EEP) y sus testigos, agua y etanol (EtOH), evaluadas *in vitro* contra *L. monocytogenes*.

Concentración	Descripción
Agua	Medio Caldo Universal de Pre Enriquecimiento (UPE) normal.
EtOH	Medio Caldo UPE a 19% etanol.
EEP13	Medio Caldo UPE a 13.29 mg de EEP/mL.
EEP26	Medio Caldo UPE a 26.58 mg de EEP/mL.

Ajuste de pH. Se reguló el pH de las muestras con un Potenciómetro Thermo Scientific Orion 3 Star, llevando 8 de las muestras (una de cada concentración) a un pH de 5 y las 8 restantes (una de cada concentración) a un pH de 7. Se utilizó NaOH 1N y HCL 1N para ajustar el pH según lo requería el tratamiento. Después de ajustado el pH se agitaron los frascos vigorosamente con la mano durante 1 minuto.

Inoculación de muestras. Se extrajo 0.6 mL de medio y se agregó 0.6 mL de inóculo de *L. monocytogenes*, extraído del cultivo de trabajo, como se describió en la preparación del inóculo. Se agitaron las muestras para homogeneizarlas y luego se colocaron a temperaturas de 4 y 25°C durante 24 horas.

Extracción de muestras. Se realizaron mediciones repetidas en el tiempo a la horas 0, 6, 12 y 24, para observar el comportamiento de los tratamientos en el tiempo. Se procedió a extraer 5 mL de muestra, los cuales se utilizaron para la determinación de células de *L. monocytogenes* sobrevivientes.

Las muestras fueron diluidas en agua peptonada 0.1% y sembradas en medio (TSA) y Extracto de levadura (ye) Criterion® al 0.6% por medio de la técnica de vertido en platos petri de plástico y se incubaron a 35°C por 24 horas. Los resultados se expresaron en Log de Unidades Formadoras de Colonia/mL (UFC/mL).

Fase 2: Estudio de susceptibilidad de *L. monocytogenes* al propóleo sobre la cascara de melón (*Cucumis melo*). Se utilizaron melones obtenidos en el puesto de ventas Zamorano, de tamaño uniforme y en buen estado. Fueron lavados con agua corriente y jabón para eliminar suciedad sobre la superficie de la cáscara, luego se secaron y se procedió a cortar piezas de melón de aproximadamente 3.2×3.2 cm con una cuchilla, para obtener un área de 10.24 cm^2 . Se les eliminó la pulpa quedando de un grosor final de 0.5 ± 0.2 cm. Cada muestra fue envuelta en papel aluminio y sometida a esterilización en autoclave a 121°C por 15 minutos. Luego se dejaron enfriar hasta que la superficie estuviera completamente seca y a temperatura ambiente. La manipulación de las muestras de melón después de la esterilización se realizó en la cámara de flujo laminar, con la ayuda de pinzas metálicas esterilizadas.

Estandarización de carga microbiana sobre melón. Se realizó la inoculación de las muestras de cascara de melón de manera puntual, agregando $40 \mu\text{L}$ de un cultivo de *L. monocytogenes* utilizando el inóculo de trabajo. Se colocó en el centro de la superficie de la muestra, haciendo un esparcimiento del inóculo sobre la superficie con la ayuda de un asa y dejando secar. Se tomó la muestra y se introdujo en una bolsa estéril. Se agregaron 90 mL de agua peptonada y se agitó vigorosamente por 3 minutos para luego sembrar en medio TSAye 0.6% por la técnica de vertido e incubar a 35°C por 24 horas. Posterior al periodo de incubación se realizaron los conteos correspondientes, logrando una carga de *L. monocytogenes* de 4.69 UFC/cm^2 .

Estudio de susceptibilidad sobre la superficie del melón. Se mezclaron 10 mL de EEP a 132.9 mg/mL con 40 mL de agua destilada esterilizada, obteniendo una solución a una concentración de 26.58 mg/mL . Se preparó una solución mezclando 10 mL de etanol al 95% en 40 mL de agua destilada y finalmente 40 mL de agua destilada, los tres tratamientos fueron ajustados a pH 5 con HCl 1N.

Las muestras fueron preparadas de la forma descrita anteriormente, se inocularon de la misma manera. Después de haber secado el inóculo, se aplicaron los distintos tratamientos preparados, agregando 6 mL de cada tratamiento por separado, en la tapa de un plato petri Pirex ®. Donde se colocaron cuatro muestras de melón para que la superficie de la cáscara inoculada estuviera en contacto con el tratamiento por 3 minutos. Todos los tratamientos se realizaron simultáneamente.

Luego fueron introducidos en recipientes plásticos Glad ® previamente esterilizados para dejar secar los tratamientos y fueron almacenados a una temperatura de 4°C . Durante el almacenamiento se realizaron muestreos para observar el comportamiento de la bacteria sobre la superficie del melón, muestreando en los días 0, 1, 2 y 4.

Diseño Experimental (Fase 1). Se utilizó un diseño de bloques completos al azar (BCA) con arreglo trifactorial combinatorio $2 \times 2 \times 4$ (pH, temperatura y concentración), haciendo un total de 16 tratamientos (Cuadro 2), con medidas repetidas en el tiempo a la hora 0, 6, 12 y 24, y tres repeticiones. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), con un nivel de significancia del 5% y separación de medias LSMEANS. Para estos análisis se utilizó el programa estadístico “Statistical Analysis System” (SAS® versión 9.3).

Cuadro 2. Descripción de tratamientos evaluados sobre *L. monocytogenes in vitro*.

Temperatura	pH	Concentración	Tratamiento
4	5	Agua	1
4	5	EtOH ^y	2
4	5	EEP13 ^ε	3
4	5	EEP26 ^ξ	4
4	7	Agua	5
4	7	EtOH	6
4	7	EEP13	7
4	7	EEP26	8
25	5	Agua	9
25	5	EtOH	10
25	5	EEP13	11
25	5	EEP26	12
25	7	Agua	13
25	7	EtOH	14
25	7	EEP13	15
25	7	EEP26	16

^y: Etanol 19% (EtOH).

^ε: Extracto etanólico de propóleo a 13.29 mg/mL (EEP13).

^ξ: Extracto etanólico de propóleo a 26.58 mg/mL (EEP26).

Diseño Experimental (Fase 2). Se utilizó un diseño completo al azar (DCA) donde se evaluaron tres tratamientos (Cuadro 3). Se realizaron medidas repetidas en el tiempo a la hora 0, 24, 48 y 96, y tres repeticiones. Se realizó un ANDEVA con un nivel de significancia del 5% y separación de medias Duncan. Para estos análisis se utilizó el programa estadístico “Statistical Analysis System” (SAS® versión 9.3).

Cuadro 3. Descripción de tratamientos evaluados sobre *L. monocytogenes* inoculada sobre la superficie de melón.

Tratamiento	Descripción
T1	Agua
T2	Etanol ^y
T3	Propóleo ^α

^y: Etanol 19%

^α: Concentración utilizada: 26.58 mg/mL.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fase 1: Efecto de los tratamientos al contacto con *L. monocytogenes*. Se observó que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) entre la población del testigo agua y EtOH, contra la población inicial de EEP13 y EEP26 en la hora 0 a un pH 5 en ambas temperaturas (Cuadro 4). Por lo que se puede decir que el efecto del EEP13 y EEP26 empieza inmediatamente al contacto con *L. monocytogenes*. Mientras que los tratamientos EEP13 y EEP26 a pH 7 a 4 y 25°C son estadísticamente iguales ($P > 0.05$) al testigo etanol (Cuadro 4). Este comportamiento se le atribuye a que existe mayor actividad antibacteriana de los compuestos polifenólicos del propóleo en un medio con pH ácido que a pH alcalino. (Friedman y Jürgens 2000; Zhu *et al.* 1997).

Cuadro 4. Recuento de *L. monocytogenes* expuesta a caldo universal de Pre Enriquecimiento (UPE), con 13.29 mg/mL (EEP13), 26.58 mg/mL (EEP26), agua o etanol (EtOH), influenciado por el pH del medio y la temperatura de incubación.

Tratamientos			Log UFC/mL \pm DE ^Δ
Temperatura (°C)	pH	Concentración	Hora 0
25	7	Agua	4.21 \pm 0.14 ab ^ε
25	7	EtOH	3.50 \pm 0.54 bc
25	7	EEP13	2.89 \pm 0.04 cd
25	7	EEP26	3.02 \pm 0.04 c
25	5	Agua	3.75 \pm 0.14 b
25	5	EtOH	3.58 \pm 0.36 b
25	5	EEP13	2.10 \pm 0.17 d
25	5	EEP26	2.61 \pm 0.12 cd
4	7	Agua	4.35 \pm 0.35 a
4	7	EtOH	3.43 \pm 0.44 bc
4	7	EEP13	3.33 \pm 0.12 bc
4	7	EEP26	2.97 \pm 0.21 c
4	5	Agua	3.95 \pm 0.12 ab
4	5	EtOH	3.25 \pm 0.83 bc
4	5	EEP13	2.40 \pm 0.45 d
4	5	EEP26	2.20 \pm 0.17 d
		%CV	10.44

^ε: Literales minúsculas distintas muestran diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

^Δ: DE: Desviación estándar.

Fase 1: Susceptibilidad de *L. monocytogenes* a propóleo *in vitro*. De acuerdo a lo mostrado en la Figura 1, el crecimiento de *L. monocytogenes* fue estadísticamente diferente ($P < 0.05$) cuando se sometió al testigo agua con respecto a los demás tratamientos. Mostrando un crecimiento mayor a 25 °C a las 24 horas. Se determinó que el factor más significativo ($P < 0.05$) en la sobrevivencia *in vitro* fue la concentración ($F = 1253.08$), seguido del pH ($F = 154.49$) y por último la temperatura ($F = 0.86$, $P > 0.05$).

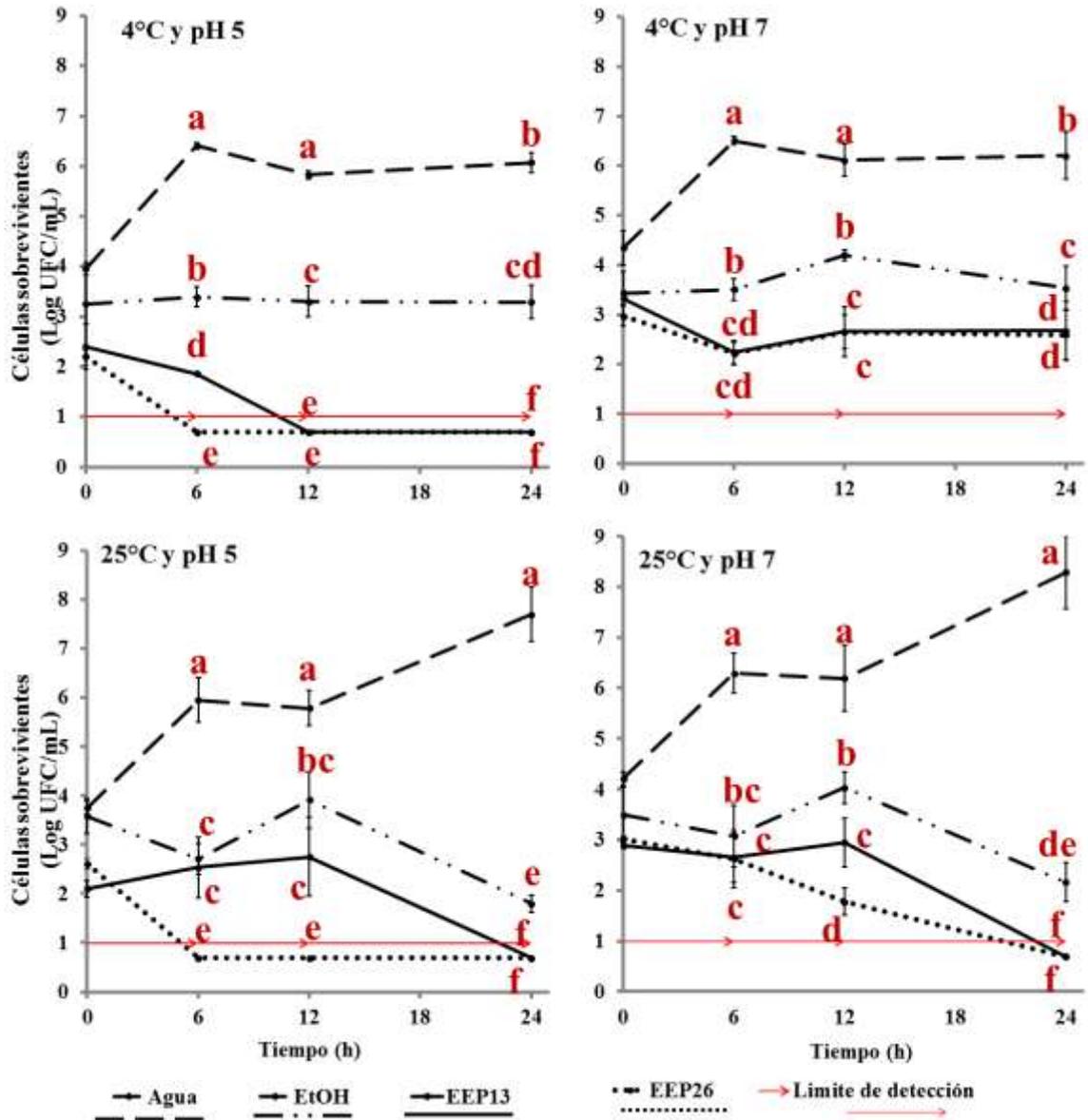


Figura 1. Comportamiento de *L. monocytogenes in vitro*, en contacto con extracto etanólico de propóleo (EEP13 =13.29 mg/mL y EEP26= 26.58 mg/mL) y sus testigos, agua y etanol (EtOH), a través del tiempo.

Literales distintas mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) y se comparan únicamente con las medias tomadas en la misma hora de muestreo.

De igual manera, se puede observar en la Figura 1, un efecto significativo ($P < 0.05$) del EtOH, sobre la población de *L. monocytogenes* con respecto al testigo agua en los distintos ambientes, el cual está ligado a que el etanol aumenta la sensibilidad de las células, provocando un estrés osmótico, mediante la alteración de la permeabilidad de la membrana celular, interfiriendo con la distribución de solutos en el citoplasma (Barker y Park 2001).

Se pueden apreciar dos patrones de conducta del EtOH, ligados al efecto de la temperatura. A 4°C el efecto sobre la población de *L. monocytogenes*, fue bacteriostático, mientras que en las muestras a 25°C, el comportamiento de la población muestra un incremento significativo ($P < 0.05$) de 2.72 ± 0.31 a 3.92 ± 0.57 y de 3.07 ± 0.61 a 4.03 ± 0.31 Log UFC/mL, para pH 5 y 7, respectivamente desde la hora 6 a la hora 12. Sin embargo, esta disminuye hasta 1.80 ± 0.17 y 2.16 ± 0.39 Log UFC/mL en la hora 24, para pH 5 y 7, respectivamente. No mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre sí.

Este comportamiento se puede atribuir a que la sensibilidad de *L. monocytogenes* a los agentes antimicrobianos es mayor a medida que aumenta la temperatura (Banwart 1999). En cuanto al efecto del pH, según Barker *et al.* (2001) la actividad antibacteriana del etanol es altamente dependiente del pH del medio, por lo que en presencia de pH ácido es más eficaz. Sin embargo no se detectaron cambios significativos ($P < 0.05$) entre ambos pH en cada una de las temperaturas, probablemente esto se deba a que los pH estudiados son muy cercanos para mostrar tal efecto.

Asimismo se puede observar en la gráfica 1, que el efecto antibacteriano que posee el propóleo mostró ser estadísticamente significativo ($P < 0.05$) con respecto a los testigos de agua y EtOH, así como también se puede observar que el efecto incrementa con la concentración del EEP. Datos similares fueron reportados por Yang *et al.* (2006). Sin embargo con pH 7 a 4°C, donde ambas concentraciones se comportan de forma similar.

De acuerdo a da Silva (2006), los compuestos polifenólicos son los responsables de la actividad antibacteriana del propóleo, principalmente los flavonoides, ya que existe una correlación positiva entre la actividad antimicrobiana del propóleo sobre bacterias Gram positivas y su contenido de compuestos flavonoides. Así como también se han reportado actividades antimicrobianas utilizando flavonoides aislados, tales como epigenina, galangina, epigallocatequina, catequina, entre otros (Cushnie y Lamb 2005). Estos flavonoides han sido encontrados en extractos de propóleo, según estudios realizados en Brasil, Irán, desierto de Sonora, México y países europeos (Bankova *et al.* 2000; Mohammadzadeh *et al.* 2007; Velazquez *et al.* 2007). También es importante mencionar que el comportamiento de *L. monocytogenes* ante la presencia de EEP varía de acuerdo al pH y la temperatura de incubación, como se muestra en la Figura 1.

Efecto del pH sobre la susceptibilidad de *L. monocytogenes* a EEP. De acuerdo a lo mostrado en la Figura 1, la concentración EEP13 a 4°C, mostró un comportamiento muy diferente cuando se sometió a pH 5 y 7, puesto que el primero redujo la carga de *L. monocytogenes* de 3.5 Log UFC/mL a < 1 Log UFC/mL en 12 horas. Mientras que a pH 7, únicamente reportó una disminución significativa ($P < 0.05$) en la población en la hora 6,

población que no sufrió cambios significativos ($P>0.05$) a partir de esa hora. Comportamientos similares se encontraron para la concentración EEP26 a 4°C, la cual mostró poblaciones $<1\text{Log UFC/mL}$ en las primeras 6 horas cuando se sometió a un pH de 5. Sin embargo a un pH 7, su efecto solo reportó una disminución significativa ($P<0.05$) de la población en las primeras 6 h, luego esta se mantuvo estática hasta las 24 h.

Efectos similares se encontraron a 25°C, en donde EEP13, reflejó un efecto bacteriostático en las primeras 12 horas a un pH 5 y 7. A partir de esta hora se detectó un efecto significativo ($P<0.05$) el cual disminuyó la población a $<1\text{ Log UFC/mL}$, para la hora 24. Es importante mencionar que EEP13, no mostró diferencias significativas ($P>0.05$) entre el pH 5 y 7. En cuanto a EEP26, se obtuvieron recuentos del patógeno de $<1\text{Log UFC/mL}$, a partir de hora 6, a un pH 5. Mientras a un pH 7, se detectaron cambios significativos ($P<0.05$) en la población a partir de la hora 12, reportándose una población $< 1\text{ Log UFC/mL}$ a las 24 horas.

De acuerdo a lo planteado anteriormente, se puede deducir que el efecto del EEP fue mayor a un pH 5 que a un pH7, en ambas temperaturas para EEP26 y EEP13 puesto que se reportaron poblaciones menores a pH 5, mientras que a pH 7, este efecto fue más retardado y en algunos casos solamente actuó como bacteriostático.

De acuerdo a la literatura, la actividad antimicrobiana del EEP, es mayor a medida que el pH del medio disminuye (Yang *et al.* 2006). Esto se debe a que los compuestos polifenólicos, entre ellos los flavonoides, son considerados los componentes más importantes en la composición del propóleo, debido a que se les atribuye la actividad antimicrobiana del mismo (Cushnie *et al.* 2005; da Silva *et al.* 2006) y han mostrado ser inestables en condiciones alcalinas, mientras a un pH bajo, estos muestran mayor estabilidad (Friedman y Jürgens 2000; Zhu *et al.* 1997).

Efecto de la temperatura sobre la susceptibilidad de *L. monocytogenes* a EEP. La temperatura también mostró un efecto sobre la susceptibilidad de *L. monocytogenes* al EEP, como se muestra en la Figura 1. Se puede observar como EEP13 a un pH 5, muestra un efecto distinto a 4°C comparado con las muestras expuestas a 25°C. Mostrando una reducción de la población hasta $< 1\text{Log UFC/mL}$ en la hora 12 a 4°C, mientras a 25°C, este efecto se vio hasta las 24 horas. Comportamiento distinto fue detectado en EEP26, puesto que a un pH 5, ambas temperaturas mostraron un efecto severo sobre la población de *L. monocytogenes*, llevándola a $<1\text{Log UFC/mL}$ a partir de la hora 6.

Por otra parte, cuando se evaluó el efecto de la temperatura sobre EEP a pH 7, a 4 °C, ambas muestras (EEP13 y EEP26) mostraron solamente una disminución significativa ($P<0.05$) en la población en la hora 6 de 3.33 ± 0.12 a 2.24 ± 0.24 y de 2.97 ± 0.21 a $2.22\pm 0.23\text{ Log UFC/mL}$, respectivamente. Hora a partir de la cual se observó un comportamiento bacteriostático, sin diferencias significativas ($P>0.05$) entre EEP13 y EEP26.

Cuando ambas muestras fueron evaluadas a una temperatura de 25°C, se observó que tanto EEP13 y EEP26, mostraron cargas < 1 Log UFC/mL en la hora 24. Siendo la concentración EEP26 la que mostró un constante decrecimiento en las poblaciones de *L. monocytogenes*, estadísticamente menores ($P < 0.05$) a las cargas reportadas por EEP13 bajo las mismas condiciones.

Se puede atribuir que *L. monocytogenes* es más susceptible al EEP en altas temperaturas, debido a la alta actividad metabólica de la bacteria a 25°C, lo que la hace más sensible a antimicrobianos. Por lo tanto, la tasa de reacción de los componentes antibacteriales es mayor (Banwart 1999; Mackowiak *et al.* 1982), efecto muy claramente mostrado en la Figura 1.

De acuerdo a lo discutido anteriormente tanto el pH como la temperatura mostraron un efecto sobre la susceptibilidad de *L. monocytogenes* hacia las concentraciones de EEP. Sin embargo, bajo algunas condiciones estos efectos parecen desobedecer esta generalización debido a la existencia de distintas interacciones entre los diferentes partes de los sistemas evaluados, que hace una variación importante en dichos resultados. Entre estas se encuentra la relación existente entre el efecto del propóleo y el pH, los cuales han demostrado ser sinérgicos, efecto atribuido a la estabilidad de algunos compuestos polifenólicos presentes en EEP (Zhu *et al.* 1997).

Por otra parte se encuentra la susceptibilidad de *L. monocytogenes* a agentes antimicrobianos, la cual aumenta al aumentar la temperatura, debido al incremento de la actividad metabólica de la bacteria (Banwart 1999). Por último se puede mencionar la relación que existe entre la temperatura y el pH, puesto que se ha demostrado que ha mayor temperatura, la bacteria se vuelve más ácido tolerante (Koutsoumanis *et al.* 2004).

De acuerdo a lo anterior, se puede decir que el mejor ambiente evaluado fue el que corresponde a un pH relativamente bajo (pH 5) y una temperatura baja (4°C). Bajo estas condiciones los compuestos polifenólicos son más estables y *L. monocytogenes* es menos ácido tolerante, lo que la hace más susceptible al efecto ejercido por las concentraciones de EEP evaluadas, siendo la concentración EEP26, la que mostró resultados más efectivos en dichas condiciones.

Fase 2: Comportamiento de la susceptibilidad de *L. monocytogenes* al EEP sobre la superficie de melón (*Cucumis melo*). El efecto de los tratamientos en el tiempo no presentaron una interacción y como se puede observar en el Cuadro 5. Los tratamientos presentaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre si, siendo el propóleo el tratamiento más efectivo para la reducción de la población de *L. monocytogenes* inoculada en superficie de melón, seguida del testigo de etanol y por ultimo el testigo agua.

Cuadro 5. Recuento de *L. monocytogenes* inoculada[∞] sobre superficie de melón y tratado con extracto etanólico de propóleo (EEP)[°] a pH 5 y almacenado a 4°C.

Tratamiento	(Log UFC/mL) ± DE ^ε
Agua	3.02±0.35a [¥]
Etanol	2.76±0.55 b
Propóleo	2.25±0.50 c
%CV	10.61

[∞]: Carga inoculada de *L. monocytogenes* antes del tratamiento 4.67 Log UFC/cm².

[°]: Concentración de EEP utilizada: 26.58 mg/mL.

^ε: DE: Desviación estándar.

[¥]: Medias con literales minúsculas distintas son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

En la Figura 2, se muestra el comportamiento de los tratamientos en el tiempo, en donde se puede observar que el tratamiento con agua y etanol fueron estadísticamente iguales en la hora 0, 24 y 48 horas. Mostrando una separación significativa ($P < 0.05$) en la carga microbiana a las 96 horas, siendo la población de agua mayor a la del etanol para esa hora.

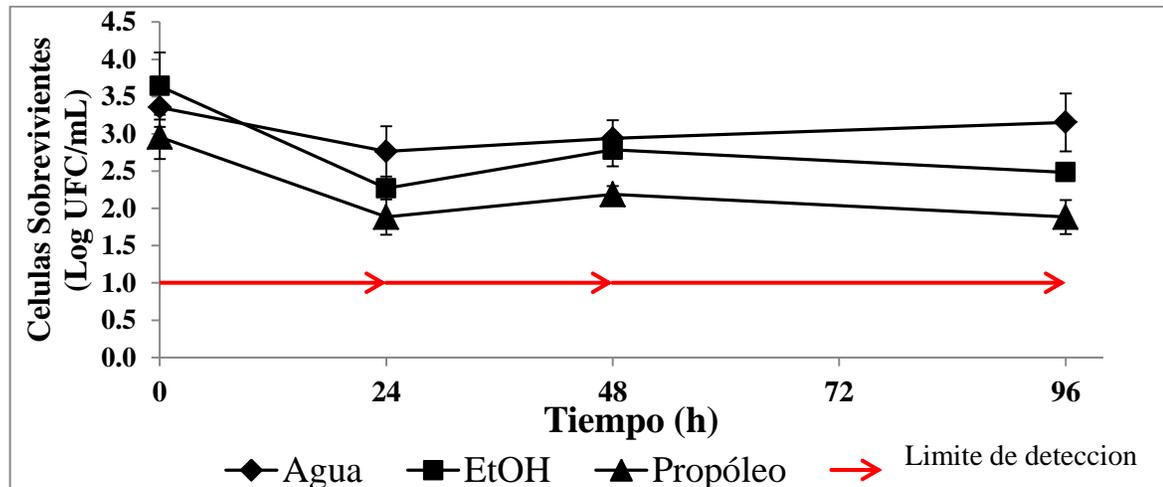


Figura 2. Comportamiento de *L. monocytogenes* inoculada sobre melón (*Cucumis melo*) y almacenada a 4°C durante 96 h, después de tratar la superficie con propóleo.

En cuanto al tratamiento con propóleo, este fue estadísticamente igual a los demás tratamientos en la hora 0, sin embargo este mostró una reducción significativa ($P < 0.05$) de la población bacteriana en la hora 24, población que no mostró cambios significativos

($P > 0.05$) a la hora 48 y 96 (Figura 2). Manteniendo poblaciones de *L. monocytogenes* más bajas que los testigos de etanol y propóleo. Sin embargo, este no fue efectivo para eliminar la presencia de la bacteria sobre la superficie de la cáscara de melón.

Estos resultados son contraproducentes con los resultados del análisis *in vitro*, en donde la concentración de propóleo de 26.58 mg/mL reportó conteos por debajo del límite de detección ($< 1 \text{Log/mL}$) desde la hora 6, en condiciones de pH 5 a 4°C, lo cual se le atribuye a que sobre la cáscara de melón, no se pudieron controlar ciertas variables como la concentración del propóleo por centímetro cuadrado, el pH de la cáscara y probablemente la volatilización de algunos compuestos. También se debe mencionar que el tiempo total que estuvo en contacto la superficie del melón y el tratamiento fueron solamente 3 minutos, a lo cual también se le puede atribuir la falta de efectividad del EEP.

No se han reportado estudios del efecto del EEP en la superficie del melón. Sin embargo, el comportamiento de *Listeria monocytogenes* en la superficie del melón mostró similar tendencia de crecimiento reportada por (Ukuku y Fett 2002) utilizando etanol como antimicrobiano la cual se redujo ligeramente la población durante las primeras 24 horas pero no eliminó *Listeria monocytogenes* en la superficie del melón manteniendo la presencia de la bacteria hasta 15 días almacenado a 4°C.

4. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de propóleo mostró un efecto antibacterial contra *L. monocytogenes*, *in vitro*.
- El extracto etanólico de propóleo mostró mayor efecto antibacterial contra *L. monocytogenes* a pH 5 que a pH 7, al igual que a concentración de 26.58 que a 13.26 mg/mL. La temperatura influyó sobre el efecto antibacterial del EEP contra *L. monocytogenes*, mostrando un efecto bacteriostático a 4°C y un efecto bactericida a 25 °C a pH 7. Mientras a pH 5 su comportamiento fue bactericida, mostrando un mayor efecto a 4°C.
- El extracto etanólico de propóleo redujo la carga de *L. monocytogenes* pero no fue eficaz para la eliminación de la misma sobre la superficie de melón (*Cucumis melo*).

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar el uso de propóleo en alimentos clasificados por la FDA como no favorecedores del crecimiento de *L. monocytogenes*, o alimentos con un pH menor o igual a 5, preferiblemente almacenados a 4°C.
- Realizar estudios relacionados con propóleos para evaluar propóleos provenientes de otras regiones y de distintas épocas, para determinar su poder bactericida sobre bacterias patógenas.
- Realizar una caracterización del perfil de flavonoides presentes en los propóleos de la región aledaña a Zamorano. técnicas de extracción de flavonoides del propóleo y su efecto antimicrobiano.

6. LITERATURA CITADA

- Ali, F.H., G.M Kassem, O.A. Atta-Alla. 2010. Propolis as a natural decontaminant and antioxidant in fresh oriental sausage. *Veterinaria italiana*. 46 (2). 167-172.
- Bankova, V.S., S.L. de Castro, M.C. Marcucci. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. 31 (1). 3-16.
- Banwart, G.J. 1999. *Basic food microbiology* (3erd. edn). New York. Van Nostrand Reinhold.
- Barker, C., S.F. Park. 2001. Sensitization of *Listeria monocytogenes* to Low pH, Organic Acids, and Osmotic Stress by Ethanol. *Applied and Environmental Microbiology*. 67 (4). 1594-1600.
- Bogdanov, S. 2012. Propolis: Composition, Health, Medicine: A review (en línea). Suiza. Consultado 19 jun. 2012. Disponible en <http://www.bee-hexagon.net/en/health.htm>.
- Bowen, A., A. Fry, G. Richards, L. Beauchat. 2006. Infections associated with cantaloupe consumption: a public health concern. *Epidemiology and infection*. 134 (4). 675-685.
- Center for Disease Control and Prevention. 2011. Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Whole Cantaloupes from Jensen Farms, Colorado (en línea). USA. Consultado 06 oct 2012. Disponible en <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cantaloupes-jensen-farms/120811/index.html>.
- Cushnie, T., A.J. Lamb. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26 (5). 343-356.
- da Silva, J.F., M.C. de Souza, S.R. Matta, M.R. de Andrade, F.V. Vidal. 2006. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry*. 99 (3). 431-435.
- Farber, J., P. Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological reviews*. 55 (3). 476.

FDA, US Department of Health and Human Services, Center for Food Safety and Applied Nutrition. 2008. Food and Drug Administration: Guidance for Industry: Control of *Listeria monocytogenes* in Refrigerated or Frozen Ready-To-Eat Foods; Draft Guidance (en línea). USA. FDA. Consultado 06 oct 2012. Disponible en <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodProcessingHACCP/ucm073110.htm#assume>.

Friedman, M., H.S. Jürgens. 2000. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48 (6). 2101-2110.

Gandhi, M. y M.L. Chikindas. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*. 113 (1). 1-15.

Gerónimo Mariñez, A.M. 2009. Comparación del efecto antimicrobiano del propóleo y el benzoato de sodio en mermelada de mango de la Escuela Agrícola Panamericana. Tesis. Ing. Agr. Alimentaria. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 24 p.

Harris, L., J. Farber, L. Beuchat, M. Parish, T. Suslow, E. Garrett y F. Busta. 2003. Outbreaks Associated with Fresh Produce: Incidence, Growth, and Survival of Pathogens in Fresh and Fresh-Cut Produce. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2 78-141.

ILSI Research Foundation, RSI. 2005. Achieving continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis—a risk-based approach. *Journal of Food Protection*. 68 (9). 1932-1994.

Kaewmanee, P. y C. Rachtanapun. 2011. Antimicrobial effect of ethanolic extracts of propolis against foodborne microorganisms (en línea). Thailand. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University. Consultado 02 oct 2012. Disponible en http://technology.kku.ac.th/food-technology/AFC2011/index.asp_files/Full_Paper/Addition_Full%2810082011%29/PB_050%28Full%29.pdf.

Koutsoumanis, K.P., P.A. Kendall y J.N. Sofos. 2004. A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and aw when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiology*. 21 (4). 415-422.

Latorre Viteri, P.C. 2008. Optimización de dos protocolos de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para la detección de *Listeria monocytogenes*. Tesis. Ing. Agr. Alimentaria. El Zamorano, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 30 p.

Lis Balchin, M. y S. Deans. 2003. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*. 82 (6). 759-762.

Lu, L.C., Y.W. Chen y C.C. Chou. 2003. Antibacterial and DPPH free radical-scavenging activities of the ethanol extract of propolis collected in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*. 11 (4). 277-282.

- Mackowiak, P.A., M. Marling-Cason y R.L. Cohen. 1982. Effects of temperature on antimicrobial susceptibility of bacteria. *Journal of Infectious Diseases*. 145 (4). 550-553.
- McLauchlin, J., R. Mitchell, W. Smerdon y K. Jewell. 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*. 92 (1). 15-33.
- Mohammadzadeh, S., M. Shariatpanahi, M. Hamedi, R. Ahmadkhaniha, N. Samadi y S.N. Ostad. 2007. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chemistry*. 103 (4). 1097-1103.
- Penteado, A.L. y M.F. Leitão. 2004. Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon and papaya pulps. *International Journal of Food Microbiology*. 92 (1). 89-94.
- SAS. 2002 -2010. SAS for Windows Statistics. Version 9.3 (TS1MO). SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Scallan, E., R.M. Hoekstra, F.J. Angulo, R.V. Tauxe, M.A. Widdowson, S.L Roy, J.L. Jones y P.M. Griffin. 2011. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging Infectious Diseases Journal*. 17 (1).
- Temiz, A., A. Şener, A.Ö. Tüylü, K. Sorkun y B. Salih. 2011. Antibacterial activity of bee propolis samples from different geographical regions of Turkey against two foodborne pathogens, *Salmonella Enteritidis* and *Listeria monocytogenes*. *Turkish Journal of Biology*. 35 503-511.
- Ukuku, D.O. y W. Fett. 2002. Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated on cantaloupe surfaces and efficacy of washing treatments to reduce transfer from rind to fresh-cut pieces. *Journal of Food Protection* 174;. 65 (6). 924-930.
- Velazquez, C., M. Navarro, A. Acosta, A. Angulo, Z. Dominguez, R. Robles, R. Robles-Zepeda, E. Lugo, F. Goycoolea y E. Velazquez. 2007. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology*. 103 (5). 1747-1756.
- Yang, H., C.M. Chang, Y.W. Chen, y C.C. Chou. 2006. Inhibitory effect of propolis extract on the growth of *Listeria monocytogenes* and the mutagenicity of 4-nitroquinoline-N-oxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86 (6). 937-943.
- Zhu, Q.Y., A. Zhang, D. Tsang, Y. Huang y Z.Y. Chen. 1997. Stability of green tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45 (12). 4624-4628.

7. ANEXOS

Anexo 1. Estimación de costos variables de soluciones de extracto etanólico de propóleo.

Costo de extracto etanólico de propóleo con una concentración de 132.9 mg/mL.

Concepto	Costo (L)	Unidad	Cantidad (mL)	Costo total (L)
Propóleo	0.330	g	200	66
Etanol	0.047	mL	1000	47
			Total	113
		Cantidad obtenida de EEP (ml)		
			972	
			Costo/mL	0.12
			Costo/litro	120

Costo de dilución de extracto etanólico de propóleo a 13.29 mg/mL (EEP13).

Concepto	Costo (L)	Unidad	Cantidad (mL)	Costo total (L)
EEP	0.12	mL	3	0.35
Agua			24	0.00
		Total	27	0.35
			Costo/mL	0.013
			Costo/litro	13

Costo de dilución de extracto etanólico de propóleo a 26.58 mg/mL (EEP26).

Concepto	Costo (L)	Unidad	Cantidad (mL)	Costo total (L)
EEP	0.12	mL	6	0.70
Agua			24	
		Total	30	0.70
			Costo/mL	0.023
			Costo/litro	23

Tasa de cambio: 1 Dólar = 19.78 Lempiras.

Anexo 2. Recuento de *L. monocytogenes* expuesta a caldo universal de preenriquecimiento (UPE), adicionado con extracto etanólico de propóleo (EEP)[¥], agua o etanol^Φ, influenciado por el pH del medio, la temperatura y tiempo de exposición.

Tratamientos			Recuentos de <i>L. monocytogenes</i> (Log UFC/mL)							
Temperatura (°C)	pH	Concentración	Tiempo							
			0 h	6 h	12 h	24 h				
25	7	Agua	4.21±0.14 ab (Y) [€]	6.29±0.40 a (X)	6.20±0.65 a (X)	8.29±0.71 a (W)				
25	7	EtOH	3.50±0.54 bc (W)	3.07±0.61 bc (WX)	4.03±0.31 b (W)	2.16±0.39 de (X)				
25	7	EEP13	2.89±0.04 cd (W)	2.66±0.49 c (W)	2.95±0.49 c (W)	<1.0±0.00 f(X)				
25	7	EEP26	3.02±0.04 c (W)	2.63±0.57 c (W)	1.77±0.27 d (X)	<1.0±0.00 f(Y)				
25	5	Agua	3.75±0.14 b (Y)	5.95±0.45 a (X)	5.78±0.36 a (W)	7.70±0.56 a (W)				
25	5	EtOH	3.58±0.36 b (W)	2.72±0.31 c (X)	3.92±0.57 bc (W)	1.80±0.17 e (Y)				
25	5	EEP13	2.10±0.17 d (W)	2.54±0.62 c (W)	2.75±0.80 c (W)	<1.0±0.00 f(X)				
25	5	EEP26	2.61±0.12 cd (W)	<1.0±0.00 e(X)	<1.0±0.00 e(X)	<1.0±0.00 f(X)				
4	7	Agua	4.35±0.35 a (X)	6.50±0.08 a (W)	6.11±0.32 a (W)	6.20±0.48 b (W)				
4	7	EtOH	3.43±0.44 bc (X)	3.51±0.22 b (X)	4.20±0.11 b (W)	3.54±0.44 c (X)				
4	7	EEP13	3.33±0.12 bc (W)	2.24±0.24 cd (X)	2.65±0.33 c (X)	2.68±0.59 d (X)				
4	7	EEP26	2.97±0.21 c (W)	2.22±0.23 cd (X)	2.65±0.50 c (WX)	2.59±0.50 d(WX)				
4	5	Agua	3.95±0.12 ab (Z)	6.41±0.07 a (W)	5.83±0.08 a (X)	6.07±0.20 b (Y)				
4	5	EtOH	3.25±0.83 bc (W)	3.39±0.20 b (W)	3.30±0.30 c (W)	3.29±0.34 cd (W)				
4	5	EEP13	2.40±0.45 d (W)	1.86±0.02 d (X)	<1.0±0.00 e(Y)	<1.0±0.00 f(Y)				
4	5	EEP26	2.20±0.17 d (W)	<1.0±0.00 e(X)	<1.0±0.00 e(X)	<1.0±0.00 f(X)				
		%CV	10.44	9.93	11.53	12.43				

¥: Concentraciones del medio UPE con extracto etanólico de propóleo en el medio utilizadas: 13.29 mg/mL (EEP13) y 26.58 mg/mL (EEP26).

Φ: Concentración final de etanol en el medio 19% (EtOH), la concentración agua hace referencia a el medio UPE, normal, sin adición de agentes antibacteriales.

€: Literales minúsculas se comparan en la misma columna y literales mayúsculas se comparan en la misma fila. Literales distintas muestran diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

Anexo 3. Resumen del análisis de varianza de Fase 1 (*in vitro*). Diseño de bloques completos al azar con arreglo trifactorial y medidas repetidas en el tiempo.

Fuente	Valor F	Pr>F
Bloque	2.83	0.0630
Temperatura (A)	0.86	0.3544
pH (B)	154.49	<.0001
Concentración (C)	1253.08	<.0001
A*B	15.75	0.0001
A*C	10.02	<.0001
B*C	17.12	<.0001
A*B*C	7.06	0.0002
A*B*C*tiempo	2.17	0.0284