



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN JUAN
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

Departamento de Biología

Trabajo final para optar al título de la Licenciatura en Biología

***“Optimización de la extracción de compuestos fenólicos, mediante el
diseño de Box Behnken, de propóleos de San Juan para potenciar su
actividad antimicrobiana”***



Carrera: Licenciatura en Biología

Autora: Silva Illanes Milagros Matilde

Asesora: Dra. Beatriz Lima

Co-asesora: Lic. María Belén Ariza



Año: 2026



DEDICATORIA

A quienes creyeron en mí, me impulsaron a estudiar y me apoyaron para hacerlo posible, Mis papás: Rodolfo y Susana.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, porque cada vez que le pedí voluntad para estudiar, me la dio, cuando le pedí fuerzas frente a la ansiedad de algún examen reprobado, me sostuvo, y cuando le pedí perseverancia y paciencia a lo largo de los años, también me acompañó.

A mis papás, Rodolfo y Susana, por siempre estar presente, por apoyarme e inculcarme el estudio y sobre todo por creer en mí.

A mí hermana, Ailén, por bancarme en todo, por ayudarme cuando lo necesite, gracias.

A quienes se alegraban en cada logro, quienes me deseaban lo mejor y comprendieron cada vez que les decía la frase “no puedo tengo que estudiar”, mi familia y mis amigas, gracias.

A quienes compartieron conmigo las aulas, mis facu-amigos, gracias por hacer que este camino fuera más liviano y disfrutable.

A mis directoras, Beatriz y Belén, gracias por enseñarme, por corregirme con amor cada vez que me equivocaba, gracias por ser mis guías en esta etapa.

A Jessica y Daniela por ayudarme, por tomarse el tiempo y colaborar conmigo sin tener ninguna obligación, gracias.

A la universidad pública y a todos mis docentes, por recibirme y darme la oportunidad de aprender.

Y, por último, pero no menos importante, gracias Mili, porque, aunque tuviste inseguridades y miedos, te animaste y nunca dejaste de confiar en vos misma.

Listado de abreviaturas y símbolos:

AG: Ácido gálico

CAPE: Éster fenético del ácido cafeico

CBM: Concentración bacteriostática mínima

CFM: Concentración fungistática mínima

CFT: Contenido de compuestos fenólicos totales

CIF: Concentración inhibitoria fraccionaria

CIMs: concentraciones inhibitorias mínimas

DBB: Diseño Box-Behnken

DMSO: Dimetilsulfóxido

DC: Droga comercial

DE: Desviación estándar

DO: Densidad óptica

EEP: Extractos experimentales de propóleos

ICIF: Índice de concentración inhibitoria fraccionaria

IRD: Índice de reducción de dosis

L: litro

MeOH: metanol

mg EAG/g EEP: miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto experimental de propóleos

MQ1, MQ2: Aislados clínicos provenientes del Hospital Dr. Marcial Quiroga

MSR: Método de Superficie de Respuesta

MNDGA: 3'-metil-ácido nordihidroguaiaretico

NDGA: Ácido nordihidroguaiaretico

RAM: Resistencia a los Antimicrobianos

SR: Superficies de respuesta

UAE: extracción asistida por ultrasonido

UFC: Unidad Formadora de Colonias

UV: Radiación ultravioleta

µg: microgramo

µL: microlitro

Khz: Kilohercio

W: vatios

ÍNDICE

RESUMEN.....	7
1.INTRODUCCIÓN	10
1.1 Resistencia a los Antimicrobianos.....	10
1.2 Productos naturales antimicrobianos	11
1.2.1 Propóleos, su origen y composición	11
1.2.2 Compuestos fenólicos	12
1.2.3. Compuestos fenólicos presentes en los Propóleos.....	12
1.2.4 Propiedades biológicas y usos de los Propóleos	13
1.3 Extracción de moléculas naturales	14
1.3.1. Extracciones convencionales	14
1.3.2 Extracción asistida por ultrasonido (UAE).....	14
1.4 Optimización de la extracción de compuestos naturales: compuestos fenólicos	15
1.4.1 Método de Superficie de Respuesta: Diseño Box Behnken	16
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	18
2.1 HIPÓTESIS GENERAL.....	18
2.2 OBJETIVO GENERAL.....	18
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1 Material de estudio	19
3.1.1 Recolección de muestras de propóleo.....	19
3.1.2 Preparación de las muestras	20
3.1.3 Optimización de la extracción de compuestos fenólicos mediante la Metodología de Superficie de Respuesta (MRS) y el diseño de Box-Behnken diseño DBB.....	21
3.1.4 Preparación de la muestra según diseño experimental DBB	22
3.2 Compuestos fenólicos.....	23
3.2.1 Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales	23
3.3 Análisis de datos.....	23
3.4. Actividad antibacteriana.....	24
3.4.1. Ensayo antibacteriano: determinación de la CIM.....	24
3.5. Actividad antifúngica	25
3.5.1. Ensayo antifúngico: determinación de la CIM	26
3.6. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima y Concentración Fungicida Mínima	26

3.7 Efecto combinatorio de los EEP con drogas comerciales: Diseño de Tablero de Ajedrez	27
3.7.1. Cálculo de la Concentración Inhibitoria Fraccionaria y el Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional.....	27
3.7.2. Índice de Reducción de Dosis.....	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
4.1 Optimización de la extracción de compuestos fenólicos mediante DBB.....	29
4.2 Determinación de compuestos fenólicos totales	30
4.2.1 Superficies de respuesta y análisis estadístico	31
4.2.1.1 Análisis de datos de los EEP de Iglesia, Bauchaceta	32
4.2.1.2. Análisis de datos de los EEP de Ullum.....	34
4.3 Actividad biológica del propóleo	37
4.3.1 Actividad antimicrobiana de propóleos de Iglesia, Bauchaceta.	37
4.3.1.1 Actividad antibacteriana.....	37
4.3.1.2 Actividad antifúngica.....	40
4.3.2 Actividad antimicrobiana de propóleos de Ullum	43
4.3.2.1 Actividad antibacteriana.....	43
4.3.2.2 Actividad antifúngica	46
4.4 Efecto combinatorio con drogas comerciales.....	48
4.4.1 Combinación de la terna más activa de EEP de Iglesia (Bauchaceta) con imipenem frente a bacterias Gram (+) y con ketoconazol frente a la levadura <i>C. albicans</i>	50
4.4.2 Combinación de las ternas más activas de EEP de Ullum con imipenem frente a bacterias Gram (+) y con ketoconazol frente a la levadura <i>C. glabrata</i>	52
4.5 Difusión de resultados	53
5. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES	54
5.1 Conclusiones	54
5.2 Proyecciones.....	56
6. BIBLIOGRAFÍA	57

RESUMEN

Los propóleos son un producto natural elaborado por las abejas (*Apis mellifera*), cuyo perfil químico constituye una fuente de moléculas bioactivas de interés terapéutico. La composición química del propóleo (compuestos fenólicos) depende en gran medida, de la disponibilidad de la flora circundante a la colmena, ya que las abejas incorporan en este material sustancias presentes en las especies vegetales. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue optimizar la extracción de compuestos fenólicos de propóleos provenientes de dos departamentos de la provincia de San Juan (Iglesia y Ullum) Argentina, mediante la aplicación del diseño experimental Box–Behnken (DBB), con el fin de potenciar su actividad antimicrobiana.

Las variables fisicoquímicas independientes del modelo fueron: la temperatura, la concentración de etanol:agua y el tiempo de sonicación, utilizando extracción asistida por ultrasonido. El contenido de compuestos fenólicos totales fue determinado mediante el método de Folin–Ciocalteu. La actividad antimicrobiana de los extractos experimentales de propóleos (EEP) fue evaluada frente a bacterias y levaduras tipificadas y aislados clínicos del Hospital Marcial Quiroga de San Juan, mediante los protocolos de la CLSI.

Las condiciones óptimas de extracción correspondieron a 50 °C, etanol al 91% y tiempo de sonicación 17 min para los extractos del propóleo del departamento Iglesia (Bauchaceta), mientras que, para la muestra de Ullum, las condiciones óptimas fueron: 39 °C, 21 min de tiempo de sonicación y 88% de concentración de alcohol. Ambos departamentos alcanzaron concentraciones de compuestos fenólicos ≥ 250 mg EAG/g. En relación con el ajuste del modelo, en los extractos de propóleos provenientes de Ullum, se obtuvo un coeficiente de determinación (R^2) del 99%, lo que indicó que el modelo representó adecuadamente los datos experimentales. Mientras que, en los EEP de Iglesia (Bauchaceta), el R^2 fue de un 67% y el valor de p resultó mayor a 0,05, evidenciando que el modelo no logró describir con la misma precisión el comportamiento observado.

La actividad antibacteriana de los EEP de Iglesia (Bauchaceta), mostraron valores de Concentración Inhibitoria Mínima (CIMs) entre 31,5-125 $\mu\text{g/mL}$ y sus Concentraciones Bactericidas Mínimas (CBMs) obtenidos fueron en un rango de 31,5-500 $\mu\text{g/mL}$, frente a las bacterias Gram (+) evaluadas y su efecto antifúngico, frente a los hongos levaduriformes mostraron valores de CIMs en un rango de 62,5-500 $\mu\text{g/mL}$. Con respecto a los EEP de Ullum,

tuvieron un efecto antibacteriano con valores de CIM de 62,5 a 500 $\mu\text{g/mL}$, mientras que, la propiedad antifúngica para los diferentes tratamientos, fue potente frente a *Candida glabrata* (CIM=50 $\mu\text{g/mL}$).

En relación al efecto de combinación entre los EEP activos de ambos departamentos con los agentes comerciales (imipenem y ketoconazol); se evidenció un efecto aditivo con valores de índice de concentración inhibitoria fraccionaria (ICIF) entre 0,5-2,0, con índice de reducción de dosis IRD de imipenem y ketoconazol de 4 y hasta 8 veces su valor. Este efecto, permitió reducir las toxicidades de antibióticos y antifúngicos, sin comprometer la actividad antimicrobiana. Finalmente, los resultados de este trabajo presentan proyecciones interesantes que permitirán potenciar las propiedades de los propóleos de San Juan, a través de diferentes métodos y diseños estadísticos para la extracción de compuestos bioactivos.

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Resistencia a los Antimicrobianos

En la actualidad, la resistencia a los antimicrobianos constituye un problema de salud pública global que ha impulsado la búsqueda de nuevas moléculas y productos naturales alternativos para el control de infecciones (Queiroga *et al.*, 2023). Desde el enfoque de **Una Sola Salud (One Health)**, un marco integrado que busca mejorar de manera sostenible la salud humana, animal y ambiental (OMS), se reconoce que los genes de resistencia pueden transferirse lateralmente entre microorganismos. Este fenómeno, sumado a la emergencia de agentes patógenos capaces de producir biofilms como *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Candida no albicans*, agrava la situación, ya que estos microorganismos son responsables de importantes infecciones humanas (Queiroga *et al.*, 2023).

En el contexto actual, caracterizado por el avance de la resistencia antimicrobiana, las estrategias para enfrentar este fenómeno incluyen el monitoreo adecuado de patógenos, el uso racional de antibióticos, el empleo de terapias combinadas y la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas provenientes de **fuentes naturales** (Brunetti *et al.*, 2020) que permitan ampliar la química de compuestos bioactivos y/o reducir en parte, la toxicidad que genera el uso de agentes antimicrobianos comerciales. Este fenómeno se esquematiza en la Figura 1, donde se resumen las principales causas y consecuencias de la resistencia antimicrobiana (Fig. 1).

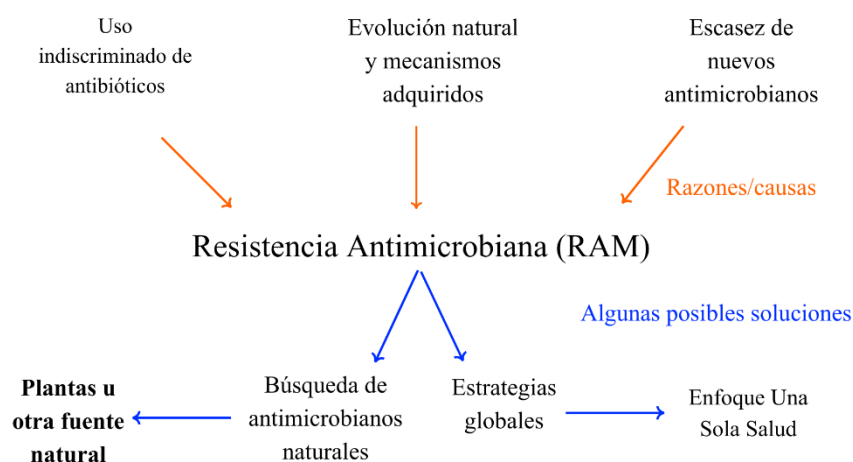


Fig. 1. Resistencia antimicrobiana, causas y efectos (Díaz *et al.*, 2021)

Específicamente, los productos naturales de la colmena como el propóleo han despertado un interés creciente como alternativa prometedora para el desarrollo de agentes con actividad antifúngica y antibacteriana debido a su contenido de compuestos bioactivos. Además, la literatura destaca el potencial de las terapias combinadas que emplean propóleo junto con antibióticos, ya que esta estrategia puede reducir la toxicidad asociada a los fármacos convencionales y mejorar la eficacia del tratamiento de infecciones relacionadas con la formación de biofilms (Kwiecińska-Piróg *et al.*, 2018).

1.2 Productos naturales antimicrobianos

1.2.1 Propóleos, su origen y composición

El **propóleo** es un producto natural compuesto por sustancias resinosas y balsámicas, ceras, aceites esenciales y polen, de consistencia viscosa, elaborado por las abejas (*Apis mellifera*) a partir de ciertas especies vegetales. Estos materiales son transportados al interior de la colmena, donde son parcialmente modificados mediante secreciones salivares (Normas IRAM-INTA, 2008).

La composición química del propóleo depende en gran medida, de la disponibilidad de la flora circundante a la colmena, ya que las abejas incorporan en este material sustancias presentes en las plantas (Suárez *et al.*, 2013). A ello se suman factores geográficos, edafoclimáticos (condiciones del suelo y el clima) y estacionales, que contribuyen a explicar la notable variabilidad existente entre distintos tipos de propóleos a nivel regional y mundial (Rodríguez *et al.*, 2020). Esta diversidad representa una oportunidad para identificar propóleos con perfiles químicos particulares y propiedades bioactivas distintivas. La estrecha relación entre el propóleo y la flora local es un aspecto clave, ya que las plantas actúan como fuentes directas de los compuestos bioactivos transferidos al propóleo. En consecuencia, los metabolitos presentes en las resinas vegetales determinan en gran medida sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias y antiproliferativas (Montiel *et al.*, 2023).

En la provincia de San Juan, se han identificado compuestos con fuerte actividad antimicrobiana en propóleos asociados botánicamente a diferentes especies entre ellas *Larrea nítida* (Lima *et al.*, 2009; Agüero *et al.*, 2011; Gómez *et al.*, 2019). De este modo, la relación entre el propóleo y la flora local resulta clave para comprender su composición química y su potencial bioactivo.

1.2.2 Compuestos fenólicos

Las plantas son capaces de sintetizar un elevado número de **compuestos fenólicos** como producto de su metabolismo secundario normal. Es decir, son moléculas que participan en la defensa contra la radiación ultravioleta (UV), patógenos y otros depredadores. Por ello, su presencia en los órganos de los vegetales los convierte en metabolitos interesantes para ser evaluados (Alara *et al.*, 2021).

Químicamente, los compuestos fenólicos poseen uno o más grupos hidroxilos unidos a un anillo aromático, lo que le confiere una amplia diversidad de actividades biológicas. Estos compuestos pueden ejercer actividad antimicrobiana mediante la alteración de las membranas celulares de microorganismos. Asimismo, pueden actuar como antioxidantes al neutralizar radicales libres generalmente por transferencia del átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo, lo que evita la propagación de reacciones en cadena (Khanna., *et al* 2023,). Además, estos metabolitos desempeñan un papel relevante debido a su capacidad de ejercer efectos protectores frente al estrés oxidativo y la inflamación provocados por partículas en suspensión en el aire. En este contexto, se les atribuye una amplia variedad de actividades biológicas, entre ellas propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, antienvjecimiento, antibacterianas, antifúngicas y antivirales (Rahman *et al.*, 2021; Chouikh., *et al* 2025).

De manera de preservar estas actividades biológicas, es fundamental considerar no solo la forma de extracción empleada para obtener estos compuestos, sino también factores como el disolvente a utilizar, proporción del mismo, temperatura, tiempo de extracción y otros parámetros experimentales (Zhu *et al.*, 2025).

1.2.3. Compuestos fenólicos presentes en los Propóleos

Un aspecto importante a destacar en la composición química, es que el 50 % del propóleo está constituido por resinas y bálsamos vegetales. Esta fracción de resinas y bálsamos es rica en compuestos fenólicos conformados principalmente por flavonoides como flavonas, flavonoles y flavanonas, además de cumarinas, derivados del alcohol bencílico y cinámico, triglicéridos fenólicos, terpenos, esteroides y polisacáridos, entre otros compuestos (Becerra *et al.*, 2022). También se destacan diversos ácidos orgánicos, como benzoico y sus derivados, ácido gálico, cafeico, cinámico y *p*-cumárico, así como aldehídos aromáticos como vainillina e isovainillina.

Dentro de los polifenoles, compuestos como la pinocembrina, galangina, pinobanksina y el éster fenílico del ácido cafeico (CAPE) destacan por sus reconocidas propiedades biológicas, especialmente su actividad antioxidante, antiinflamatoria, y antimicrobiana (Marquez, 2025). Además, en diferentes tipos de propóleos sanjuaninos asociados al género *Larrea*, se han identificado lignanos de interés, que incluye el 3'-metil-ácido nordihidroguaiarético (MNDGA) y el ácido nordihidroguaiarético (NDGA), moléculas con actividades antioxidante y antimicrobiana ampliamente documentadas (Fig 2) (Lima, 2007; Lima *et al.*, 2009; Agüero *et al.*, 2011; Agüero *et al.*, 2014).

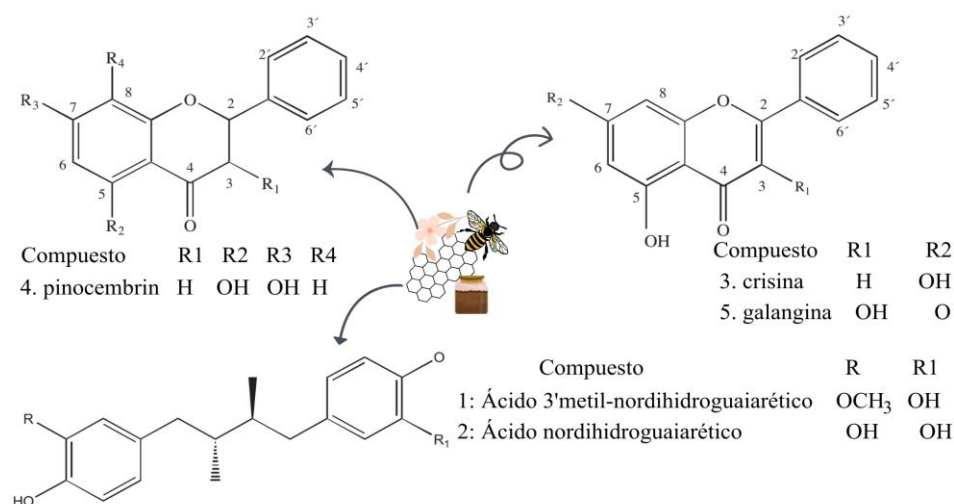


Fig. 2. Compuestos aislados de muestras de propóleos urbanos de San Juan (Agüero *et al.*, 2014)

1.2.4 Propiedades biológicas y usos de los Propóleos

Las propiedades de los productos derivados de la colmena son amplias y bien documentadas, y los propóleos no son la excepción (Nader *et al.*, 2021). Esta resina natural cuenta con una extensa tradición terapéutica que se remonta a diversas civilizaciones antiguas; de hecho, evidencias de su aplicación provienen del Oriente Medio y del Antiguo Egipto, donde era empleado con fines medicinales, cicatrización de heridas y rituales, según se informa en tabletas de arcilla mesopotámicas de más de 5000 años de antigüedad y en el Papiro de Ebers (Salamanca Grosso, 2017).

En la actualidad, este producto natural ha sido utilizado en numerosos países como remedio para heridas, quemaduras, afecciones de garganta y trastornos gastrointestinales (Bankova *et al.*, 2019). Además, su interés científico se sustenta en la gran diversidad de actividades biológicas atribuidas a sus componentes. Entre ellas, se destacan efectos antibacterianos, fungicidas, antivirales, anestésicos, antiulcerosos, inmunoestimulantes, hipotensores, citostáticos, antioxidantes, anticariogénicos, citotóxicos, antiinflamatorios y moduladores del síndrome metabólico, entre otros (Agüero *et al.*, 2010; Salas *et al.*, 2020; Zampini *et al.*, 2021; Jami Jami *et al.*, 2024).

Particularmente el propóleo se utiliza para prevenir enfermedades y mejorar la sanidad y bienestar animal y/o humano. Los estudios demuestran efectos positivos en el tratamiento de enfermedades infecciosas (Ramos, 2020). Además, debido a sus propiedades antiinflamatorias, los propóleos son un producto potencialmente terapéutico estos desempeñan un papel importante en procesos que comprometen la integridad de piel y mucosas, asociados a inflamación, infección y riesgo de contaminación. (Cedeño *et al.*, 2020; Zuhendri *et al.*, 2021),

1.3 Extracción de moléculas naturales

1.3.1. Extracciones convencionales

Los métodos de extracción convencionales como la maceración, la hidrodestilación, la percolación, el método Soxhlet, entre otros; se caracterizan principalmente por el uso de grandes volúmenes de disolventes y procedimientos manuales que dependen en gran medida del investigador y requieren una alta demanda de mano de obra. Estas limitaciones se reflejan en rendimientos variables, baja reproducibilidad lo que dificulta la estandarización con fines biológicos. (Alara *et al.*, 2021; Yilmaz *et al.*, 2024). Asimismo, diversos factores influyen en la extracción de compuestos activos, como el disolvente empleado, la naturaleza y preparación de la muestra, la temperatura, el tiempo de extracción, que determinan el rendimiento y la calidad del extracto (Montiel *et al.*, 2023).

1.3.2 Extracción asistida por ultrasonido (UAE)

La extracción asistida por ultrasonido (UAE) se considera un método eficiente y económicamente viable, ya que permite optimizar variables como el tiempo de extracción y la temperatura mejorando el rendimiento y la rentabilidad del proceso (Bankova *et al.*, 2021). En

esta misma línea, Fajardo *et al.*, (2022) señalaron que la UAE constituye una excelente alternativa a los métodos tradicionales debido a su simplicidad y eficiencia, pues permite obtener una alta reproducibilidad en menor tiempo, además de reducir significativamente el consumo de solvente y aporte energético requerido. El ultrasonido opera mediante la transmisión de ondas sónicas en un medio líquido, generando ciclos alternos de compresión y rarefacción. Durante estos ciclos, se produce una presión negativa que rompe el líquido, creando inicialmente un vacío y, posteriormente, burbujas o cavidades, fenómeno conocido como cavitación (Montiel *et al.*, 2023). Además, diversas investigaciones han demostrado que la UAE incrementa de forma significativa el rendimiento de recuperación de **compuestos fenólicos** en comparación con los métodos convencionales de extracción, lo que refuerza su utilidad en la obtención eficiente de moléculas bioactivas (Bonfigli *et al.*, 2017).

Asimismo, la extracción asistida por ultrasonido (UAE) depende de diversos parámetros operativos, tales como la temperatura, el tiempo de sonicación, la frecuencia y la relación solvente/muestra, los cuales pueden influir significativamente en la eficiencia del proceso. En este contexto, el uso de herramientas estadísticas de optimización resulta necesario para evaluar simultáneamente estos factores y determinar las condiciones que maximicen la recuperación de compuestos bioactivos.

1.4 Optimización de la extracción de compuestos naturales: compuestos fenólicos

En la actualidad, los extractos vegetales o productos naturales asociados han adquirido cada vez mayor importancia debido a su contenido de metabolitos **bioactivos**, como los **compuestos fenólicos** (Proestos *et al.*, 2017). Sin embargo, para preservar al máximo las propiedades biológicas de estos compuestos, la **extracción** de los mismos debe ser eficiente (Bonfigli *et al.*, 2017).

Vázquez-Espinosa *et al.* (2023) han informado que los métodos de extracción tradicionales presentan limitaciones importantes, ya que se basan en la modificación de una sola variable a la vez, mientras el resto permanece constante. Este enfoque dificulta la comprensión integral del proceso, dado que impide evaluar las interacciones entre los distintos factores del sistema y requiere un número elevado de ensayos experimentales, lo que incrementa tanto el consumo de recursos como el tiempo necesario para la investigación (El Oihabi *et al.*, 2024). Asimismo, no existe un procedimiento aceptado que permita a partir de

materiales naturales, la extracción de los compuestos de interés o de un grupo específico, por lo tanto, es necesario establecer un **proceso optimizado** para la recuperación de los mismos (Alara *et al.*, 2021).

Dentro del marco de esta tesis, **la optimización** orientó a incrementar el rendimiento y la eficiencia de la extracción de los compuestos fenólicos, sin aumentar los costos ni el tiempo de procesamiento. Para lograrlo es importante la incorporación de estrategias de análisis estadístico multivariante que posibilita el estudio simultáneo de múltiples variables y sus interacciones, ofreciendo una representación más completa y precisa del comportamiento del sistema de acuerdo a lo informado por Vázquez-Espinosa *et al.*, (2023).

1.4.1 Método de Superficie de Respuesta: Diseño Box Behnken

El Método de Superficie de Respuesta (MSR) se ha consolidado como una herramienta matemática ampliamente utilizada para la **optimización** de procesos, ya que permite establecer las principales variables y sus interacciones (Cano *et al.*, 2023). Asimismo, este método investiga la relación entre diversas variables explicativas (independientes) y una o más variables de respuesta (dependientes) (Mahallati, 2020).

Por otro lado, la aplicación del MSR en la extracción de compuestos fenólicos o polifenoles permite explorar de manera eficiente las condiciones óptimas de extracción y también facilita el desarrollo de modelos matemáticos precisos que posibilitan la estimación de concentraciones deseadas y la predicción del comportamiento del sistema bajo distintas condiciones (Rivera *et al.*, 2024). Su aplicación constituye una herramienta eficaz para maximizar la eficiencia de extracción y garantizar la obtención de concentraciones significativas de compuestos activos, como los fenólicos con propiedades biológicas como las antimicrobianas.

En este sentido, el **Diseño Box-Behnken (DBB)** desempeña un papel fundamental dentro de las metodologías de superficie de respuesta, especialmente en aquellos estudios donde se busca economía en el diseño experimental y una predicción precisa de la varianza. Este tipo de diseño se caracteriza por emplear únicamente tres niveles para cada factor, lo que permite reducir el número de ensayos sin comprometer la calidad de la información obtenida (Barabadi *et al.*, 2014). El DBB se utiliza ampliamente en la optimización de procesos, ya que facilita la evaluación de las condiciones más adecuadas para maximizar la respuesta de interés,

permitiendo predecir el comportamiento del sistema dentro del rango experimental evaluado (Zalazar *et al.*, 2022.).

En la provincia se han identificado diferentes propiedades del propóleo, tales como su actividad antioxidante y antimicrobiana frente a microorganismos patógenos humanos, sus propiedades agronómicas y efecto inhibidor frente a enzimas de importancia para la salud humana. Sin embargo, la eficiencia en la obtención de compuestos bioactivos de propóleos es un área poco explorada bajo enfoques de optimización de procesos. Resulta crítico profundizar en el perfeccionamiento de las condiciones de extracción, dado que la concentración de moléculas fenólicas varía significativamente según el origen geográfico y la metodología empleada. Por tal motivo este trabajo propone evaluar la optimización de las extracciones de compuestos fenólicos de propóleos de dos departamentos de la provincia de San Juan.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS GENERAL

“El diseño experimental de Box-Behnken permite identificar las condiciones óptimas de extracción de compuestos fenólicos de propóleos de dos departamentos de San Juan, potenciando su actividad antimicrobiana frente a microorganismos de importancia clínica”.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Optimizar la extracción de compuestos fenólicos aplicando el diseño de Box Behnken de propóleos de dos departamentos de San Juan, para potenciar su actividad antimicrobiana.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Optimizar las condiciones de obtención de compuestos fenólicos de propóleos de dos departamentos, mediante el diseño estadístico Box-Behnken.
- 2) Determinar el contenido de compuestos fenólicos de los extractos experimentales.
- 3) Evaluar la actividad antimicrobiana frente a bacterias y levaduras tipificadas y aisladas provenientes del Hospital Marcial Quiroga de San Juan.
- 4) Evaluar el potencial efecto combinatorio de los extractos activos con agentes antimicrobianos y antifúngicos
- 5) Difundir los resultados en Congresos y Eventos científicos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material de estudio

3.1.1 Recolección de muestras de propóleo

Las muestras de propóleos se recolectaron de los departamentos de la provincia de San Juan: Iglesia, de la localidad de Bauchaceta, ubicada en 30°30'38.9" S 69°27'33.2" O, y del departamento Ullum, localizado en 31°26'25.3" S y 68°42'39.6" O (Fig. 3). La obtención de las muestras se realizó mediante la técnica de raspado, con la colaboración de apicultores locales durante el mes de marzo de 2025.

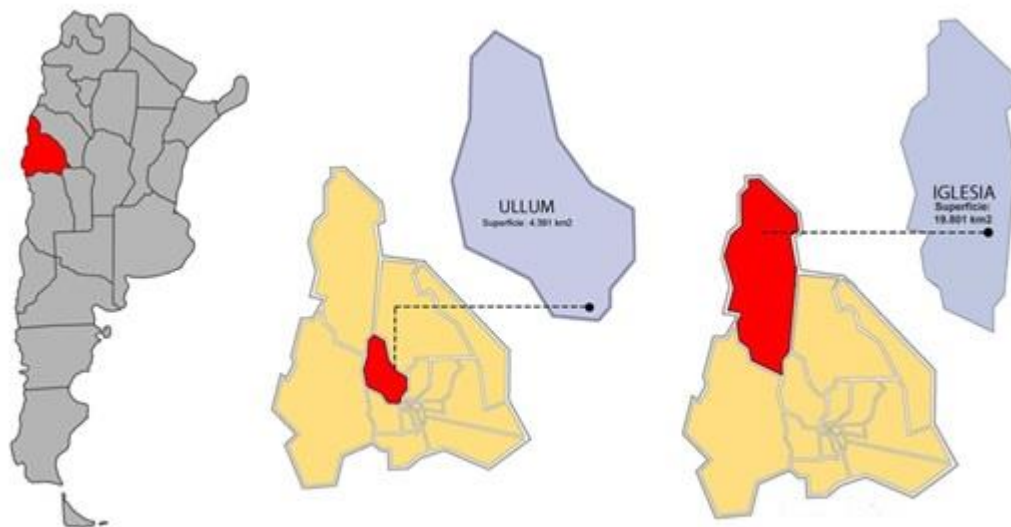


Fig. 3. Sitios de colecta del material de estudio, Argentina, San Juan.

En el departamento de **Iglesia distrito Bauchaceta**, la flora dominante alrededor de los apiarios se constituye principalmente por la especie *Larrea nítida* Cav. conocida comúnmente como “Jarilla o Jarilla crespá” (fotografía 1). Por otro lado, la flora circundante del apiario en el departamento **Ullum** está constituida por *Neltuma nigra* “algarrobo negro”, *Ligaria cuneifolia* “liga”, *Larrea divaricata* “Jarilla”, *Schinus molle* “aguaribay”, *Tessaria absinthioides* “pájaro bobo”, *Capparis atasmiquea* “atamisque” (fotografía 2).

A continuación, se presentan las fotografías de los sitios de colecta.



Fotografía 1. Colmenas ubicadas en el Departamento de Iglesia, localidad de Bauchaceta, Iglesia



Fotografía 2. Colmenas ubicadas en el departamento de Ullum

3.1.2 Preparación de las muestras

Las muestras de propóleos obtenidas de cinco colmenas de cada departamento se trasladaron inmediatamente al laboratorio del Instituto de Biotecnología, se etiquetaron y almacenaron a 4 °C en ausencia de luz para sus tratamientos posteriores. Luego, las muestras se molieron a polvo fino mediante molinillo (Fotografía 3), se tomó una porción de cada colmena, obteniéndose una única muestra representativa para cada departamento.



Fotografía 3. Propóleo en polvo fino

3.1.3 Optimización de la extracción de compuestos fenólicos mediante la Metodología de Superficie de Respuesta (MRS) y el diseño de Box-Behnken diseño DBB

Para la optimización de las condiciones de extracción, se aplicó la Metodología de Superficie de Respuesta (MRS) empleando un diseño experimental de Box-Behnken (DBB) de tres factores y tres niveles. Este enfoque permite modelar matemáticamente la interacción entre las variables y determinar las condiciones óptimas mediante el análisis de las superficies de respuesta generadas. Los niveles de las variables operativas (Tabla 1) se seleccionaron y ajustaron siguiendo los criterios de Aboulghazi *et al.*, (2022) y Oldoni *et al.*, (2015)

Tabla 1. Niveles actuales y codificados de las variables independientes utilizadas para el DBB

Variables Independientes	Unidades codificadas	Niveles de Variables			Unidad
		-1	0	1	
Temperatura del sonicado	X ₁	25	37,5	50	° C
Solventes Extracción (EtOH:H ₂ O)	X ₂	80:20	90:10	100:0	ppm
Tiempo de sonicado	X ₃	10	20	30	min

3.1.4 Preparación de la muestra según diseño experimental DBB

A partir de 1 g de propóleo molido, se realizaron las diluciones correspondientes, utilizando los solventes de extracción etanol y agua en las proporciones que indica la Tabla 1, (Fig. 4. a y b). Las extracciones se realizaron conforme a las condiciones establecidas en el DBB, empleando el lavador ultrasónico con una potencia ultrasónica 400w, potencia calefactora 180w y frecuencia de 40 kHz para favorecer la eficiencia del proceso (Fig. 4.c).

Luego, mediante un proceso de filtrado, se eliminan las impurezas presentes en la muestra, tales como ceras, restos de madera y partículas de tierra (Fig. 4. d). Una vez filtradas las disoluciones del producto natural, y siguiendo los parámetros del DBB, las muestras fueron concentradas en un evaporador rotatorio con el objetivo de obtener los extractos experimentales (EEP) (Fig. 4.e). Finalmente, los EEP se almacenaron en ausencia de luz hasta su posterior utilización en los posteriores ensayos experimentales (Fig. 5).

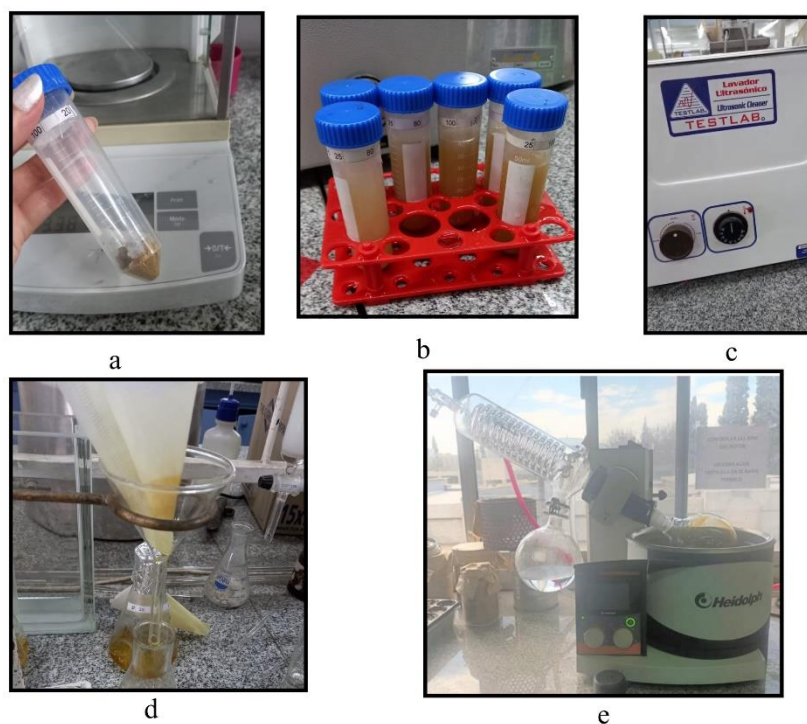


Fig. 4. Pasos para la obtención del extracto optimizado de propóleo.

a: Propóleo molido, b: diluciones etanol/agua, c: ultrasonido, d: filtración, e: evaporador rotatorio.



Fig. 5. Extractos experimentales de propóleos

3.2 Compuestos fenólicos

3.2.1 Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales

El contenido de compuestos fenólicos totales (CFT) de las muestras de propóleo se determinó mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, de acuerdo a lo descrito por Gómez *et al.* (2021), con algunas modificaciones. El CFT se consideró como la variable respuesta del estudio, utilizada para evaluar la eficiencia del proceso de extracción bajo las diferentes condiciones experimentales. Para realizar la curva de calibración se utilizó como estándar ácido gálico (AG) en concentraciones de 0, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250 ppm. Los EEP se utilizaron a una concentración de 1 mg/mL con metanol (MeOH). La reacción se llevó a cabo a pH básico (pH= 10) con una solución de carbonato de sodio. Pasados 30 minutos se mide el valor de absorbancia a 765 nm, en un lector de microplacas Thermo Scientific Multiskan FC. Los resultados se presentan como la media $\pm$ desviación estándar, DE ($n = 3$), expresados en mg de equivalentes de AG (mg EAG)/ gramo de EEP. Las mediciones se realizan por triplicado.

3.3 Análisis de datos

Los datos experimentales obtenidos en los ensayos de extracción asistida por ultrasonido fueron analizados mediante Metodología de Superficie de Respuesta (RSM, Response Surface Methodology) con el objetivo de evaluar el efecto de las variables y sus interacciones en el rendimiento de compuestos fenólicos, expresado como mg de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto experimental de propóleo (mg EAG/ g EEP).

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software Minitab® (Minitab LLC, State College, PA, USA). Se desarrollaron modelos de regresión independientes para las muestras provenientes de Ullum y Bauchaceta, dos zonas productivas ubicadas en la provincia de San Juan, Argentina.

Las variables independientes consideradas en el estudio fueron: temperatura de extracción (°C), concentración de etanol (%), tiempo de sonicación (min). La adecuación de los modelos se evaluó mediante análisis de la varianza ANOVA considerando los valores del estadístico F (Test de Fisher) y los valores p asociados para determinar la significancia estadística de los términos del modelo. Asimismo, el desempeño del modelo se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R^2), R^2 ajustado, R^2 predicho y el error estándar de la regresión (S).

3.4. Actividad antibacteriana

Para la evaluación del efecto antibacteriano, se utilizaron cepas representativas de bacterias Gram (+). Entre ellas se incluyeron microorganismos de referencia certificados, ATCC: American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD, EE.UU.: *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (*Sa* o *Sams* ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (*Sa* o *Samr* ATCC 43300) y aislados clínicos provenientes del Hospital Dr. Marcial Quiroga: *Staphylococcus aureus* ((*Sa*-MQ1) y *Staphylococcus aureus* ((*Sa*-MQ2). Además, se utilizó la cepa Gram (-) tipificada de *Escherichia coli* ATCC 25922. Las cepas bacterianas fueron conservadas en medio Mueller-Hinton (Britania-Código B0216906) en 30% de glicerol (v/v) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las bacterias fueron activadas en el medio de cultivo mencionado durante 24 horas a $37 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.1. Ensayo antibacteriano: determinación de la CIM

La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de los EEP se determinó mediante el método de microdilución en caldo, siguiendo las recomendaciones establecidas por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, 2013). El ensayo se realizó en microplacas de 96 pocillos (Fig. 6). Se prepararon soluciones madre de los EEP en DMSO (no excedió el 1 %), para obtener la serie de diluciones a ensayar. Las concentraciones evaluadas fueron de 62,5 a 500 $\mu\text{g/mL}$ y como control positivo en el ensayo se incluyó el agente antimicrobiano imipenem® NORTHIA. Las bacterias se mantuvieron en Müeller-Hinton por 24 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ y las suspensiones celulares se ajustaron a la escala de Mac Farland 0,5 (5×10^8 UFC/mL) y

posteriormente fueron diluidas en agua destilada estéril a una concentración final de 5×10^5 UFC/mL. Las microplacas se incubaron por 24 h a 37 °C. La CIM se definió como la menor concentración de EEP que inhibió 100 % el desarrollo luego del tiempo de incubación a una lectura a 620 nm, en lector de microplaca Thermo FC (Thermo Scientific, Waltham, MA, EEP. UU) (Fig 7).

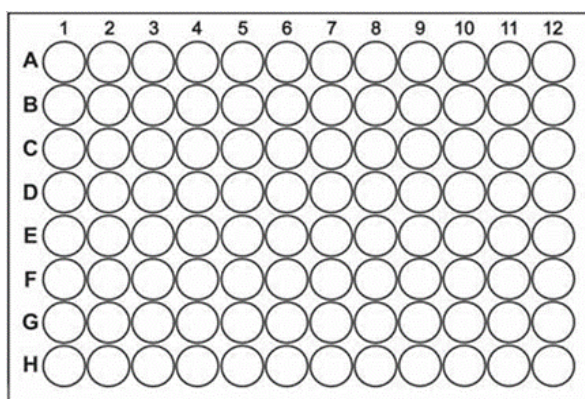


Fig. 6. Modelo de microplaca de 96 pocillos.



Fig. 7. Lector de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, Waltham, MA, EEP. UU)

3.5. Actividad antifúngica

Para el estudio de la actividad antifúngica, se emplearon las siguientes cepas de levaduras: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* C-131 y *Candida tropicalis* MQ1, aislados clínicos provenientes del Laboratorio de Microbiología del Hospital Marcial Quiroga, San Juan. Las cepas fueron conservadas en medio Caldo Sabouraud Glucosado (Britania-Código B0217806) en 30% de glicerol (v/v) a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las levaduras fueron activadas en el medio mencionado durante 24 horas a $29 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.5.1. Ensayo antifúngico: determinación de la CIM

Las actividades fungistáticas de los EEP se evaluaron mediante el método de microdilución en caldo (CLSI, 2002). El ensayo se llevó a cabo en microplacas con 96 pocillos. Los diferentes EEP se diluyeron en DMSO (no excedió el 1%) hasta obtener las concentraciones a ensayar. Los EEP diluidos se agregaron al medio, en un rango de concentraciones de 62,5 a 500 µg/mL. En este caso como control positivo fue incluido el agente antifúngico ketoconazol (Janssen Pharmaceutica). Las suspensiones celulares se ajustaron en agua destilada estéril a una concentración final de 5×10^4 cél/mL, cuantificadas mediante cámara de Neubauer.

Las placas fueron incubadas por 24 h a 30 °C. Para determinar la actividad antifúngica, las placas fueron leídas a 405 nm en el lector de microplacas antes descrito (Fig. 7). A partir de las lecturas obtenidas se determinó la CIM (µg/mL), definida como la menor concentración del EEP capaz de inhibir completamente el crecimiento microbiano, luego del período de incubación.

El porcentaje de inhibición fue calculado como sigue:

$$CIM = 100 - \frac{((DO_{EOP24h} - DO_{BcoEOP\ 0h}) * 100)}{(Do\ control\ (+))\ microorg}$$

Siendo DO: densidad óptica

3.6. Determinación de la Concentración Bactericida Mínima y Concentración Fungicida Mínima

Para la determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM, µg/mL) y la Concentración Fungicida Mínima (CFM, µg/mL), se tomaron alícuotas de 5 µL de los pocillos donde no hubo crecimiento, es decir, en aquellas donde se obtuvo la CIM y se sembró en una nueva microplaca que contenía el medio de cultivo correspondiente. Estas placas se incubaron nuevamente bajo las condiciones óptimas para cada microorganismo, y se registró el valor de CBM y CFM, respectivamente en forma visual. La CBM y CFM se definieron como las menores concentraciones del EEP que produjo una inhibición total (muerte) del crecimiento microbiano, después del tiempo de incubación.

3.7 Efecto combinatorio de los EEP con drogas comerciales: Diseño de Tablero de Ajedrez

Se utilizó el diseño de “Tablero de Ajedrez” para evaluar el efecto combinatorio entre los EEP con las drogas comerciales (DC): imipenem y ketoconazol, de acuerdo a lo descrito por Nikolić., *et al.* (2017) y Lima *et al.*, (2022).

Para realizar el diseño se usó microplacas de 96 pocillos, donde la droga comercial se distribuyó en concentraciones crecientes a lo largo de las filas, mientras que los extractos experimentales de propóleo se distribuyeron a lo largo de las columnas. Cada pocillo de la placa contiene una mezcla distinta de ambos. Esto permitió observar el efecto de múltiples dosis combinadas de forma simultánea. Tras la incubación con el microorganismo, se identificó la Concentración Mínima Inhibitoria en cada combinación, es decir, la dosis más baja que logra frenar el crecimiento bacteriano o fúngico.

A continuación, se presenta el diagrama de la microplaca para la determinación del efecto combinatorio (Fig. 8).

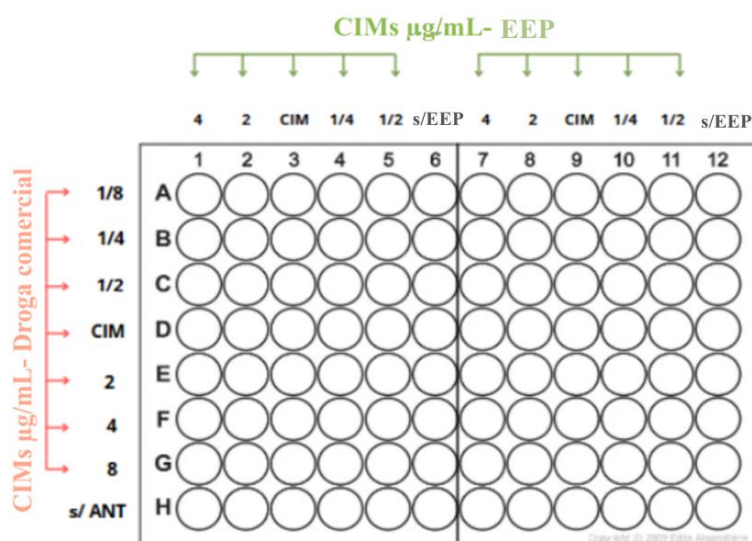


Fig 8. Diagrama de la microplaca para el diseño “Tablero de Ajedrez”

3.7.1. Cálculo de la Concentración Inhibitoria Fraccionaria y el Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional

La Concentración Inhibitoria Fraccionaria (CIF) y el Índice de Concentración Inhibitoria fraccional (ICIF) fueron calculados mediante las siguientes ecuaciones:

$$\text{CIF}_{\text{EEP}} = \text{CIM}_{\text{EEP}} \text{ combinado} / \text{CIM}_{\text{EEP}} \text{ solo (Eq. 1)}$$

$$\text{CIF}_{\text{DC}} = \text{CIM}_{\text{DC}} \text{ combinado} / \text{CIM}_{\text{DC}} \text{ solo (Eq. 2)}$$

$$\text{ICIF} = \text{CIF}_{\text{EEP}} + \text{CIF}_{\text{DC}} \text{ (Eq. 3)}$$

Los resultados se interpretaron de la siguiente manera: efecto sinérgico ($\text{ICIF} \leq 0,5$), efecto aditivo ($0,5 < \text{ICIF} < 2$), sin interacción o indiferencia ($2 \leq \text{ICIF} \leq 4$) y efecto antagónico ($\text{ICIF} > 4$) descrito por Nikolić *et al.*, (2017).

3.7.2. Índice de Reducción de Dosis

El Índice de Reducción de Dosis (IRD) se utilizó como medida para evaluar la reducción de la dosis de cada DC (imipenem y/o ketoconazol) en comparación con su administración individual. Un alto valor de $\text{IRD} > 1$ indicó una mayor reducción de la dosis necesaria para alcanzar un efecto determinado (Chou, 2006; Chou, 2010). El cálculo del IRD para cada DC se realizó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{IRD} = \text{CIM}_{\text{DC}} / \text{CIM}_{\text{DC con EEP}} \text{ (Eq. 4)}$$

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Optimización de la extracción de compuestos fenólicos mediante DBB.

El DBB otorgó un total de 13 puntos experimentales, en los cuales varían las diferentes condiciones de temperatura, relación EtOH:H₂O y tiempo de sonicado. El número total de corridas fue de 39, ya que cada ensayo se realizó por triplicado. Es decir, las corridas 1, 14 y 27 corresponden a la misma condición experimental, lo que implica que cada punto del diseño fue ejecutado por triplicado para asegurar la consistencia de los resultados. A continuación, se presentan las condiciones de las 13 ternas obtenidas del DBB (Tabla 2).

Tabla 2. Variables independientes con las condiciones optimizadas

Ternas	Temperatura (°C)	Relación EtOH-H ₂ O	Tiempo de sonicado (min)
(1, 14, 27)	25	80	20
(2, 15, 28)	50	80	20
(3, 16, 29)	25	100	20
(4, 17, 30)	50	100	20
(5, 18, 31)	25	90	10
(6, 19, 32)	50	90	10
(7, 20, 33)	25	90	30
(8, 21, 34)	50	90	30
(9, 22, 35)	37,5	80	10
(10, 23, 36)	37,5	100	10
(11, 24, 37)	37,5	80	30
(12, 25, 38)	37,5	100	30
(13, 26, 39)	37,5	90	20

La aplicación de este diseño estadístico permitió en este trabajo de tesis, identificar de manera eficiente las combinaciones de las variables estudiadas, evitando la necesidad de evaluar experimentalmente cada factor de forma aislada. Este enfoque facilitó la exploración simultánea de los efectos individuales y de interacción entre las variables, optimizando el proceso con un número reducido de ensayos. En concordancia con estos resultados investigaciones recientes, autores como Golmahi *et al.*, (2021) y Pereira *et al.*, (2025), coinciden en señalar que el diseño Box-Behnken resulta un modelo estadístico eficaz para optimizar el rendimiento de extracciones de compuestos bioactivos en muestras de propóleos.

4.2 Determinación de compuestos fenólicos totales

De acuerdo con lo descrito en la sección de materiales y métodos, se midió el CFT en los extractos de propóleo obtenidos para cada punto experimental (Tabla 3).

Tabla 3. Contenido de fenoles totales de las muestras de propóleo evaluadas (mg EAG/g EEP). Los resultados se expresaron en media $\pm$ desviación estándar

Ternas de corridas	EEP Iglesia	EEP Ullum
(1, 14, 27)	381,075 $\pm$ 48,62	252,909 $\pm$ 24,11
(2, 15, 28)	381,150 $\pm$ 12,69	374,818 $\pm$ 17,61
(3, 16, 29)	461,000 $\pm$ 25,39	282,954 $\pm$ 0,64
(4, 17, 30)	538,272 $\pm$ 39,47	249,878 $\pm$ 16,97
(5, 18, 31)	404,181 $\pm$ 28,60	362,977 $\pm$ 19,31
(6, 19, 32)	491,454 $\pm$ 48,79	305,204 $\pm$ 28,18
(7, 20, 33)	610,969 $\pm$ 19,28	239,606 $\pm$ 21,45
(8, 21, 34)	420,378 $\pm$ 3,08	365,560 $\pm$ 13,6
(9, 22, 35)	290,606 $\pm$ 24,88	358,180 $\pm$ 23,27
(10, 23, 36)	489,909 $\pm$ 14,14	366,757 $\pm$ 58,46
(11, 24, 37)	533,848 $\pm$ 15,07	368,409 $\pm$ 25,91
(12, 25, 38)	370,742 $\pm$ 1,73	291,950 $\pm$ 23,27
(13, 26, 39)	541,257 $\pm$ 39,07	389,150 $\pm$ 8,07

Los EEP de Iglesia (Bauchaceta), presentan un rango de CFT entre 290 – 610 mg EAG/g EEP, siendo la terna de tratamientos (7, 20, 33) (condiciones experimentales: 25 °C, 90 % extracción con EtOH y 30 min de sonicado) la que mostró mayor extracción de fenoles ($610,969 \pm 19,28$ mg EAG/g EEP).

Para las muestras obtenidas del departamento Ullum, la terna de los tratamientos (13, 26, 39) (condiciones experimentales: 37 °C, 90 % extracción con EtOH y 20 min de sonicado), mostró el mayor contenido de fenólicos $389,15 \pm 8,07$ mg EAG/g EEP.

De acuerdo con lo informado por Osés *et al.*, (2020), el CFT en propóleos de distintos orígenes geográficos, procesados mediante técnicas de maceración con agitación oscila entre 150 y 300 mg EAG/g de extracto. Por otro lado, Özkök., *et al.* (2021) reportaron valores de concentraciones entre 34,53 y 259,4 mg EAG/g utilizando también técnicas de maceración con agitación. Teniendo en cuenta la norma IRAM 15935_2 (2008) que determinan los requisitos para el análisis de calidad de los extractos de propóleos del noroeste de Argentina; el contenido de compuestos fenólicos totales expresados como ácido gálico debe ser como mínimo 0,25g/100g de extracto. Por lo tanto, los valores obtenidos de CFT de los EEP de ambos departamentos (250 mg EAG/g EEP = 25g EAG/100g EEP) indicarían que las condiciones experimentales aplicadas favorecen la obtención de extractos de propóleos de calidad.

Las diferencias en el contenido de CFT de los EEP de los departamentos de Iglesia y Ullum puede deberse a que presentan diferencias geográficas y climáticas, por consiguiente, están asociadas a diferente flora. Las muestras colectadas en Bauchaceta (Iglesia) están asociadas prácticamente a *Jarilla nítida* Cav (conocida como jarilla o jarilla crespá) cuyos compuestos fenólicos han sido descritos por Agüero *et al.*, 2011; Agüero *et al* 2014), mientras que los propóleos colectados en Ullum poseen un origen polifloral y menos estudiado, aunque, ambas zonas comparten vegetación del género *Larrea*. Estas diferencias, se podrían ver reflejadas en sus perfiles químicos, mediante técnicas de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas (HPLC/EM) que detalle los principales compuestos.

4.2.1 Superficies de respuesta y análisis estadístico

Se generaron gráficas tridimensionales de superficie de respuesta con el objetivo de visualizar la influencia combinada de los parámetros de extracción sobre el rendimiento de los

compuestos fenólicos. En estas representaciones, dos variables independientes fueron variando simultáneamente mientras que la tercera se mantuvo constante en el valor encontrado como óptimo.

Las superficies obtenidas muestran la interacción entre temperatura, concentración de etanol y tiempo de sonicación, permitiendo evaluar su efecto conjunto sobre la eficiencia de extracción de compuestos fenólicos.

A continuación, se presentan las SR de los resultados que representan la relación entre las variables independientes y la variable respuesta (CFT), ajustados a un mismo modelo factorial lineal, para los EEP de los departamentos Iglesia y Ullum, y además, se presentan los resultados de análisis de los modelo de ANOVA.

4.2.1.1 Análisis de datos de los EEP de Iglesia, Bauchaceta

En el gráfico 1 se presenta la SR para el CFT del EEP de Iglesia, (Bauchaceta); en función de la temperatura y el tiempo de extracción, a una concentración fija de etanol de 91%. El gráfico 2 muestra la SR para el CFT del EEP de Iglesia, Bauchaceta; en función del tiempo de sonificado y la concentración de etanol., manteniendo constante la temperatura (50 °C). En el gráfico 3 se observa la SR para el CFT del EEP de Iglesia, Bauchaceta en función de la temperatura y la concentración de etanol, a un tiempo constante de 17,47 min.

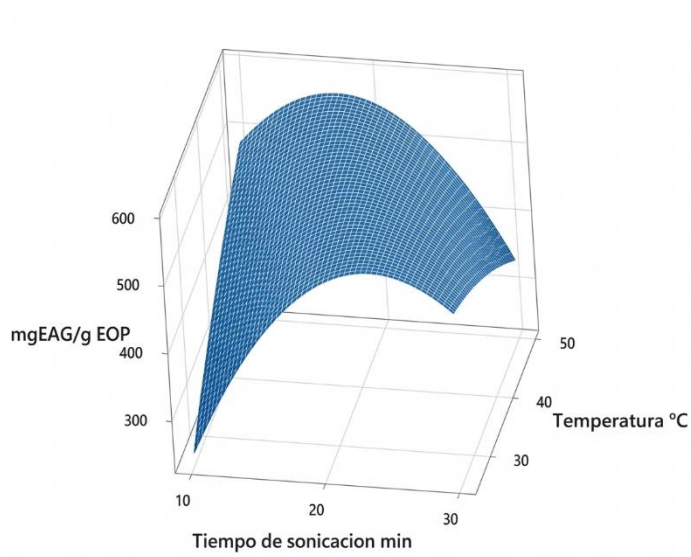


Gráfico 1. Superficie de respuesta para el CFT para el EEP de Iglesia, Bauchaceta; en función de la temperatura y el tiempo de extracción, a una concentración fija de etanol a 91%.

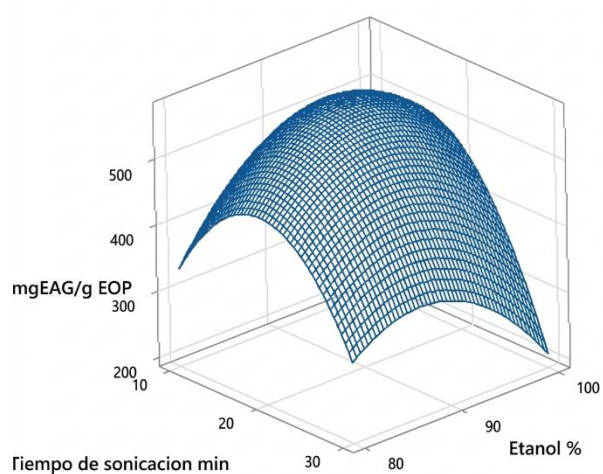


Gráfico 2: Superficie de respuesta para el CFT para el EEP de Iglesia, Bauchaceta; en función del tiempo y la concentración de etanol; a una T° constante de 50 °C.

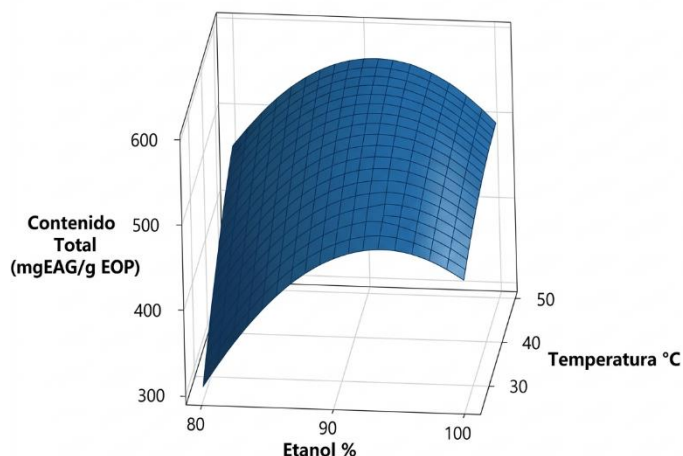


Gráfico 3. Superficie de respuesta para el CFT para el EEP de Iglesia, Bauchaceta; en función de la T° y la concentración de etanol; a una tiempo constante de 17,47 min.

El análisis de los datos en el Minitab determinó que las condiciones óptimas para la extracción de compuestos fenólicos en los EEP de Bauchaceta (Iglesia), corresponden a 50 °C, 17,47 minutos de sonicación y 91 % de etanol, con un valor de $R^2 = 0,6725$. La variable tiempo de sonicación resultó el factor más influyente desde el punto de vista fisicoquímico, en coincidencia con lo informado por Yusof *et al.*, (2020). Cabe aclarar, que el coeficiente de determinación ($R^2 = 67,25\%$), indicó que los datos del CFT no se ajustaron al modelo factorial elegido ($p = 0,467$), limitando la capacidad explicativa.

Asimismo, como fue reportado por Oroian *et al.*, (2020) se muestra una tendencia similar; donde la T° alcanza un valor moderado (35 - 65 °C). Los autores atribuyen este comportamiento a la elevada solubilidad natural de los polifenoles del propóleo en etanol, lo que sugiere que, dado que el solvente es altamente efectivo por sí mismo, un aumento de temperatura contribuye moderadamente a la extracción.

4.2.1.2. Análisis de datos de los EEP de Ullum

En los siguientes gráficos se presentan las SR para el CFT del EEP de Ullum, en función de la temperatura y concentración de etanol a un el tiempo de extracción fijo= 21,51 min (Gráfico 4), en función del tiempo de sonicado y la concentración de etanol con temperatura

fija de 39,65 °C (Gráfico 5) y en función del tiempo de sonication y la temperatura con un valor fijo de 88,28 % de la concentración de etanol (Gráfico 6).

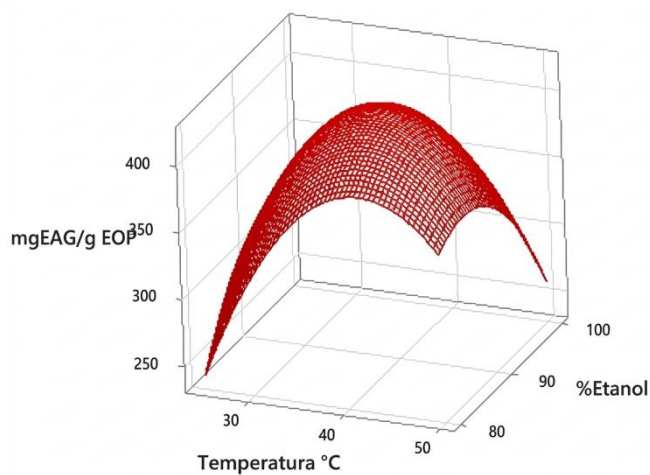


Gráfico 4. Superficie de respuesta para el CFT para el EEP de Ullum en función de la temperatura y la concentración de etanol con tiempo de sonication fijo 21,51 min

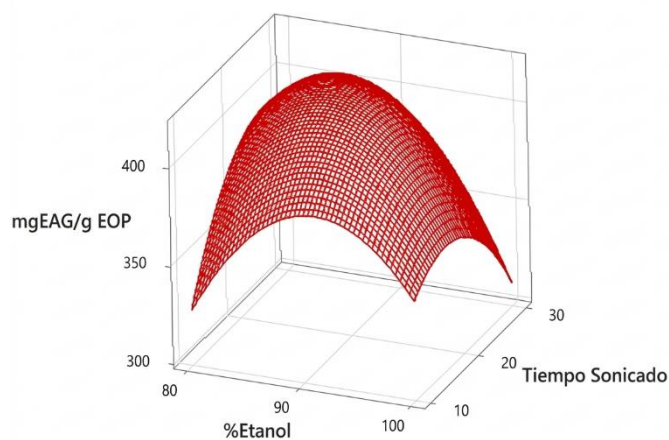


Gráfico 5. Superficie de respuesta para el CFT para el EEP de Ullum en función del tiempo de sonication y la concentración de etanol con temperatura fija de 39,64°C

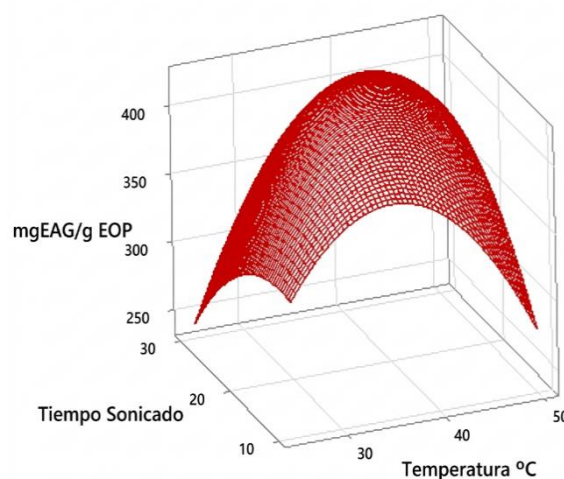


Gráfico 6. Superficie de respuesta para el CFT para el EEP de Ullum en función del tiempo de sonicado y la temperatura con un valor fijo de 88,28 % de la concentración de etanol

Con respecto a los EEP de Ullum, los resultados indicaron que para obtener la mayor cantidad de compuestos fenólicos se necesitan las siguientes condiciones: tiempo de sonicado de 21 minutos, concentración de alcohol 88,98 % y temperatura 39,65 °C.

A diferencia de lo analizado para las muestras de Iglesia, el contenido de compuestos fenólicos de los EEP de Ullum, tuvieron un ajuste estadísticamente significativo ($p = 0,005$) al modelo cuadrático, lo que demuestra que, dentro del rango experimental evaluado, las variables independientes explican de manera significativa la variabilidad observada en el contenido fenólico total (CFT). El coeficiente de determinación fue elevado ($R^2 = 99,21 \%$), indicando que el modelo explicó más del 99 % de la variabilidad total. Asimismo, el R^2 ajustado (96,86 %) confirmó la robustez del modelo y su adecuada capacidad explicativa, evidenciando que los términos incluidos contribuyen significativamente al ajuste.

Los EEP provenientes de Ullum asociados botánicamente a diferentes especies vegetales, mostraron una significancia del modelo global e interacciones comportándose como un sistema altamente sensible a las condiciones operativas, con una región óptima claramente definida y una elevada capacidad predictiva. Esto sugiere que la liberación de compuestos fenólicos en esta matriz está fuertemente gobernada por fenómenos combinados de cavitación ultrasónica, polaridad del solvente, entre otros.

En contraste, si bien el modelo ajustado para Bauchaceta no resultó estadísticamente significativo y presentó alta dispersión experimental, todos los tratamientos evaluados mostraron concentraciones elevadas de compuestos fenólicos (> 250 mg EAG/g EEP), lo que demuestra que las condiciones aplicadas fueron efectivas para la extracción.

4.3 Actividad biológica del propóleo

Para dar respuesta al objetivo 3, se realizaron ensayos de microdilución en caldo con el fin de determinar la actividad antimicrobiana de los EEP. Las Tablas 4 y 5 muestran los resultados de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) que inhiben el desarrollo de los microorganismos (bacterias y hongos levaduriformes) evaluados de las muestras de propóleo de Iglesia (Bauchaceta), mientras que las Tablas 6 y 7 resumen los resultados correspondientes a las muestras del departamento de Ullum, indicando en cada tratamiento sus respectivas CIMs y CBM/CFM.

En las tablas 4 y 6, se observa la **actividad antibacteriana** de los distintos tratamientos de EEP evaluados de ambos departamentos, frente a cepas tipificadas y de aislados clínicos Gram (+). Los EEP no fueron activos frente a la cepa tipificada Gram (-) *Escherichia coli* ATCC 25922, (CIM >1000 $\mu\text{g/mL}$), teniendo en cuenta lo informado por Tamokou *et al.* (2017), quienes referenciaron que los extractos provenientes de especies vegetales son considerados **activos** cuando presentan valores de CIM < 100 $\mu\text{g/mL}$ y para valores: $100 \leq \text{CIM} \leq 512$ $\mu\text{g/mL}$, los extractos resultan **significativamente activos**.

Para la **actividad antifúngica** (Tablas 5 y 7), los EEP fueron evaluados frente a distintos aislados clínicos de especies de: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* C131 y *C. tropicalis* MQ1.

4.3.1 Actividad antimicrobiana de propóleos de Iglesia, Bauchaceta.

4.3.1.1 Actividad antibacteriana.

La actividad antibacteriana de los diferentes EEP de Bauchaceta, mostraron valores de CIMs entre 31,5 a 125 $\mu\text{g/mL}$, mientras que los valores de CBM obtenidos fueron en un rango de 31,5 a 500 $\mu\text{g/mL}$, frente a las bacterias Gram (+) evaluadas (Tabla 4).

Tabla 4. Actividad antimicrobiana de los EEP de Iglesia, Bauchaceta, frente a cepas tipificadas y aislados clínicos de bacterias. Los valores se expresan en µg/mL.

Bacterias	<i>S. aureus</i> sensible a metecilina		<i>S. aureus</i> resistente a metecilina		<i>S. aureus</i> resistente a metecilina MQ1		<i>S. aureus</i> resistente a metecilina MQ2	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
Terna de tratamientos								
(1, 14, 27) 25 °C 80 % 20 min	62,50	500	125	125	62,50	500	31,25	>500
(2, 15, 28) 50 °C 80% 20 min	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	31,25	>500
(3, 16, 29) 25 °C 100% 20 min	31,25	31,25	62,50	62,50	62,50	>500	125	>500
(4, 17, 30) 50 °C 100% 20 min	62,50	62,50	31,25	31,25	62,50	62,50	31,25	125
(5, 18, 31) 25 °C 90 % 10 min	62,50	62,50	31,25	31,25	125	>500	62,50	>500
(6, 19, 32) 50 °C 90 % 10 min	62,50	62,50	62,50	62,50	62,50	62,50	62,50	>500
(7, 20, 33) 25 °C 90 % 30 min	31,25	62,50	31,25	62,50	31,25	31,25	31,25	>500

(8, 21, 34) 50 °C 90 % 30 min	62,50	250	31,25	62,50	62,50	>500	125	125
(9, 22, 35) 37,5 °C 80 % 10 min	125	125	31,25	125	62,50	62,50	125	500
(10, 23, 36) 37,5 °C 100% 10 min	31,25	31,25	31,25	31,25	62,50	62,50	31,25	31,25
(11, 24, 37) 37,5 °C 80 % 30min	125	125	125	>500	125	>500	125	>500
(12, 25, 38) 37,5 °C 100% 30 min	62,50	62,50	125	>500	125	>500	62,50	125
(13, 26, 39) 37,5 °C 90 % 20min	62,50	62,50	62,50	62,50	62,50	62,50	62,50	62,50
imipenem	0,250	0,250	1	1	2,5	2,5	0,250	0,250

Las cepas tipificadas *S. aureus* sensible a meticilina y *S. aureus* resistente a meticilina, mostraron una alta sensibilidad frente a las ternas de los tratamientos (2, 15, 28), (3, 16, 29) y (10, 23, 36) con valores de CIM= 31,25 µg/mL, y los tratamientos (4, 17, 30), (5, 18, 31) y (10, 23, 36) con los mismos valores, respectivamente.

Frente a aislados clínicos de *S. aureus* MQ1 y *S. aureus* MQ2, los tratamientos más efectivos fueron (2, 15, 28), (4, 17, 30), (7, 20, 33) y (10, 23, 36) con valores de CIMs de 31,25 - 62,50 µg/mL. La cepa *S. aureus* MQ2 mostró mayor resistencia para el resto de los tratamientos con valores de CBM entre 62,50 - 500 µg/mL.

Es importante resaltar el comportamiento de la terna (10, 23, 36), con condiciones experimentales de 37,5 °C, 100 % EtOH y 10 min de sonicado y la terna (13, 26, 39) cuyas condiciones experimentales fueron: 37,5 °C, 90 % EtOH y 20 min de sonicado, los cuales exhibieron una estabilidad única a lo largo del ensayo, manteniendo valores constantes de CIM y CBM de 31,5 y 62,50 µg/mL frente a las cuatro cepas evaluadas, independientemente de sus mecanismos de resistencia.

Cabe destacar que, en relación con la optimización, los tratamientos que presentaron mayor actividad antibacteriana no coincidieron con las condiciones determinadas como óptimas para maximizar el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT). En particular, la mayor actividad se observó en condiciones de 37,5 °C, 90–100 % de etanol y tiempos de sonicado entre 10 y 20 minutos. Este comportamiento podría explicarse porque la actividad antimicrobiana en muchas ocasiones no depende del contenido de compuestos fenólicos sino de las características químicas de los mismos (polaridad, relación estructura- actividad)(Alvarez *et al.*, (2020); Ispiryan *et al.*,2024).

Frente a la cepa Gram (-) *Escherichia coli* ATCC 25922 los tratamientos de EEP mostraron valores de CIM mayores a 500 µg/mL. Autores como Nazzaro *et al.* (2013) señalan que *E. coli*, por ser una bacteria Gram (-), posee una resistencia intrínseca superior frente a productos naturales. Esto se debe a su membrana externa rica en lipopolisacáridos hidrofílicos, la cual actúa como una barrera que impide la difusión de los compuestos hidrofóbicos presentes en los extractos.

De acuerdo con lo informado por Seidel *et al.* (2008), muestras de propóleos de diferentes lugares del mundo (norteamericanos, sudamericanos y europeos) exhibieron actividades antibacterianas con valores de CIM entre $125 \leq \text{CIM} \leq 500$ µg/mL para diferentes microorganismos, coincidiendo con algunos de los valores obtenidos en este estudio e incluso superando el efecto (CIMs= 31,25 µg/mL). De manera similar, los resultados se ajustan favorablemente a lo reportado por Al-Ani *et al.* (2018), quienes describen un espectro de actividad de los extractos de propóleo entre 40 y 1200µg/mL.

4.3.1.2 Actividad antifúngica.

La actividad antifúngica frente a levaduras del género *Candida* se realizó bajo los protocolos de la CLSI, (2002). El efecto antifúngico, frente a los hongos levaduriformes del género *Candida*, mostraron valores de CIMs en un rango de 62,50-500 µg/mL (Tabla 5) para las muestras de propóleos de Bauchaceta.

Tabla 5. Actividad antimicrobiana de las muestras EEP de Iglesia, Bauchaceta, frente a cepas tipificadas y aislados clínicos de levaduras. Los valores se expresan en µg/mL.

Levaduras	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida Parapsilosis</i>		<i>Candida glabrata</i>		<i>Candida tropilacalis</i> C 131		<i>Candida tropilacalis</i> MQ1	
Terna de tratamientos.	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
(1, 14, 27) 25 °C 80 % 20 min	62,50	125	125	125	125	250	62,50	62,50	125	>500
(2, 15, 28) 50 °C 80% 20 min	62,50	62,50	250	250	250	250	62,5	62. 5	>500	----
(3, 16, 29) 25 °C 100% 20 min	62,50	250	125	500	250	250	62,50	62,50	250	>500
(4, 17, 30) 50 °C 100% 20 min	62,50	125	125	500	125	250	62,50	125	250	250
(5, 18, 31) 25 °C 90 % 10 min	62,50	62,50	125	125	125	500	62,50	62,50	250	500
(6, 19, 32) 50 °C 90 % 10 min	62,5	62,5	125	125	125	250	62,50	62,50	250	500
(7, 20, 33) 25 °C 90 % 30 min	62,50	62,50	>500	-----	250	250	>500	----	>500	----

(8, 21, 34) 50 °C 90 % 30 min	62,50	62,50	125	125	62,50	500	62,50	62,50	125	500
(9, 22, 35) 37,5 °C 80 % 10 min	62,50	62,50	>500	-----	62,50	250	>500	----	500	>500
(10, 23, 36) 37,5 °C 100% 10 min	125	125	125	125	125	250	62,50	62,50	125	500
(11, 24, 37) 37,5 °C 80 % 30min	125	125	125	250	62,50	500	62 .5	62 .5	125	500
(12, 25, 38) 37,5 °C 100% 30 min	62. 5	62. 5	250	250	125	500	62,50	62,50	125	250
(13, 26, 39) 37,5 °C 90 % 20min	125	500	>500	-----	250	250	>500	----	>500	----
Ketoconazol	0,625	1,25	0,156	0,156	2,5	>2,5	0,31	0,625	0,625	0,625

Frente a *Candida albicans*, los tratamientos mostraron una alta efectividad logrando inhibir su crecimiento a 62,50 µg/mL, exhibiendo además un comportamiento predominantemente fungicida (CIM = CFM) a excepción del tratamiento (13, 26, 39). Herrera *et al.* (2010) informaron valores de CIMs con un rango que osciló entre 197 a 441 µg/mL de propóleos frente a *Candida albicans*. Lo que permite inferir que el comportamiento del propóleo del presente trabajo fue más efectivo/antifúngico a menor concentración.

Teniendo en cuenta que el propóleo de Bauchaceta (Iglesia) está asociado botánicamente a *Larrea nítida* a diferencia de la muestra de Ullum, los compuestos fenólicos bioactivos frente a este microorganismo, previamente reportados (Agüero *et al.*, 2014) están presentes en esta especie.

Por otro lado, para especies de *Candida no-albicans* se obtuvo un patrón similar frente a la cepa de *C. tropicalis* C131, donde diversos tratamientos mostraron una CIM = 62,50 µg/mL, para la mayoría de los tratamientos a excepción del (7, 20, 33) y (13, 26, 39). Mientras que las especies como *C. parapsilosis* y *C. glabrata* mostraron una resistencia intermedia, con valores de CIM=125 µg/mL y CFM $\geq$ 125 µg/mL. La cepa *C. tropicalis* MQ1, fue la más resistente a los EEP con valores de CIM >125 µg/mL).

4.3.2 Actividad antimicrobiana de propóleos de Ullum

4.3.2.1 Actividad antibacteriana.

Los valores obtenidos de CIMs y CBM para la actividad antibacteriana de los EEP del departamento Ullum, se ubicaron en un rango de 62,50 a 500 µg/mL, siendo las concentraciones más bajas indicativas de una mayor actividad antibacteriana (Tabla 6).

Los resultados mostraron que frente a la cepa resistente de *S. aureus*, las ternas (3, 16, 29), (7, 20, 33) y (9, 22, 35) mantuvieron esta eficacia 62,50 µg/mL, destacándose además por su actividad bactericida (CBM = 62,50 µg/mL). Esto indica que, a la mínima dosis probada, estos extractos ya son capaces de eliminar al patógeno resistente. Mientras que para la cepa sensible de *S. aureus* tratamientos como (2, 15, 28) y (7, 20, 33) mantuvieron esta eficacia= 62,50 µg/mL.

Para los aislados clínicos MQ2 los tratamientos que mantuvieron esta eficacia CIM: 62,50 µg/mL y CBM: 62,50 µg/mL fueron las ternas (2, 15, 28), (3, 16, 29), (7, 20, 33), (12, 25, 38) y (13, 26, 39), mientras que para MQ1 solo el tratamiento correspondiente a la terna (7, 20, 33). Es importante resaltar el comportamiento de los tratamientos dentro de la terna **(7, 20, 33)**, con condiciones experimentales de 25 °C, 90% EtOH y 30 min de sonicado, lo que exhibió una estabilidad única a lo largo del ensayo, manteniendo valores constantes de CIM y CBM de 62,50 µg/mL frente a las cuatro cepas evaluadas, independientemente de sus mecanismos de resistencia. Con respecto a la optimización, las condiciones experimentales de los tratamientos más activos antibacterianos indicarían que las extracciones resultan activas bajo las condiciones: 25 °C, 90% EtOH y 30 min de sonicado. Sin embargo, no coinciden con las condiciones óptimas obtenidas para la mayor concentración de fenoles totales. Al igual que en

las muestras de Bauchaceta, esto sugiere que la eficacia biológica no depende exclusivamente de la cantidad de compuestos fenólicos, sino de su perfil químico, así también, combinaciones de compuestos y de la presencia de moléculas específicas con mayor bioactividad (Ispiryan *et al.* (2024; Álvarez *et al.*, 2020).

Tabla 6. Actividad antimicrobiana de las muestras EEP de muestras propóleos de Ullum frente a cepas tipificadas y aislados clínicos de bacterias. Los valores se expresan en µg/mL.

Bacterias	<i>S. aureus</i> methicillin- sensitive		<i>S. aureus</i> methicillin- resistente		<i>S. aureus</i> methicillin- resistente. MQ1		<i>S. aureus</i> methicillin- sensitive MQ2	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
(1, 14, 27) 25 °C 80 % 20 min	125	500	250	500	125	250	62,50	500
(2, 15, 28) 50 °C 80% 20 min	62,50	62,50	125	125	62,50	125	62,50	62,50
(3, 16, 29) 25 °C 100% 20 min	62,50	125	62,50	62,50	125	125	62,50	62,50
(4, 17, 30) 50 °C 100% 20 min	250	250	250	>500	250	250	250	>500
(5, 18, 31) 25 °C 90 % 10 min	125	500	500	>500	62,50	125	125	>500

(6, 19, 32) 50 °C 90 % 10 min	62,50	125	62,50	125	62,50	125	62,50	>500
(7, 20, 33) 25 °C 90 % 30 min	62,50	62,50	62,50	62,50	62,50	62,50	62,50	62,50
(8, 21, 34) 50 °C 90 % 30 min	62,50	125	62,50	125	62,50	125	62,50	500
(9, 22, 35) 37,5 °C 80 % 10 min	62,50	250	62,50	62,50	250	250	62,50	500
(10, 23, 36) 37,5 °C 100% 10 min	125	250	62,50	125	125	>500	125	>500
(11, 24, 37) 37,5 °C 80 % 30min	250	250	125	500	62,50	125	250	250
(12, 25, 38) 37,5 °C 100% 30 min	125	>500	250	500	125	250	62,50	62,50
(13, 26, 39) 37,5 °C 90 % 20min	>500	—	62,50	250	62,50	125	62,50	62,50
Imipenem	0,250	0,250	1	1	2.5	2.5	0,250	0,250

4.3.2.2 Actividad antifúngica

La actividad antifúngica de los EEP de Ullum frente a levaduras del género *Candida* se realizó bajo los protocolos de la CLSI 2002, como se describió en materiales y métodos. Los valores de CIM obtenidos oscilaron entre 50-400 µg/mL como indica la Tabla 7.

Tabla 7. Actividad antimicrobiana de las muestras EEP de muestras propóleos de Ullum frente a cepas tipificadas y aislados clínicos de levaduras. Referencias: Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), Concentración Fungicida Mínima (CFM). Los valores se expresan en µg/mL

Levaduras	<i>Candida albicans</i>		<i>Candida parapsilosis</i>		<i>Candida glabrata</i>		<i>Candida tropilacalis</i> C 131		<i>Candida tropilacalis</i> MQ1	
Terna de tratamientos.	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
(1, 14, 27) 25 °C 80 % 20 min	>400	—	200	400	50	100	100	100	100	100
(2, 15, 28) 50 °C 80% 20 min	300	400	100	500	50	50	100	100	100	100
(3, 16, 29) 25 °C 100% 20 min	>400	—	100	400	50	100	100	100	400	400
(4, 17, 30) 50 °C 100% 20 min	>400	—	>400	-	50	50	100	200	>400	-
(5, 18, 31) 25 °C 90 % 10 min	>400	—	>400	-	50	100	100	200	>400	-
(6, 19, 32)	>400	—	400	>400	200	>400	100	100	400	>400

50 °C 90 % 10 min										
(7, 20, 33) 25 °C 90 % 30 min	>400	—	100	400	50	50	>400	-	>400	-
(8, 21, 34) 50 °C 90 % 30 min	>400	—	200	400	100	200	100	300	50	200
(9, 22, 35) 37,5 °C 80 % 10 min	>400	—	100	>400	50	50	100	100	>400	-
(10, 23, 36) 37,5 °C 100% 10 min	>400	—	100	>400	50	50	100	100	400	400
(11, 24, 37) 37,5 °C 80 % 30min	>400	—	100	400	50	100	100	100	>400	-
(12, 25, 38) 37,5 °C 100% 30 min	>400	—	>400	-	50	100	100	200	>400	-
(13, 26, 39) 37,5 °C 90 % 20min	>400	—	>400	-	100	200	100	100	>400	-
Ketoconazol	0,625	1,25	0,156	0,156	2,5	>2,5	0,31	0,625	0,625	0,625

El resultado más destacable para los EEP de este departamento fue la potente actividad frente a *Candida glabrata*, para los tratamientos (2, 15, 28), (4, 17, 30), (7, 20, 33), (9, 22, 35) y (10, 23, 36) con valores de CIM= 50 µg/mL, mientras que el resto de los extractos fueron

efectivos a 100 µg/mL. Asimismo, la cepa *C. tropicalis* C131 mostró una sensibilidad homogénea, siendo inhibida por la mayoría de los tratamientos a una CIM= 100 µg/mL.

Frente a *Candida parapsilosis* y al aislado clínico *C. tropicalis* MQ1, se observó que un grupo de tratamientos selectos mantuvo una alta eficacia con CIM=100 µg/mL, superando la resistencia de la cepa, mientras que los demás extractos perdieron actividad significativamente (> 400 µg/mL). En contraste con los resultados encontrados en los propóleos de Bauchaceta, la cepa de *Candida albicans* resultó ser la más resistente a los propóleos de Ullum (CIM> 400 µg/mL). La diferencia en los efectos antifúngicos con los EEP de Bauchaceta, puede deberse a la composición química del propóleo. En cuanto a las condiciones óptimas, al igual que lo mencionado en la actividad antibacteriana, las condiciones óptimas para la obtención de CFT no coinciden necesariamente con aquellas que maximizan la actividad antifúngica, infiriendo que este efecto debe a la presencia de moléculas bioactivas y su combinación.

4.4 Efecto combinatorio con drogas comerciales

Para la obtención de los resultados del objetivo 4 se realizó el análisis del efecto combinatorio entre los EEP y las drogas comerciales.

La terna **(7, 20, 33)** se seleccionó porque presentó actividad antibacteriana con valores de CIM entre 31,25 - 62,50 µg/ml y CMB entre 31,25 - 62,50 µg/ml, para los EEP de Iglesia y Ullum (Tablas 4 y 6) frente a las cepas Gram (+) evaluadas.

En el caso de las levaduras, el efecto combinatorio sobre *C. albicans* se evaluó únicamente en el departamento de Bauchaceta, debido a que en Ullum los EEP, no presentaron actividad antifúngica (Tablas 5 y 7). Por otro lado, para el departamento Ullum, la terna **(9, 22, 35)** también fueron probadas contra *C. glabrata* debido a los valores de CIMs y CFMs = 50 µg/mL (Tabla 7).

A continuación, se presenta un ejemplo del diseño del “Tablero de ajedrez” con los porcentajes de inhibición que indicaron los valores de CIM del tratamiento con las condiciones 25 °C, 90% etanol y 30 minutos de sonicado del imipenem solos y en combinación, frente a *S. aureus* sensible a la meticilina.

Tabla 8 : Porcentajes de inhibición del EEP 20 (25 °C, 90 %, 30 min) , de Imipenem solos y en combinación, frente a *Sams*.

Concentración de Imipenem µg/mL	Concentración del EEP número 20					
	125	62.5	CIM= 31,25	15,625	7,81	CIM Imp
Anti 4	106,6874	101,5896	101,9459	99,2326	100,0822	100,6578
2	101,6170	99,7807	103,7822	100,3015	100,0274	100,2467
cim	100,1919	99,3422	105,5089	100,1644	99,8904	100,4659
1/2	102,6585	86,7075	104,9881	92,5452	41,6499	57,2447
1/4	100,9044	98,8489	105,8377	100,9271	100,0822	99,8356
1/8	102,5763	51,8180	105,5911	32,7151	71,2224	-39,2289
CIM EEP	112,3059	108,1400	108,2770	105,2074	73,5520	-86,8902

Para determinar el efecto combinatorio del tratamiento 20 con el antibiótico, se seleccionó las CIM solas (sin combinación) del tratamiento 20 (CIM= 15,625 µg/mL, cuadrante azul) y del imipenem (CIM=0,25 µg/mL, cuadrante verde) y la CIM del tratamiento 20 y del antibiótico combinado (CIM= 15,625 µg/mL, cuadrante naranja), seleccionado a un porcentaje de inhibición del 100 %. A partir de esos valores se realizaron los cálculos de la CIF de cada uno y del ICIF que indicó el efecto producido.

En la Tabla 9 se presentan los resultados de las Concentraciones inhibitorias fraccionarias (CIF), índice de la concentración inhibitoria fraccionaria (ICIF), efecto e índice de reducción de dosis (IRD) de los agentes comerciales.

Tabla 9: Valores de CIF ($\mu\text{g/mL}$) de los EEP (CIF_{EEP}), Concentración Inhibitoria del antibiótico (CIF_{DC}) y Concentración Inhibitoria del antifúngico (CIF_{DC}); ICIF: Índice de Concentración inhibitoria fraccionaria; IRD: Índice de reducción de dosis

EEP	Microorganismos	CIF EEP ($\mu\text{g/mL}$)	CIFANTB O CIFANTIF ($\mu\text{g/mL}$)	ICIF	Efecto	IRD Antibiótico o antifúngico
Terna (7, 20, 33) - Bauchaceta	<i>Sams</i> ATCC 25923	0,512	0,256	0,768	<u>Aditivo</u>	4
	<i>Samr</i> ATCC 43300	0,256	1	1,256	<u>Aditivo</u>	1
	<i>S. aureus</i> - MQ1	1	0,0625	1,0625	<u>Aditivo</u>	8
	<i>C. albicans</i>	1	0,125	1,125	<u>Aditivo</u>	8
Terna (7, 20, 33) - Ullum	<i>Sams</i> ATCC 25923	0,512	0,256	0,762	<u>Aditivo</u>	4
	<i>Samr</i> ATCC 43300	0,256	1	1,256	<u>Aditivo</u>	1
	<i>S. aureus</i> - MQ1	1	0,0625	1,0625	<u>Aditivo</u>	8
	<i>S. aureus</i> - MQ2	1	0,125	1,125	<u>Aditivo</u>	8
Terna 9, 22, 35- Ullum	<i>C. glabrata</i>	2	0,125	2,125	<u>Indiferente</u>	8

4.4.1 Combinación de la terna más activa de EEP de Iglesia (Bauchaceta) con imipenem frente a bacterias Gram (+) y con ketoconazol frente a la levadura *C. albicans*

Se observó que el EEP de Bauchaceta, en combinación con imipenem frente a las cepas Gram (+) tipificadas: *Sams* ATCC 25923, *Samr* ATCC 43300 y aislados clínicos de *S. aureus*

MQ1, mostraron valores de $CIF_{EEP} = \frac{CIM_{EEP} \text{ combinado}}{CIM_{EEP} \text{ solo}} = 15,625/31,25 = 0,512 \mu\text{g/mL}$, frente a *Sams*. Mientras que, frente a *Samr* el valor de $CIF_{EEP} = 0,256 \mu\text{g/mL}$ y, por último, $CIF_{EEP} = 1$ frente al aislado clínico (*Sa*-MQ1. Por otra parte, los valores de CIF del imipenem fueron de $CIF_{ANTIB} = \frac{CIM_{DC} \text{ combinado}}{CIM_{DC} \text{ solo}} = 0,256 \mu\text{g/mL}$ frente a la cepa tipificada *Sams*. Frente a *Samr* el valor de CIF_{DC} fue $1 \mu\text{g/mL}$, mientras que para el valor de CIF para imipenem frente al aislado clínico (*Sa*-MQ1 fue de $0,0625 \mu\text{g/mL}$. A continuación, se detalla el cálculo del valor del índice de concentración inhibitoria fraccionada (ICIF), que determinó el efecto de la combinación (EEP + Antibiótico):

$$ICIF = CIF_{EEP} + CIF_{DC}$$

Frente a cepas tipificadas de bacterias:

- *Sams*: $ICIF = 0,512 \mu\text{g/ml} + 0,256 \mu\text{g/ml} = \mathbf{0,768}$
- *Samr*: $ICIF = 0,256 \mu\text{g/ml} + 1 \mu\text{g/ml} = \mathbf{1,256}$

Frente al aislado clínico de la bacteria *Staphylococcus aureus* MQ1:

- (*Sa*-MQ1: $ICIF = 1 \mu\text{g/ml} + 0,0625 \mu\text{g/ml} = \mathbf{1,0625}$

Los valores de ICIF indicaron que la combinación de la terna de tratamientos **7, 20, 33** de Bauchaceta con imipenem dio como resultado un efecto **aditivo** ($0,5 < ICIF < 2,0$), siendo la cepa tipificada *Sams* la más sensible a la combinación ($ICIF = \mathbf{0,768}$). Cabe destacar que el IRD de imipenem se redujo 4 veces frente a *Sams* ($IRD=4$) y hasta 8 veces frente a (*Sa*-MQ1 ($IRD=8$), lo que indica que la combinación de este producto natural con imipenem reduciría la toxicidad del antibiótico en terapia complementarias antimicrobianas.

Autores como Lavigne *et al.*, (2020); Gucwa *et al.*, (2018) posicionan al propóleo en combinación con antimicrobianos como sinérgicos. Sin embargo, Rana *et al.*, (2025) informaron que, aunque el propóleo suele ser sinérgico en combinación con antimicrobianos también puede mostrar efectos **aditivos** teniendo en cuenta su origen botánico y la resistencia de los microorganismos evaluados.

Frente a la levadura *C. albicans* los valores de CIF_{EEP} y CIF_{ANTIF} en combinación con ketoconazol fueron $CIF_{EEP} = 1 \mu\text{g/mL}$ y $CIF_{ANTIF} = 0,125 \mu\text{g/mL}$

- *C. albicans*: $ICIF = 1 \mu\text{g/ml} + 0,125 \mu\text{g/ml} = \mathbf{1,125}$

La combinación de EEP de Iglesia con ketoconazol mostró un efecto **aditivo** frente a *C. albicans*. Respecto al IRD de ketoconazol, se observó que la combinación de la terna (7, 20, 33) con el antifúngico redujo hasta ocho (8) veces su valor.

4.4.2 Combinación de las ternas más activas de EEP de Ullum con imipenem frente a bacterias Gram (+) y con ketoconazol frente a la levadura *C. glabrata*.

Se observó que la terna (7, 20, 33) de Ullum en combinación con imipenem frente a las cepas Gram (+) tipificadas: *Sams* ATCC 25923, *Samr* ATCC 43300 y aislados clínicos de *S. aureus* MQ1 y MQ2, mostraron valores iguales a los de Bauchaceta de $CIF_{EEP} = 0,512 \mu\text{g/mL}$ frente a *Sams*. Mientras que, los valores de CIF_{EEP} fue de $0,256 \mu\text{g/mL}$ frente a *Samr* y de frente a ambos aislados clínicos (*Sa*-MQ1) y (*Sa*-MQ2) de $CIF_{EEP} = 1$. Además, los valores de CIF de imipenem fue de $CIF_{ANTIB} = 0,256 \mu\text{g/mL}$, frente a *Sams*, y se observó un valor mayor de CIF_{DC} frente a *Samr* ($CIF_{ANTIB} = 1 \mu\text{g/mL}$). Los aislados clínicos (*Sa*-MQ1 mostraron un $CIF_{ANTIB} = 0,0625 \mu\text{g/mL}$, y frente a (*Sa*-MQ2 fue de $CIF_{ANTIB} = 0,1255 \mu\text{g/mL}$.

El cálculo del valor del ICIF se detalla a continuación para determinar el efecto de la combinación (EEP + Antifúngico):

$$ICIF = CIF_{EEP} + CIF_{DC}$$

Para la terna (7, 20, 33):

Frente a cepas tipificadas de bacterias:

- *Sams* : $ICIF = 0,512 \mu\text{g/ml} + 0,256 \mu\text{g/ml} = \mathbf{0,768}$
- *Samr* : $ICIF = 0,256 \mu\text{g/ml} + 1 \mu\text{g/ml} = \mathbf{1,256}$

Frente a aislados clínico de *Staphylococcus aureus* MQ1 y MQ2:

- (*Sa*-MQ1: $ICIF = 1 \mu\text{g/ml} + 0,0625 \mu\text{g/ml} = \mathbf{1,0625}$
- (*Sa*-MQ2: $ICIF = 1 \mu\text{g/ml} + 0,125 \mu\text{g/ml} = \mathbf{1,125}$

Los efectos entre la combinación de la terna (7, 20, 33) e imipenem indicaron aditivismo ($0,5 < ICIF < 2,0$), siendo la cepa *Sams* la más sensible. Asimismo, el IRD del antibiótico combinado mostró una reducción de hasta cuatro (4) veces ($IRD = 4$) frente a *Sams* ATCC 43300. Por otro lado, se observó una reducción de 8 veces frente a (*Sa*-MQ2 y *S. aureus* MQ1).

La terna (9, 22, 35) en combinación con ketoconazol frente a la levadura *C. glabrata* tuvo valores de $CIF_{EEP} = 2 \mu\text{g/mL}$ y $CIF_{ANTIF} = 0,125 \mu\text{g/mL}$.

Frente a levadura *C. glabrata*

- *C. glabrata*: ICIF = $2 \mu\text{g/ml} + 0,125 \mu\text{g/ml} = 2,125$

Teniendo en cuenta lo descrito por Nikolić *et al.*, (2017), el efecto sin interacción o indiferencia presenta valores de $2 \leq \text{ICIF} \leq 4$. Sin embargo, la posibilidad de disminuir la concentración del antifúngico ketoconazol de hasta ocho (IRD) con la combinación de un producto natural, indica la potencia antimicrobiana del propóleo frente a infecciones microbianas.

4.5 Difusión de resultados

El objetivo 5 del presente trabajo se cumplió al difundir los resultados en los siguientes eventos científicos:

- EXPO INNOVA CUYO el 1, 2 y 3 de octubre de 2025 con el póster denominado:
“Aplicaciones de los propóleos frente a microorganismos patógenos”

Ruiz G; **Silva M**; Zalazar D; Tapia A; Lati J; Lima B

- XLIII REUNIÓN CIENTÍFICA ANUAL DE LA SOCIEDAD DE BIOLOGÍA DE CUYO que se realizó los días 4 y 5 de diciembre del 2025 en la Universidad Juan

Agustín Maza, provincia de Mendoza titulado:

“Propóleo tipo Larrea de Bauchaceta, San Juan: optimización de la extracción de compuestos fenólicos para mejorar su actividad anticandida.”.

Silva M^{1, 2}, Ruiz G^{1, 2}, Gómez J^{1, 2}, Zalazar-García D^{2, 3}, Maturano C^{2, 4}, Mazza G^{2, 4}, Paoli G⁵, Tapia A¹, Lima B^{1, 2}

5. CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

5.1 Conclusiones

- Las condiciones óptimas de extracción del CFT de los extractos del propóleo del departamento Iglesia, localidad Bauchaceta, corresponden a: 50 °C, 91% de etanol y tiempo de sonicación de 17 min.
- Con respecto a los EEP de Ullum, para obtener la mayor cantidad de compuestos fenólicos se necesitan las siguientes condiciones: tiempo de sonificado de 21 minutos, concentración de alcohol 88,98 % y temperatura 39,65 °C. Ambos departamentos alcanzaron concentraciones de compuestos fenólicos ≥ 250 mg EAG/g.
- Los EEP provenientes de Ullum asociados botánicamente a diferentes especies vegetales, mostraron una alta significancia del modelo global e interacciones de las condiciones operativas. Esto sugiere que la liberación de compuestos fenólicos en esta matriz está fuertemente gobernada por fenómenos combinados de cavitación ultrasónica, polaridad del solvente, etc.
- El modelo ajustado para los EEP de Iglesia (Bauchaceta) no resultó estadísticamente significativo y presentó alta dispersión experimental. Esta variabilidad no implicó ineficiencia del proceso, sino una respuesta menos sistemática frente a las variaciones de temperatura, concentración de etanol y tiempo de sonicación dentro del rango estudiado. Esto podría estar asociada a una distribución diferente de los compuestos fenólicos, lo que dificulta la identificación de un máximo bien definido.
- La actividad antibacteriana de los diferentes EEP de Iglesia (Bauchaceta), mostraron valores de CIMs entre 31,5-125 $\mu\text{g/mL}$, mientras que los valores de CBM obtenidos fueron en un rango de 31,5-500 $\mu\text{g/mL}$, frente a las bacterias Gram (+) evaluadas.
- El efecto antifúngico de los EEP de Iglesia (Bauchaceta), frente a los hongos levaduriformes del género *Candida* mostraron valores de CIMs en un rango de 62,50-500 $\mu\text{g/mL}$.

- ✚ La actividad antibacteriana de los EEP del departamento Ullum, fue menor a los EEP de Iglesia (valores de CIM de 62,50 a 500 $\mu\text{g/mL}$), lo que inferimos que puede deberse a la asociación botánica de los propóleos de Bauchaceta (Iglesia) con la especie *Jarilla nítida* cuya composición química ya ha sido previamente informada.
- ✚ La propiedad antifúngica para los tratamientos de las ternas (2, 15, 28), (4, 17, 30), (7, 20, 33), (9, 22, 35) y (10, 23, 36), del departamento Ullum, fue potente frente a *Candida glabrata* (CIM = 50 $\mu\text{g/mL}$), mientras que el resto de los extractos fueron efectivos a 100 $\mu\text{g/mL}$. Asimismo, la cepa *C. tropicalis* C131 mostró una sensibilidad homogénea, siendo inhibida por la mayoría de los tratamientos a una CIM = 100 $\mu\text{g/mL}$.
- ✚ La actividad antimicrobiana de los tratamientos de EEP de ambos departamentos, permitió observar que, bajo condiciones diferentes de las variables evaluadas en el DBB, se logró la inhibición y/o eliminación de los microorganismos estudiados, reafirmando lo informado por otros autores sobre la combinación de moléculas activas (compuestos fenólicos), que pueden encontrarse en mínimas cantidades.
- ✚ La combinación de los EEP (terna 7, 20, 33) de ambos departamentos, con agentes antimicrobianos comerciales; evidenció un **efecto aditivo** ($0,5 < \text{ICIF} < 2,0$), con IRD de imipenem y ketoconazol de 4 y hasta 8 veces su valor.
- ✚ La combinación de los propóleos de ambos departamentos, con agentes comerciales, permitió **reducir** las toxicidades de **antibióticos y antifúngicos** sin comprometer la actividad antimicrobiana frente a las distintas cepas, reafirmando las características de coadyuvante que presenta el propóleo.

Teniendo en cuenta las conclusiones, la hipótesis se acepta parcialmente, ya que el diseño Box–Behnken permitió identificar las condiciones óptimas de extracción para los propóleos de Ullum, mientras que para los provenientes de Bauchaceta el modelo no resultó estadísticamente significativo, posiblemente debido a la diferencia de sus perfiles químicos.

5.2 Proyecciones

Sobre la base de los resultados alcanzados en relación a optimizar la extracción de compuestos fenólicos mediante la aplicación del diseño de Box Behnken de propóleos de dos departamentos de San Juan, para potenciar su actividad antimicrobiana, se plantean las siguientes proyecciones:

-  Con respecto a la optimización de los extractos, se podría ampliar el número de muestras a ensayar, que permitiría una estandarización del contenido de moléculas bioactivas.
-  Determinar el contenido de compuestos flavonoides y no flavonoides que caracterizaría químicamente a las muestras de propóleos e identificará las diferencias en los perfiles químicos de las muestras de ambos departamentos.
-  Buscar un modelo factorial que se ajuste significativamente a los resultados del CFT para las muestras de propóleos de Bauchaceta (Iglesia) y disminuir las limitaciones predictivas.
-  Caracterizar el perfil químico, mediante técnicas de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas (HPLC/EM), de los propóleos evaluados (Iglesia y Ullum) con el objetivo de identificar y evaluar los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana y sus diferentes efectos ante los tratamientos realizados.
-  Evaluar la actividad antimicrobiana de los puntos experimentales obtenidos mediante el DBB, con un panel mayor de microorganismos, que permitiría determinar la sensibilidad de cepas frente a los diferentes tratamientos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. **Aboulghazi, A.**, Bakour, M., Fadil, M. y Lyoussi, B. (2022). Optimización simultánea del rendimiento de extracción, los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante de extractos de propóleo marroquí: mejora de la técnica asistida por ultrasonidos mediante la metodología de superficie de respuesta. *Processes*, 10 (2), 297.
2. **Agüero, M. B.**, Gonzalez, M., Lima, B., Svetaz, L., Sánchez, M., Zacchino, S., Feresin, G., Schmeda, G., Palermo, J., Wunderlin, D., y Tapia, A. (2010). Argentinean propolis from *Zuccagnia punctata* Cav.(Caesalpinieae) exudates: phytochemical characterization and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 194-201.
3. **Agüero, M. B.**, Svetaz, L., Sánchez, M., Luna, L., Lima, B., López, M. L., Zchino, S., Wunderlin, D., Feresin, G., y Tapia, A. (2011). Argentinean Andean propolis associated with the medicinal plant *Larrea nitida* Cav.(Zygophyllaceae). HPLC–MS and GC–MS characterization and antifungal activity. *Food and Chemical Toxicology*, 49(9), 1970-1978.
4. **Agüero, M. B.**, Svetaz, L., Baroni, V., Lima, B., Luna, L., Zacchino, S., Saavedra, P., Wunderlin, D., Feresin, G., y Tapia, A. (2014). Urban propolis from San Juan province (Argentina): Ethnopharmacological uses and antifungal activity against *Candida* and dermatophytes. *Industrial Crops and Products*, 57, 166-173.
5. **AL-Ani, I.**, Zimmermann, S., Reichling, J., y Wink, M. (2018). Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. *Medicines*, 5(1), 2.
6. **Alara, O. R.**, Abdurahman, N. H., Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4, 200-214.
7. **Álvarez-Martínez, F. J.**, Barrajon-Catalán, E., Encinar, J. A., Rodríguez-Díaz, J. C., y Micol, V. (2020). Antimicrobial capacity of plant polyphenols against gram-positive bacteria: A comprehensive review. *Current medicinal chemistry*, 27(15), 2576-2606.
8. **Bankova, V.**, Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., da Silva Cunha, I. B., Danert, C., Nogueira, M., Falcao, S., Nieva, M., Papotti, G., Popova, M., Basso, K., Salas A., Frankland, A., Vilczaki, N., Sforcind, J., Simone-Finstrom, M., Spivak, M, Trusheva, B., Vilas-Boash, M., Wilson, M., y Zampini, C. (2019). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*, 58(2), 1-49.

9. **Bankova, V.**, Trusheva, B., Popova, M. (2021). Métodos de extracción de propóleo: Una revisión. *J. Apic. Res.*, 60, 734–743.
10. **Barabadi, H.**, Honary, S., Ebrahimi, P., Mohammadi, MA, Alizadeh, A. y Naghibi, F. (2014). Preparación, caracterización y optimización de nanopartículas de oro mediante procesos microbianos. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45, 1493-1501.
11. **Becerra-Rojas, S. A.**, Maldonado-Roa, E., y Castro-Molina, S. L. (2022). Efecto bioconservante del propóleo y su aplicación en la conservación de matrices cárnicas. *Perspectivas en nutrición humana*, 24(1), 125-135.
12. **Bonfigli, M.**, Godoy, E., Reinheimer, M. A., Scenna, N. J. (2017). Comparison between conventional and ultrasound-assisted techniques for extraction of anthocyanins from grape pomace. Experimental results and mathematical modeling. *J. Food Eng.*, 207, 56-72.
13. **Brunetti, J.**, Carnicelli, V., Ponzi, A., Di Giulio, A., Lizzi, A. R., Cristiano, L., Cresti, L., Capello, G., Pollini, S., y Pini, A. (2020). Antibacterial and anti-inflammatory activity of an antimicrobial peptide synthesized with D amino acids. *Antibiotics*, 9(12), 840.
14. **Cano-Lamadrid, M.**, Martínez-Zamora, L., Mozafari, L., Bueso, M. C., Kessler, M., Artés-Hernández, F. (2023). Response Surface Methodology to Optimize the Extraction of Carotenoids from Horticultural By-Products-A Systematic Review. *Foods*, 12(24):4456.
15. **Cedeño, V.**, Colón, C., Zamora, Z., Monserrate, K. (2020). Preparados orgánicos (Croton lechleri y Propolis de Apis mellifera) en el tratamiento de mastitis clínica y subclínica en bovinos de leche. Repositorio espam.
16. **Chou T. C.** (2006) Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev.* Sep;58(3):621-81.
17. **Chou, T. C.** (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer research*, 70(2), 440-446.
18. **Chouikh, A.**, Chenguel, A., y Ali, AB (2025). Comprender el papel de los radicales libres, el estrés oxidativo y los antioxidantes: una revisión exhaustiva. *Lett. Appl. NanoBioScience*, 14, 66.

19. **CLSI**, (2002). Clinical and Laboratory Standard Institute, formerly NCCLS, National CommittEEP for Clinical and Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. CLSI Document M27-A2.
20. **CLSI** (2013). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement; CLSI document M100 S21, 31:1;
21. **Díaz, P. L.**, Suárez, P. Y., Rubio, O. A., et al. (2021). Actualidad y perspectivas de los antimicrobianos naturales. *Granja Rev Cubana*, 54(3):1-22.
22. **El Oihabi**, M. S., El Fellah, I., Fakihi Lanjri, H., Ben Allal, L., Ammari, M., Fakihi Lanjr, A. (2024). Optimized extraction of phenolic compounds and antioxidant activity from cannabis Co-products via a combination of solvent-ultrasound-assisted extraction, response surface methodology, and sensitivity analysis. *Elsevier*.
23. **Fajardo Contreras, J. D.**, Sánchez Plaza, F. A., Dueñas Rivadeneira, J. P., y Dueñas Rivadeneira, A. A. (2022). Extracción asistida por ultrasonido y su aplicación en la obtención de aceites vegetales. *Centro Azúcar*, 49(4), 125-143.
24. **Golmahi, Z.**, y Hossein Elhamirad, A. (2021). Ultrasound-assisted extraction of phenolics and antioxidants from propolis for stabilization of sunflower oil. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 38(1), 4-19.
25. **Gómez, J.**, Simirgiotis, M. J., Lima, B., Gamarra-Luques, C., Bórquez, J., Caballero, D., y Tapia, A. (2019). Huella digital UHPLC–Q/Orbitrap/MS/MS, captación de radicales libres y actividad antimicrobiana de la decocción liofilizada de *Tessaria absinthiodes* (Hook. y arn.) DC. (Asteraceae) de Argentina y Chile. *Antioxidants*, 8(12), 593.
26. **Gómez, J.**, Simirgiotis, M. J., Manrique, S., Piñeiro, M., Lima, B., Bórquez, J., Feresin, G., y Tapia, A. (2021). Perfilado de fenólicos por UHPLC-ESI-OT-MS, eliminación de radicales libres, actividades antibacterianas y nematocidas de “resinas de color amarillo-marrón” de *Larrea* spp. *Antioxidantes*, 10(2), 185.
27. **Gucwa, K.**, Kusznierevicz, B., Milewski, S., Van Dijck, P. y Szweda, P. (2018). Actividad antifúngica y sinergismo con azoles de propóleo polaco. *Pathogens*, 7 (2), 56.
28. **Herrera, C. L.**, Alvear, M., Barrientos, L., Montenegro, G., y Salazar, L. A. (2010). Efecto antifúngico de seis extractos comerciales de propóleo chileno sobre *Candida* spp. *Ciencia e Investigación Agraria*, 37(1), 75–84

29. **Ispiryan, A.**, Atkociuniene, V., Makstutiene, N., Sarkinas, A., Salaseviciene, A., Urbonaviciene, D., Viskelis, J., Pakeltiene, R. y Raudone, L. (2024). Correlación entre los valores de actividad antimicrobiana y el contenido fenólico total/actividad antioxidante en *plantas de Rubus idaeus* L. , 13 (4), 504.
30. **Jami-Jami, N. V.**, Chavez-Moran, L. J., Pineda-Insuasti, J., y Alejandro, C. (2024) Producción de derivados de propóleo: una revisión (Production of propolis derivatives: a review).
31. **Khanna, K.**; Bhardwaj, R.; Alam, P.; Reiter, R. J.; Ahmad, P. Phytemelatonin(2023): A master regulator for plant oxidative stress management. *Plant Physiol Biochem*, 196,260- 9,
32. **Kwiecińska-Piróg, J.**, Skowron, K. y Gospodarek-Komkowska, E. (2018). Bacteriemia primaria y secundaria causada por *Proteus* spp.: epidemiología, susceptibilidad de cepas y formación de biopelículas. *Revista polaca de microbiología*, 67(4), 471.
33. **Lavigne, J. P.**, Ranfaing, J., Dunyach-Rémy, C., y Sotto, A. (2020). Synergistic effect of propolis and antibiotics on uropathogenic *Escherichia coli*. *Antibiotics*, 9(11), 739.
34. **Lazo, G. L.**, Lemes, D. C., Pauletti, P. M., Bastos, J. K., Ambrósio, S. R., Veneziani, R. C. S., y Pires, R. H. (2025). Analysis of the antimicrobial activity of propolis: A narrative review of in-vitro studies. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 97(3), e20241302.
35. **Lima** (2007). Tesis de Maestría en Ciencias Químicas: Estudio Químico y Actividad Biológica de los Propóleos de la Provincia de San Juan, Argentina. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.
36. **Lima, B.**, Tapia, A., Luna, L., Fabani, M. P., Schmeda-Hirschmann, G., Podio, N. S., Wunderlin,D.,y Feresin, G. E. (2009). Los principales flavonoides, la actividad DPPH y el contenido de metales permiten determinar el origen geográfico del propóleo de la provincia de San Juan (Argentina). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2691-2698.
37. **Lima et al.**, (2022). Synergistic antifungal effectiveness of essential oils from Andean plants combined with commercial drugs. *Int J Pharm Sci Dev Res* 8(1): 023-031.
38. **Mahallati, M. N.** (2020). Advances in modeling saffron growth and development at different scales. In *Saffron* (pp. 139-167). Woodhead Publishing.

39. **Márquez Vega, I. C.** (2025). Eficacia del propóleo como tratamiento coadyuvante de la periodontitis: una revisión sistemática y metaanálisis.
40. **Montiel, R. C.,** Martínez, J. H., Acero, A. P., Soto, I. H., Munguía, A. R., y Montiel, L. G. (2023). Tecnologías sustentables (microondas, ultrasonido y CO₂ supercrítico) para extracción de compuestos bioactivos en propóleo. *Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP*, (9), 20-25.
41. **Nader, RA,** Mackieh, R., Wehbe, R., El Obeid, D., Sabatier, JM, & Fajloun, Z. (2021). Productos de la colmena como agentes antibacterianos: una revisión. *Antibiotics* , 10 (6), 717.
42. **Nazzaro, F.,** Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., y De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474.
43. **Nikolić, M. M.,** Jovanović, K. K., Marković, T. L., Marković, D. L., Gligorijević, N. N., Radulović, S. S., Kostic, M., Glamočlija, J., y Soković, M. D. (2017). Sinergismo antimicrobiano y propiedades citotóxicas de los aceites esenciales de Citrus limon L., Piper nigrum L. y Melaleuca alternifolia (Maiden y Betche) ChEEPI. *Revista de Farmacia y Farmacología*, 69(11), 1606-1614.
44. **NORMAS IRAM-INTA 15935-2** (2008)
45. **NORMAS IRAM-INTA** (2008).
46. **Oldoni, T. L. C.,** Oliveira, S., Andolfatto, S., Karling, M., Calegari, M., Sado, R., Maia, F., Alencar, S., y Lima, V. A. (2015). Chemical characterization and optimization of the extraction process of bioactive compounds from propolis produced by selected bEEPs Apis mellifera. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 26, 2054-2062.
47. **OMS** (Organización Mundial de la Salud). https://www.who.int/health-topics/one-health#tab=tab_1
48. **Oroian, M.,** Ursachi F., Dranca F., (2020) Influence of ultrasonic amplitude, temperature, time and solvent concentration on bioactive compounds extraction from propolis, *Ultrasonics Sonochemistry*, Volume 64, , 05021, ISSN 1350-4177,
49. **Osés, SM,** Marcos, P., Azofra, P., de Pablo, A., Fernández-Muñoz, M. Á., y Sancho, MT (2020). Perfil fenólico, capacidades antioxidantes y actividades inhibitoras enzimáticas del propóleo de diferentes áreas geográficas: Necesidades de armonización analítica. *Antioxidantes* , 9 (1)

50. **Özkök, A.**, Keskin, M., Tanuğur Samancı, A. E., Yorulmaz Önder, E., y Takma, Ç. (2021). Determination of antioxidant activity and phenolic compounds for basic standardization of Turkish propolis. *Applied Biological Chemistry*, 64(1), 37.
51. **Pereira, D. B.**, Fernández Barbero, G., Carrera, C., Palma, M., Epifânio, N. M., Kawahito, T. C., ... y Chaves, D. S. (2025). Innovative Ultrasound-Assisted Extraction for Phenolic and Antioxidant Evaluation of Brazilian GrEEPn Propolis. *Processes*, 13(9), 2880.
52. **Proestos, C.**, y Varzakas, T. (2017). Aromatic plants: Antioxidant capacity and polyphenol characterisation. *Foods*, 6(4), 28.
53. **Queiroga, MC**, Laranjo, M., Andrade, N., Marques, M., Costa, AR y Antunes, CM (2023). Evaluación antimicrobiana, antibiofilm y toxicológica del propóleo. *Antibióticos* , 12 (2), 347.
54. **Rahman, M. M.**, Rahaman, M. S., Islam, M. R., Rahman, F., Mithi, F. M., Alqahtani, T., Almikhlaifi ,M., Alghamdi,S.,Alruwail,A.,y Uddin, M. S. (2021). Role of Phenolic Compounds in Human Disease: Current Knowledge and Future Prospects. *Molecules*, 27(1):233
55. **Rana, A.**, Malik, A. y Sobti, RC (2025). Propiedades antibacterianas del propóleo: una revisión exhaustiva: A. Rana et al. *Current Microbiology* , 82 (10), 479.
56. **Ramos, D.** (2020). Comparación del efecto de cicatrización en caninos (Canis lupus familiaris) sometidos a orquiectomía utilizando citrato de plata, propóleo y savia de huampo (Croton lechleri).
57. **Rivera-Rojas, F. N.**, Guerrero-Naranjo, L. E., Montero-Mora, M. C., y Vargas-Peralvo, E. A. (2024). Optimización de la extracción de compuestos polifenólicos totales y actividad antioxidante de Hibiscus sabdariffa L. *Código Científico Revista de Investigación*, 5(E3), 97-118.
58. **Riveros-Gomez, M.**, Zalazar-García, D., Mut, I., Torres-Sciancalepore, R., Fabani, M. P., Rodriguez, R., y Mazza, G. (2022). Optimización multiobjetivo e implementación de un esquema de producción de biorrefinería para la extracción sostenible de pectina a partir de residuos orgánicos de membrillo. *ACS EnginEEPring Au*, 2(6), 496-506.
59. **Rodríguez Pérez, B.**, Canales Martínez, M. M., Penieres Carrillo, J. G., y Cruz Sánchez, T. A. (2020). Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. *Acta universitaria*, 30.

60. **Salamanca Grosso, G.** (2017). Origen, naturaleza, propiedades fisicoquímicas y valor terapéutico del propóleo.
61. **Salas, A. L.,** Mercado, M. I., Eugenia Orqueda, M., Correa Uriburu, F. M., García, M. E., Pérez, M. J., y Isla, M. I. (2020). Propóleo tipo Zuccagnia de Argentina: Un potencial ingrediente funcional en alimentos para patologías asociadas al síndrome metabólico y estrés oxidativo. *Journal of Food Science*, 85(8), 2578-2588.
62. **Seidel, V.;** Peyfoon, E.; Watson, D.G.; Fearnley, J. 2008. Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. *Phytother. Res.* , 22, 1256–1263.
63. **Suárez Guinodoz, M. Á.,** Rosende, R. O., y Finten, S. B. (2013). Propiedades del propóleo y su relación con la salud y la práctica odontológica.
64. **Tamokou, J.D.D;** Mbaveng, A.T.; Kuete, V. (2017). Antimicrobial Activities of African Medicinal Spices and Vegetables; *Elsevier Inc.:* Amsterdam, The Netherlands; ISBN 9780128094419
65. **Vázquez-Espinosa, M.,** Álvarez-Romero, M., González-de-Peredo, A. V., Ruíz-Rodríguez, A., Barbero, G. F., Palma, M. (2024). Optimización de la extracción de los compuestos fenólicos presentes en la cebada y determinación de su capacidad antioxidante. *XLV Jornadas de viticultura y enología de la Tierra de Barros*, 178-194.
66. **Yilmaz, Ö.,** Elbir Abca, T., Kamiloğlu, A., y Kutlu, N. (2024). Ultrasound-assisted choline chloride-based dDEEP eutectic solvent extraction of bioactive compounds from salsify (*Tragopogon buphthalmoides* (DC.) Boiss. var. latifolius Boiss.): A Box–Behnken design approach for optimization. **Microchemical Journal**, **199**, 110218.
67. **Yusof, N.,** Munaim, MA, y Kutty, RV (2020). Extracción asistida por ultrasonido de propóleos y su estudio cinético. En *la serie de conferencias IOP: Ciencia e ingeniería de materiales* (Vol. 736, N.º 2, p. 022089). IOP Publishing.
68. **Zalazar-García, D.,** Feresin, G. E., y Rodriguez, R. (2022). Optimal operational variables of phenolic compound extractions from pistachio industry waste (*Pistacia vera* var. Kerman) using the response surface method. *Biomass Conversion and Biorefinery*, *12*(9), 3761-3770. (A)
69. **Zalazar-Garcia, D.,** Román, M. C., Fernandez, A., Asensio, D., Zhang, X., Fabani, M. P., Rodriguez, R., y Mazza, G. (2022). Exergy, energy, and sustainability assessments applied to RSM optimization of integrated convective air-drying with pretreatments to

improve the nutritional quality of pumpkin sEEPds. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 49, 101763. (B)

70. **Zampini, I. C.**, Salas, A. L., Maldonado, L. M., Simirgiotis, M. J., e Isla, M. I. (2021). Propóleo de la región del Monte en Argentina: un ingrediente funcional fitoterapéutico y alimentario potencial. *Metabolites*, 11(2), 76.
71. **Zhu, M.**, Bao, J., Liang, P., Zhang, C., Li, S., y Hu, F. (2025). Extraction of flavonoids and phenolic acids from Poplar-type propolis: optimization of maceration process, evaluation of antioxidant and antimicrobial activities. *LWT*, 118481.
72. **Zulhendri, F.**, Chandrasekaran, K., Kowacz, M., Ravalia, M., Kripal, K., Fearnley, J., y Perera, C. O. (2021). Antiviral, antibacterial, antifungal, and antiparasitic properties of Propolis: A Review. *Foods*, 10(6), 1360. Poner en el índice EEP y en el listado de abreviaturas.