

Actividad antimicrobiana de propóleo en solución etanólica y en películas de quitosano-alcohol polivinílico

Kety León¹, Julio Santiago^{1,2,*}

¹ Dirección de Investigación y Desarrollo, Instituto Peruano de Energía Nuclear, Av. Canadá 1470, Lima 41, Perú

² Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química e Ing. Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Av. Venezuela S/N, Lima 1, Perú

Resumen

Se ha estudiado la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de propóleo, *Apis mellifera*, y de películas de quitosano-alcohol polivinílico embebidas en dichas soluciones, frente a *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. El extracto etanólico de propóleo presenta actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* ATCC 25923, inclusive cuando se le diluye en una solución hidroalcohólica al 10 %. En cambio, las películas de quitosano-PVA embebidas en la misma solución hidroalcohólica de propóleo no presentan actividad antimicrobiana frente a la misma cepa. Ninguna de las muestra ensayadas presentó actividad frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*.

Abstract

The antimicrobial activity of ethanolic extracts of propolis, *Apis mellifera*, and of chitosan-polyvinyl alcohol films immersed in those solutions against *S. aureus*, *E. aeruginosa coli* and *P. aeruginosa* have been studied. The ethanolic extract of propolis exhibits antimicrobial activity against *S. aureus* ATCC 25923, even after dilution in a 10 % hydroalcoholic solution. However, films of chitosan-PVA immersed in the same hydroalcoholic solution of propolis have no antimicrobial activity against the same microorganism. None of the studied samples exhibited activity against *E. coli* and *P. aeruginosa*.

1. Introducción

El empleo de productos naturales ha constituido durante siglos una fuente de remedios y métodos terapéuticos para el hombre. Por ello en la actualidad persiste el uso de plantas medicinales. El Perú cuenta con una abundante flora con numerosas especies vegetales que poseen propiedades curativas. A lo largo de los años se han realizado diversos estudios para determinar las propiedades antimicrobianas de estos productos naturales, estudiando sus componentes y el efecto de los mismos frente a los microorganismos patógenos.

Desde hace unos años estamos desarrollando películas de quitosano-alcohol polivinílico (PVA), obtenidas por radiación gamma, conteniendo extractos de productos naturales para evaluar su eficiencia como materiales para el tratamiento de heridas y úlceras. En un estudio previo se ha observado que las propiedades antimicrobianas de la sangre de grado, *Croton lechleri*, se potencian cuando se encuentran dentro de películas de quitosano-PVA [1]. En efecto, el látex puro presenta actividad contra *S. aureus* pero una

película de quitosano-PVA embebida con una solución hidroalcohólica diluida exhibe la misma actividad frente a esa bacteria. Esto es muy importante si se tiene en cuenta que el látex puro es tóxico. Además, la capacidad cicatrizante *in vivo* de las películas embebidas es mayor a la del látex de sangre de grado [2].

Dentro de los productos naturales de importancia biológica se encuentra el propóleo, una sustancia resinosa, gomosa y balsámica, que las abejas obtienen a partir de las yemas y cortezas de algunos árboles. Es utilizada para recubrir las paredes de las colmenas y mantenerlas libres de bacterias, hongos y animales invasores. En otras palabras taponan herméticamente las colmenas. Ha sido utilizada desde hace más de 3000 años por los egipcios y griegos. También fue aplicado por los incas en los cuadros de infecciones febriles y por los franceses en el tratamiento de heridas.

Estudios recientes demuestran el potencial uso del propóleo en medicina, biología y veterinaria por sus propiedades cicatrizantes,

* Correspondencia autor: jsantiago@ipen.gob.pe

antibacterianas, antiinflamatorias, antivirales, y ligeramente analgésicas [3].

La actividad antimicrobiana del propóleo es atribuida a su acción sobre la membrana citoplasmática e inhibición de la motilidad bacteriana y actividad enzimática [4,5]. Se cree que los flavonoides pinocembrina, galangina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato y el *p*-cumarato benílico actúan sinérgicamente para que el propóleo exhiba la actividad antimicrobiana [6-9]. El ácido cafeico es uno de los compuestos que intervienen en la actividad del propóleo contra *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Helminthosporium sp.* Otras bacterias que son sensibles al propóleo son el *Streptococcus mutans* una de las causantes de la caries dental, el *Bacillus cereus* bar Micoydes, implicado en intoxicaciones alimentarias, *Pseudomonas aeruginosa* presente en las llagas o ulceraciones de personas postradas y *Klebsiella pneumoniae*, otra bacteria resistente a los antibióticos [10,11]. Sin embargo, se han reportado algunos casos de alergia producida por contacto con propóleo [12-14].

En el presente trabajo se evalúan las propiedades antimicrobianas de un extracto etanólico de propóleo y de una película de quitosano-alcohol polivinílico conteniendo dicho extracto.

2. Experimental

Material biológico

Propóleo fue obtenido de apiarios de *Apis mellifera* procedente de Ayacucho - Perú. Las cepas bacterianas utilizadas fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Extracto etanólico de propóleo

Se pesó 20 g de propóleo en bruto y se añadió 200 mL de alcohol de 96°. Se agitó por 1 hora y se dejó incubando en estufa a 37 °C. Al día siguiente y durante 7 días, se agitó por media hora. Luego se colocó el frasco en la nevera por 4 horas y se filtró. El filtrado se dejó evaporar a temperatura ambiente, se centrifugó para eliminar restos de cera y se almacenó en un frasco de vidrio ámbar tapa rosca.

Preparación de hidrogeles de quitosano-PVA conteniendo propóleo

Se prepararon una solución de quitosano al 1 % en ácido acético 0,1M y una solución acuosa de PVA al 10 %. Se mezclaron estas soluciones en una proporción de 4:6 (quitosano/PVA), se dispensaron en placas petri y se empacaron en bolsas de polietileno para ser irradiadas a 15 kGy [15]. Luego, las películas fueron enjuagadas con agua destilada y secadas a temperatura ambiente durante cuatro días.

Los hidrogeles fueron cortados en dimensiones de 3x4 cm, embebidos en una solución acuosa, hidroalcohólica 1:1 e hidroalcohólica 1:10 de propóleo por 20 minutos. Luego de ser secadas, se cortaron discos de 10 mm de diámetro para su evaluación microbiológica (actividad antimicrobiana). La solución hidroalcohólica fue preparada tomando 1 mL del extracto etanólico de propóleo y diluyéndolo a 10 mL con una solución hidroalcohólica al 10 %.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

El método utilizado para las pruebas en películas fue de difusión en agar de Kirby-Bauer [16, 17]. Se incubaron las placas con agar Muller Hinton a 37 °C por 24 h antes de su uso. El inóculo (preparado a una turbidez equivalente a 0,5 de la escala de Mac Farland) fue aplicado sobre la placa con la ayuda de una torunda estéril, cubriendo totalmente la superficie de la placa sin dejar una zona libre. Se dejó secar de 3 a 5 minutos antes de depositar las películas embebidas cortadas en discos de 10 mm de diámetro. Se colocaron los discos sobre el medio sembrado y se añadió por encima de las películas gotitas de agua estéril, para evitar que se arruguen, se incubaron a 37 °C por 24 horas.

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de las soluciones de propóleo se usó la técnica de excavación placa cultivo. Se excavaron hoyos de 10 mm de diámetro en el medio de cultivo sembrado y se adicionó 50 µL de la solución a estudiar. Se incubaron las placas a 37 °C por 24 horas. Como control positivo se utilizó una solución del desinfectante tego.

3. Resultados y Discusión

La extracción etanólica del propóleo bruto permitió la obtención de un líquido amarillo oscuro turbio. La mezcla obtenida fue

filtrada, separándose un sólido ceroso (retenido en el papel filtro) y un filtrado amarillo, Figura 1. El espectro UV-visible del extracto de propóleo, diluido en isopropanol (0,5 mL en 30 mL), presentó tres zonas de absorción, con máximos de absorción a 221, 270, 287, 330 y 429 nm, Figura 2. La zona del espectro entre 250 y 400 nm es similar al espectro encontrado para una muestra de propóleo de la zona de la Patagonia Norte, en Argentina, excepto por la presencia de la banda 271 nm, Figura 3 [18]. En esta referencia, los autores correlacionan la forma de esta zona del espectro UV con el contenido de flavonoides de muestras de propóleos de diferentes regiones de Argentina.



Figura 1: a) Propóleo en bruto y b) extracto líquido de propóleo.

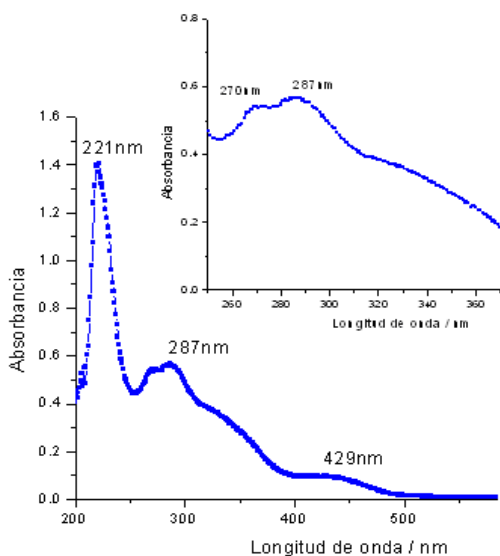


Figura 2: Espectro UV-visible de la solución etanólica de propóleo diluida.

Evaluación de la actividad antimicrobiana

La evaluación de la actividad antimicrobiana de las soluciones hidroalcohólicas (1:10) de propóleo frente a la cepa de *S. aureus* ATCC 25923 muestra un halo con un diámetro de 29mm, Figura 4. Este valor es menor si se compara con la cepa *S. aureus* ATCC6338, 19cm. [19]. El desinfectante teo también

muestra un halo de inhibición, indicando que las condiciones experimentales eran las adecuadas.

En el caso de los hidrogeles de quitosano-PVA embebidos en la solución hidroalcohólica de propóleo no se observa la formación de halos de inhibición frente a ninguna de las tres cepas estudiadas, figura 5. Esto se debe probablemente a que los componentes responsables de la actividad antimicrobiana de esta solución quedan fuertemente adheridos a la membrana, impidiendo su difusión en el medio de cultivo. Este comportamiento es completamente diferente al caso de las soluciones hidroalcohólicas de sangre de grado, en las que las membranas embebidas en dichas soluciones exhibían una mayor actividad antimicrobiana [1].

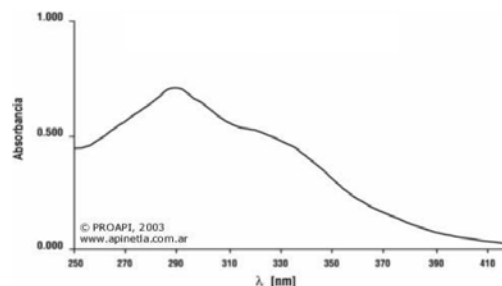


Figura 3: Espectro UV de una solución etanólica de propóleo procedente de la Patagonia Norte [17].

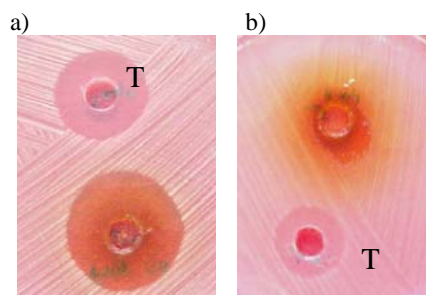


Figura 4: Evaluación de la actividad antimicrobiana de una solución hidroalcohólica 1:10 de propóleo frente a (a) *S. aureus* y (b) *E. coli*, en comparación con el desinfectante teo, T al 1 %.

4. Conclusiones

El extracto etanólico de propóleo presenta actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* ATCC 25923, inclusive cuando se le diluye en una solución hidroalcohólica al 10%. En cambio, las películas de quitosano-PVA embebidas en la misma solución hidroalcohólica de propóleo no muestran ningún halo de inhibición de crecimiento. De otro lado, todas las muestras ensayadas no

presentaron actividad frente a *E. coli* ni *P. aeruginosa*.

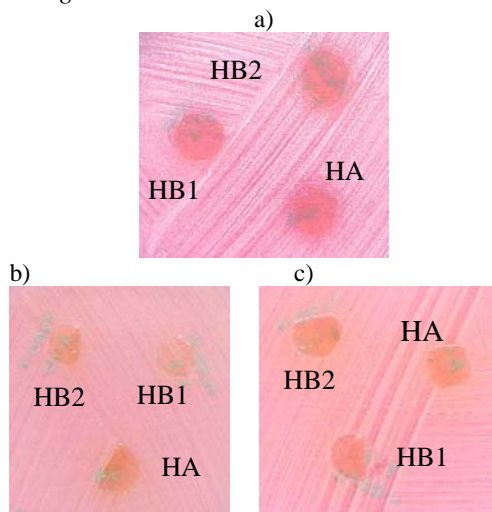


Figura 5: Evaluación de la actividad antimicrobiana de hidrogeles embebidos en una solución acuosa (HA), hidroalcohólica 1:1 (HB1) y 1:10 (HB2), frente a (a) *S. aureus*, (b) *E. coli* y (c) *P. aeruginosa*.

5. Bibliografía

- [1] León K, Santiago J. Propiedades antimicrobianas de películas de quitosano-alcohol polivinílico embebidas en extracto de sangre de grado. *Rev. Soc. Quím. Perú.* 2007; 73:158-165.
- [2] Cortés E, Jayo S. Actividad antioxidante y cicatrizante de una solución hidroalcohólica de *Croton lechleri* (sangre de drago) absorbido en un biopolímero hidrogel de quitosano - PVA. [tesis para optar el grado de Químico Farmacéutico]. Ica: Universidad Nacional San Luis Gonzaga. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2008.
- [3] Bankova V, De Castro S, Marcucci M. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie.* 2000; 31:3-15.
- [4] Mirzoeva O, Grishanin R, Colder P. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effect on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol. Res.* 1997; 152:239-246.
- [5] Drago L, Mombelli B, *et al.* In vitro antimicrobial activity of propolis dry extract. *J. Chemother.* 2000; 12:390-395.
- [6] Burdock G. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.* 1998; 36: 347-363.
- [7] Krol W, Scheller S, Shani J, Pietsz G, Czuba Z. Synergistic effect of ethanolic extract of propolis and antibiotics on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Arzneimittel forschung.* 1993; 43:607-609.
- [8] Stepanovic S, Antic N, *et al.* In vitro antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol. Res.* 2003; 158:353-57.
- [9] Santos F, Bastos E, Uzeda M, *et al.* Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J. Ethnopharm.* 2002; 80:1-7.
- [10] Hegazi A, Abd El Hady F, Abd Allah F. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z. Naturforsch. [C].* 2000; 55:70-75.
- [11] Tolosa L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica.* 2002; 43:37-55.
- [12] Callejo A, Armentia A, *et al.* Propolis, a new bee-related allergen. *Allergy.* 2001; 56:579.
- [13] Henschel R, Agathos M, Breit R. Occupational contact dermatitis from propolis, *Contact Dermatitis.* 2002; 47:52.
- [14] Lasa O, Gorrotxategi P, *et al.* Dermatitis alérgica de contacto por propóleo, *Med. Cutan. Iber. Latin Am.* 2006; 34: 117-119.
- [15] Carhuapoma W, Santiago J. Preparación de hidrogeles de quitosano-PVA por radiación gamma, *Rev. Soc. Quím. Perú.* 2005; 71:185-192.
- [16] Lalitha MK. Manual on Antimicrobial Susceptibility Testing. [monografía en Internet]. Christian Medical College. Vellore, Tamil Nadu. India. Disponible en: <http://www.ijmm.org/documents/Antimicrobial.doc>
- [17] National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1975). *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*; Approved Standard M2-A7 ASM-2. NCCLS, Villanova, PA.
- [18] Bedascarrasbure E, Maldonado L, Alvarez A, Rodríguez E. Contenido de flavonoides en propóleos argentinos. [monografía en Internet]. ApiNetLA: Red Apícola Latinoamericana. Disponible en: <http://www.apinetla.com.ar>
- [19] Delgado M, Quijano E, Pérez I, Quintero E, Catzín G. Actividad antimicrobiana del propóleo recolectado por *Apis mellifera* y *Melipona beecheii* B. en el estado de Yucatán. [monografía en Internet]. Disponible en: http://www.mexicoapicola.org/contenido/Actividad%20Antimicrobiana_Delgado.pdf