

## Comunicación corta

# Actividad antibacteriana de un extracto acuoso de propóleo del municipio de Irapuato, Guanajuato, México<sup>1</sup>

## Antibacterial activity of aqueous extract of propolis from Irapuato, Guanajuato, Mexico

Carlos Manuel Bucio-Villalobos<sup>2</sup>, Oscar Alejandro Martínez-Jaime<sup>3</sup>

### RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana de un extracto acuoso de propóleo. En febrero de 2015 se colectó el propóleo en un apiario ubicado en Irapuato, Guanajuato, México. 300 g de propóleo fueron fraccionados y adicionados a 500 ml de etanol al 70%, en agitación continua por quince días. Por filtración al vacío, se separó la fase líquida, y el etanol contenido en ella fue evaporado en un rotoevaporador accionado a noventa revoluciones por minuto (rpm) y 80 °C. El residuo final fue resuspendido en agua destilada, obteniéndose así el extracto acuoso. Un extracto de propóleo obtenido con etanol concentrado fue utilizado como control de referencia, además se incluyeron controles de etanol y agua. La actividad antibacteriana de los extractos fue evaluada mediante la técnica de difusión en agar, utilizando cepas de *Escherichia coli* (ATCC-10536), *Salmonella typhimurium* (ATCC-13311), *Listeria monocytogenes* (ATCC-19115) y *Staphylococcus aureus* (ATCC-11632), desarrolladas en tripticaseína-soya-agar, incubadas a 37 °C por veinticuatro horas (h) y se midió el halo de inhibición al término de dicho tiempo. Solo el extracto etanólico usado como control tuvo actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *L. monocytogenes*, más no se encontró respuesta para *E. coli* y *S. typhimurium*. El extracto acuoso no tuvo efecto sobre ninguna de las cuatro bacterias evaluadas, concluyéndose que los ingredientes activos del propóleo no son solubles en agua, por lo que se pierden en un proceso de extracción acuosa.

**Palabras clave:** *Apis mellifera*, propóleo mexicano, actividad antimicrobiana.

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antibacterial activity of an aqueous extract of propolis. In February 2015, the propolis was collected in an apiary located in Irapuato, Guanajuato, Mexico. 300 g of propolis were fractionated and added to 500 ml of an ethanol solution 70%, in continuous stirring for fifteen days. The liquid phase was separated by vacuum filtration, the ethanol of that phase was evaporated in a rotoevaporator driven at 90 revolutions per minute (rpm) and 80 °C. The final residue was resuspended in distilled water, thereby obtaining the aqueous extract. A propolis extract obtained with concentrated ethanol was used as a reference control, in addition, ethanol and water controls were included. The antibacterial activity of the extracts was evaluated by diffusion technique in agar, using strains of *Escherichia coli* (ATCC-10536), *Salmonella typhimurium* (ATCC-13311), *Listeria monocytogenes* (ATCC-19115) and *Staphylococcus aureus* (ATCC-11632) developed in Tryptic-Soy-Agar. After being incubated the bacteria at 37 °C for 24 hours (h), and the halo of inhibition was measured. Only in the ethanol extract used as a control, was observed antimicrobial activity against *S. aureus* and *L. monocytogenes*; for *E. coli* and *S. typhimurium* was not observed any effect. The aqueous extract had no effect on any of the four bacteria evaluated, concluding that the active ingredients of propolis are not soluble in water, so are lost in a process of aqueous extraction.

**Keyword:** *Apis mellifera*, mexican propolis, antimicrobial activity.

<sup>1</sup> Recibido: 24 de mayo, 2016. Aceptado: 18 de julio, 2016. Este trabajo fue financiado durante la décima primera convocatoria para investigadores en formación de la Universidad De La Salle Bajío, México.

<sup>2</sup> Universidad de La Salle. Bajío, Av. Universidad 602, Col. Lomas del Campestre, C.P. 37150, León, Guanajuato, México. buciovillalobos@yahoo.com.mx

<sup>3</sup> Universidad de Guanajuato. Km. 9 carretera Irapuato-Silao, C.P. 36821, Irapuato, Guanajuato, México. oscarja@ugto.mx



## INTRODUCCIÓN

Al propóleo recolectado por las abejas domésticas (*Apis mellifera*) se le atribuyen efectos benéficos sobre la salud humana, por contar con propiedades biocidas contra bacterias (Londono et al., 2010; Bankova et al., 2014; Osés et al., 2016), hongos (Bankova et al., 2014; Sotero et al., 2015; Osés et al., 2016), protozoos (Nina et al., 2016a) y virus (González et al., 2015; Yildirim et al., 2016). Además, ha sido reportada su acción antiinflamatoria, antioxidante (Bilgin et al., 2016; Osés et al., 2016) y anticancerígena (Bankova et al., 2014).

Desde la época de los antiguos griegos, romanos y egipcios se usaba el propóleo con fines medicinales (Kuropatnicki et al., 2013), siendo en la actualidad una práctica que permanece dentro de la medicina alternativa para curar enfermedades infecciosas de tipo bacteriano.

Dada sus propiedades antimicrobianas, el propóleo ha sido objeto de innumerables estudios donde se ha evaluado el efecto inhibitorio sobre bacterias tales como *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescencia*, *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *Streptococcus agalactiae*, *S. mutans*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, *Pantoea agglomerans*, *Vibrio cholerae*, entre otras (Heon et al., 2008; Londono et al., 2010; Carrillo et al., 2011; Kim y Chung, 2011; Gavanji et al., 2012; Siripatrawan et al., 2013; Osés et al., 2016), donde los resultados han sido variables aun tratándose del mismo microorganismo.

Respecto a la composición química de los propóleos, numerosas investigaciones han demostrado su complejidad, se reportan más de trescientos diferentes constituyentes químicos, tales como polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres), terpenoides, esteroides, aminoácidos, etc. (Li et al., 2016); se considera a los flavonoides, ácidos aromáticos, diterpenoides y compuestos fenólicos como los principales constituyentes químicos responsables de las propiedades biológicas del propóleo (Siripatrawan et al., 2013).

Debido a su constitución química, el propóleo tiene en general un sabor amargo y astringente, desagradable al gusto de los consumidores, en especial en los niños, incrementándose su rechazo cuando

sus extractos están basados en solventes como el etanol. Disfrazar su sabor ha sido el objetivo de algunos investigadores, proponiendo mezclas con otros ingredientes tales como la miel de abeja (Osés et al., 2016), o bien realizando extractos acuosos en lugar de los tradicionales etanólicos, buscando en todo caso que las propiedades antimicrobianas no se pierdan. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana de un extracto acuoso de propóleo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron 300 g de propóleo en febrero de 2015, en un apiario ubicado en el municipio de Irapuato, Guanajuato, México. Dicha cantidad fue fraccionada en pequeños trozos para facilitar la extracción y adición a 500 ml de etanol al 70%, donde se mantuvo en agitación continua por quince días. Utilizando papel filtro Whatman No. 1 se separó la fase superior líquida por medio de filtración al vacío, para eliminar con ello los sólidos incluidos. El etanol contenido en dicha fase fue evaporado en un rotoevaporador accionado a 90 rpm y 80 °C. El extracto blando final fue resuspendido con agua destilada, obteniéndose así el extracto acuoso. Tintura de propóleo, obtenida con etanol concentrado al 96%, fue utilizada como tratamiento de referencia (extracto etanólico), agregando además controles de etanol y agua.

La actividad antibacteriana del extracto de propóleo fue evaluada mediante la técnica de difusión en agar. Para ello fueron utilizadas cepas de *Escherichia coli* (ATCC-10536), *Salmonella typhimurium* (ATCC-13311), *Listeria monocytogenes* (ATCC-19115) y *Staphylococcus aureus* (ATCC-11632), las cuales fueron escogidas por ser contaminantes comúnmente encontrados en productos alimenticios y por constituir importantes microorganismos patógenos de humanos y animales. Células bacterianas tomadas de colonias de 24 h de edad fueron llevadas a una concentración de  $10^8$  células/ml. 200  $\mu$ l de la suspensión fueron agregados a 30 ml del medio de cultivo de tripticaseina-soya-agar, previamente esterilizado y enfriado, para inmediatamente ser vaciado a una caja de Petri. Una vez que el medio de cultivo solidificó, se hicieron cinco pozos de 6 mm de diámetro, en cada uno de los cuales se colocaron 40  $\mu$ l de los extractos de propóleo o de los controles de etanol y agua. Las cajas de Petri

fueron colocadas a 4 °C durante 12 h para permitir la difusión del extracto en el medio de cultivo, y después se incubaron a 37 °C por 24 h, tomando al término de dicho tiempo el diámetro en centímetros del halo de inhibición como variable a evaluar (Siripatrawan et al., 2013). Los tratamientos (extracto acuoso, extracto etanólico, control con etanol y control con agua) fueron arreglados en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones. La unidad experimental consistió en una caja de Petri.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El etanol fue utilizado como un tratamiento de control, en el cual no se observó ningún efecto inhibitorio sobre las bacterias evaluadas, por lo tanto, al presentarse un halo de inhibición cuando se utilizó el extracto etanólico, dicho efecto fue atribuido a los componentes del propóleo y no al etanol utilizado en su extracción. De igual manera, se utilizó otro tratamiento de control con agua para ser comparado con el extracto acuoso, con resultados similares a los observados con el control etanólico.

El extracto acuoso de propóleo no tuvo efecto sobre ninguna de las cuatro bacterias evaluadas. En un estudio con extractos acuosos, se encontró que los compuestos fenólicos activos del propóleo disminuyeron conforme aumentó el porcentaje de agua en la extracción, por lo que finalmente los extractos etanólicos resultaron más eficientes en su capacidad antimicrobiana contra las bacterias evaluadas, entre las que se encontraron *S. aureus*, *E. coli* y una especie de *Salmonella*, de las cuales *E. coli* no mostró inhibición (Siripatrawan et al., 2013), coincidiendo con lo encontrado en el presente estudio. Igualmente Kim et al. (2005) y Carrillo et al. (2011) reportaron que aunque los extractos acuosos de propóleos mostraron cierta actividad antibacteriana, fueron los extractos etanólicos los que resultaron con una mayor actividad inhibitoria, concluyendo que estos últimos son más efectivos que los primeros, bajo la suposición de que los principales componentes biofuncionales raramente son solubles en agua.

Se utilizó el extracto etanólico por ser la práctica tradicional que los apicultores realizan cuando hacen sus extractos de propóleo (tratamiento de referencia), el cual inhibió el crecimiento de solo dos especies

bacterianas, con un halo de inhibición de 1,6 cm para *S. aureus* y de 1,7 cm para *L. monocytogenes*; mientras que *E. coli* y *S. typhimurium* no fueron inhibidas. Dicha actividad inhibitoria fue medida basándose en la presencia de una zona bien definida alrededor del pozo donde se colocó el propóleo.

Varios investigadores han obtenido una alta actividad antibacteriana del propóleo contra bacterias Gram-positivas en comparación a las bacterias Gram-negativas (Mavri et al., 2012; Serra y Lacalle, 2012; Siripatrawan et al., 2013). *S. aureus* y *L. monocytogenes*, que en el presente estudio resultaron inhibidas por el extracto etanólico de propóleo, son bacterias Gram-positivas, mientras que *E. coli* y *S. typhimurium* son Gram-negativas, las dos primeras resultaron bacterias susceptibles al extracto etanólico de propóleo, en comparación de las dos últimas que fueron resistentes, lo que coincide con lo reportado por Kim y Chung (2011), quienes trabajando con las mismas cuatro especies procarióticas llegaron a resultados similares; otros estudios también son coincidentes al encontrar mayor susceptibilidad para *S. aureus* que para *E. coli* (Rahman et al., 2010; Carrillo et al., 2011). Sin embargo, también hay reportes con resultados opuestos a los obtenidos en este ensayo, ya que se han determinado extractos de propóleo que no mostraron efecto contra *S. aureus* pero sí inhibieron a *E. coli* (Gavanji et al., 2012); incluso en otro estudio se indicó que la actividad antimicrobiana fue elevada en contra de bacterias Gram-negativas (*Salmonella*) de un extracto obtenido en España, (Serra y Lacalle, 2012); también se ha observado un efecto inhibitorio de varios propóleos contra *S. typhimurium* (Choi et al., 2006). Esto indica que aunque parece haber una tendencia de los propóleos a tener mayor actividad inhibitoria contra bacterias Gram-positivas, esto está también influenciado por el origen botánico de los mismos, lo que obliga a realizar estudios regionalizados.

Ha sido ampliamente estudiado que las propiedades biológicas de los propóleos dependen de su respectiva composición química, la cual resulta variable, ya que depende de la flora local disponible de la región donde las abejas se encuentren (Aliboni, 2014). En este contexto, Yang et al. (2016) realizaron estudios donde concluyeron que existe una respuesta diferencial en la actividad antioxidante de diferentes polifenoles aislados de propóleos colectados en diez diferentes regiones de China; similarmente se encontró una

diferencia significativa de los tipos de fenoles totales y de los flavonoides en particular, en diez muestras de propóleos de Bolivia (Nina et al., 2016b), entre otras muchas investigaciones realizadas en este sentido. Considerando este trabajo como una investigación preliminar, se recomienda realizar futuros estudios que involucren las propiedades biológicas y constitución química del propóleo producido en esta zona apícola del estado de Guanajuato, México, y su correlación con el tipo de flora presente, dado que existe limitada información al respecto, aun tratándose de una importante región apícola mexicana; además, dichos estudios deben abarcar diferentes épocas del año, dado que la flora local cambia con el tiempo.

## LITERATURA CITADA

- Aliboni, A. 2014. Propolis from northern California and Oregon: chemical composition, botanical origin, and content of allergens. *Z. Naturforsch. C. Bio. Sci.* 69:10-20.
- Bankova, V., M. Popova, and B. Trusheva. 2014. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chem. Cent. J.* 8:28. doi:10.1186/1752-153X-8-28
- Bilgin, G., K. Kismet, S. Kuru, F. Kaya, M. Senes, Y. Bayrakceken, N. Yumusak, F.T. Celikkan, E. Erdemli, O.G. Celemlı, K. Sorkun, and G. Koca. 2016. Ultrastructural investigation of the protective effects of propolis on bleomycin induced pulmonary fibrosis. *Biotech. Histochem.* 91:195-203.
- Carrillo, M.L., L.N. Castillo, y R. Mauricio. 2011. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de la Huasteca Potosina (México). *Inf. Tecnol.* 22:21-28.
- Choi, Y.M., D.O. Noh, S.Y. Cho, H.J. Suh, K.M. Kim, and J.M. Kim. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT Food Sci. Technol.* 39:756-761.
- Gavanji, S., B. Larki, A.J. Zand, E. Mohammadi, M. Mehrasa, and A.H. Taraghian. 2012. Comparative effects of propolis of honey bee on pathogenic bacteria. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 6:2408-2412.
- González, M.J., M.L. Juárez, H. Ramírez, C.I. Soto, L. Carrillo, and T.A. Cruz. 2015. Protective effect of a mexican propolis on MDBK cells exposed to Aujeszky's disease virus (*Pseudorabies virus*). *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 12:106-111.
- Heon, K.P., K. Sang, and S. Chang. 2008. Antimicrobial activity of water soluble propolis. *Korean J. Food Nutr.* 21:15-21.
- Kim, Y.H., and H.J. Chung. 2011. The effects of Korean propolis against foodborne pathogens and transmission electron microscopic examination. *New Biotechnol.* 28:713-718.
- Kim, K.T., E.J. Yeo, Y.S. Han, S.Y. Nah, and H.D. Paik. 2005. Antimicrobial, anti-inflammatory, and anti-oxidative effects of water and ethanol extracted Brazilian propolis. *Food Sci. Biotechnol.* 14:474-478.
- Kuropatnicki, A.K., E. Szliszka, and W. Krol. 2013. Historical aspects of propolis research in modern times. *J. Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2013:1-11.
- Li, A., H. Xuan, A. Sun, R. Liu, and J. Cui. 2016. Preparative separation of polyphenols from water-soluble fraction of Chinese propolis using macroporous absorptive resin coupled with preparative high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 1012:42-49.
- Londono, O.A., J.G. Ávila, M.M. Canales, C.T. Hernández, P.R. Serrano, C.M. Flores, A. Durán, J.G. Penieres, C.G. García, and T.A. Cruz. 2010. Antibacterial comparative study between extracts of Mexican propolis and of three plants which use *Apis mellifera* for its production. *J. Anim. Vet. Adv.* 9:1250-1254.
- Mavri, A., H. Abramovic, T. Polak, J. Bertoneclj, P. Jamnik, S. Smole, and B. Jersek. 2012. Chemical properties and antioxidant and antimicrobial activities of Slovenian propolis. *Chem. Biodivers.* 9:1545-1558.
- Nina, N., B. Lima, G.E. Feresin, A. Giménez, E. Salamanca, and G. Schmeda. 2016a. Antibacterial and leishmanicidal activity of Bolivian propolis. *Lett. Appl. Microbiol.* 62:290-296.
- Nina, N., C. Quispe, F. Jiménez, C. Theoduloz, A. Giménez, and G. Schmeda. 2016b. Chemical profiling and antioxidant activity of Bolivian propolis. *J. Sci. Food Agr.* 96:2142-2153.
- Osés, S.M., A. Pascual, M.A. Fernández, T.M. López, and M.T. Sancho. 2016. Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chem.* 196:1215-1223.
- Rahman, M.M., A. Richardson, and M. Sofian. 2010. Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 4:1872-1878.

- Serra, B.J., and A. Lacalle. 2012. The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28:1351-1358.
- Sotero, A.B., L. Rodrigues, R.K. Barroso, R.R. Batista, S. Abreu, R. Fernández, and B.C. Vasconcelos. 2015. Antifungal activity of propolis against *Candida* species isolated from cases of chronic periodontitis. *Braz. Oral Res.* 29:1-6.
- Siripatrawan, U., W. Vitchayakitti, and R. Sanguandeeikul. 2013. Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution. *Int. J. Food Sci. Tech.* 48:22-27.
- Yang, H., Z. Huang, Y. Chen, C. Zhang, M. Ye, and L. Wang. 2016. Evaluation of the contributions of polyphenols in Chinese propolis by on-line HPLC-ABTS method. *Eur. Food Res. Technol.* 242:537-546.
- Yildirim, A., G.G. Duran, N. Duran, K. Jenedi, B.S. Bolgul, M. Miraloglu, and M. Muz. 2016. Antiviral activity of hatay propolis against replication of herpes simplex virus type 1 and type 2. *Med. Sci. Monit.* 22:422-430.

