

Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo sobre una cepa clínica de *Staphylococcus aureus*

Antibacterial activity *in vitro* of ethanolic extract of propolis on a clinical strain of *Staphylococcus aureus*

Judith Principal¹, Carlos Barrios¹, Nancy Thaís Pacheco², Fanny Corrales³ y Frank Moreno⁴

¹Estación de Apicultura. Decanato de Ciencias Veterinarias. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado".

²Laboratorio de Microbiología e Inmunología. Decanato de Ciencias Veterinarias. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". ^{3,4} U.E. Colegio "María Santísima"

Recibido: 20-10-05

Aprobado: 08-12-05

RESUMEN

Este estudio se realizó para evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de propóleo al 20% y 40% sobre una cepa de origen canino de *Staphylococcus aureus* perteneciente al Laboratorio de Microbiología e Inmunología del DCV de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" UCLA y comparar su efecto con antibióticos comerciales. El propóleo fue colectado usando mallas de polietileno colocadas en las colonias de *Apis mellifera scutellata* de la Estación de Apicultura de la misma Institución, con el objeto de preparar los extractos alcohólicos al 20% y 40%. La cepa clínica de *S. aureus* N° 7695, aislada de un canino Terrier con diagnósticos de pioderma facial y otitis externa; fue inoculada en tres placas de Agar Müeller-Hintom en las cuales fueron depositados discos impregnados con 10 µl de las soluciones alcohólicas de propóleo al 20% y 40% y un tercer disco control de solución alcohólica sin propóleo respectivamente. Un estudio de sensibilidad antimicrobiana *in vitro* fue realizado utilizando la técnica de difusión por discos con los extractos de propóleo ya descritos y discos de antibióticos comerciales de Neomicina 30 µg, Enrofloxacin 5 µg y Penicilina 10 U.I. El criterio de evaluación de la actividad antimicrobiana del propóleo se basó en la medición en mm del diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza de una sola vía y prueba de Duncan para comparar las medias entre los tratamientos. Los resultados revelaron que la solución alcohólica de propóleo al 40% tiene actividad antibacteriana sobre la cepa de *S. aureus* comparado con el control; siendo su efecto antimicrobiano moderado en comparación con los antibióticos comerciales usados en este estudio.

Palabras Clave: Propóleo, *Staphylococcus aureus*, abejas, actividad antibacteriana, canino.

ABSTRACT

This study was done to evaluate the antibacterial activity of ethanolic extract of propolis at 20% and 40% on a canine clinical strain of *Staphylococcus aureus* belonging to the Microbiology and Immunology Lab of the Veterinarian School of the Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" UCLA and to compare its effect to commercial antibiotics. The propolis was collected using polyethylene traps inside the colonies of *Apis mellifera scutellata* from the Apicultural Station at UCLA with the purpose to prepare the ethanolic extract of propolis at 20% and 40% respectively. The canine clinical strain of *S. aureus* number 7695, isolated from a Terrier with external otitis and facial pyoderm. These colonies were standardized and inoculated into three Petri dishes with Müeller-Hintom Agar to which were deposited discs embedded with 10 µl of the alcoholic solution of propolis at 20% and 40% respectively. A control disc with alcoholic solution without propolis was prepared as a control treatment. A sensibility microbial test was done *in vitro* by diffusion technique with discs using the ethanolic extracts of propolis as well as the discs with the commercial antibiotics such as Neomicin 30 µg, Enrofloxacin 5 µg, and Penicilin 10 U.I. The evaluation criteria of the antimicrobial activity of the propolis taked into account the measurements in mm of the diameter of the inhibitory zone. Data were analyzed using one way ANOVA and the Duncan tests to compare the means between treatments. The results revealed that alcoholic solution of propolis at 40% had antibacterial activity on *S. aureus* compared to control treatment. Its antimicrobial effect was moderate compared to the commercial antibiotics used in this study.

Key Words: Propolis, *Staphylococcus aureus*, bees, antibacterial activity, canine.

INTRODUCCIÓN

El propóleo es una resina de color verdoso-amarillento parduzco recolectada por las abejas obreras de las yemas jóvenes de algunas especies de árboles. Este producto es usado por las abejas como sustancia cemento para tapan las grietas en el interior de la colmena, para barnizar sus paredes y dar mayor soporte a la estructura de los panales, así como para embalsamar enemigos naturales y cadáveres que por su gran tamaño las abejas se ven imposibilitadas de sacar fuera de la colmena; o cuando ocurre un brote de enfermedades infecto-contagiosas que ponga en peligro la supervivencia de la colonia. En el proceso de recolección, transporte y almacenaje del propóleo, las abejas le adicionan compuestos enzimáticos que le confieren propiedades terapéuticas invalorables tanto para la medicina humana como veterinaria.

Diversos autores han reportado en el propóleo, la presencia de compuestos flavonoides, ésteres del ácido caféico y ácidos diterpénicos (Moreno *et al.* 1999; ABD EL Hady & Hegazy, 1994, 2002; Amoros *et al.* 1992, 1994; Bankova *et al.* 1996, 2002) los cuales son responsables de las propiedades bacteriostáticas, bactericidas, antivirales y fungicidas de este producto de la colmena, ampliamente documentadas tanto *in vivo* como *in vitro*.

El propóleo ha sido usado en medicina desde tiempos muy remotos, especialmente por sus propiedades antimicrobianas (Miorín *et al.* 2003). Sin embargo, algunos autores han reportado la existencia de variaciones significativas de estas propiedades, según la zona de origen donde ha sido colectada esta resina (ABD EL Hady & Hegazy, 2002) y la concentración del extracto de propóleo (Bankova *et al.* 2002).

La bacteria *Staphylococcus aureus* representa una de las especies bacterianas patógenas de mayor importancia en la práctica clínica de pequeños animales. Los integrantes de este género bacteriano considerados como bacterias comensales de piel y mucosas en los animales y en el hombre; son clasificados de acuerdo a su potencial de virulencia en dos grandes grupos: *Staphylococcus* no productores de la enzima coagulasa denominados como coagulasa negativos (Ej: *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* entre otros) y los *Staphylococcus* coagulasa positivos (Ej: *S. aureus*, *S. intermedius* y *S. hyicus*) de acuerdo con Roberts *et al.* 2005)

Las infecciones piogénicas de piel conocidos como Piodermas en los caninos, son producidas en mas del 60 % de los casos por especies de *Staphylococcus* coagulasa positiva (Birchard & Sherding, 2001; Greene, 1993; Roberts *et al.* 2005) específicamente por las especies *S. aureus* y *S. intermedius*, los cuales se

consideran organismos iniciadores de estas patologías con tendencia al desarrollo de piodermas crónicas, recurrentes, profundos y predisponentes a la infección secundaria bacteriana en especial por *Pseudomonas spp*, *Proteus spp* y *E. coli*.

En caninos y en los humanos el *S. aureus*, es considerado un agente etiológico importante en las infecciones dérmicas superficiales y profundas, siendo una de sus principales características la resistencia ante los antibióticos usados con frecuencia para controlarlas, tales como: la penicilina, terramicina y la estreptomocina. De igual manera, ha sido señalado por algunos autores (Roberts *et al.* 2005) que algunas mascotas en especial los caninos, son considerados reservorios de especies bacterianas ampliamente resistentes a los antibióticos como el *S. aureus*. En virtud de los diversos reportes de resistencia antimicrobiana que presenta esta bacteria, se propone la utilización de formulas terapéuticas naturales basadas en el propóleo a diferentes concentraciones, como producto natural generado en la colmena. Por lo tanto, el propósito de este trabajo es evaluar la acción antibacteriana de dos concentraciones de un bio-preparado de propóleo en el control de un aislado clínico de *S. aureus* proveniente de un canino con lesiones de pioderma facial superficial y otitis externa, y comparar su efecto con antibióticos comerciales con la finalidad de investigar y profundizar un poco más sobre las propiedades antimicrobianas de este producto de la colmena y su posible aplicación en la medicina veterinaria y humana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo fue realizado en los Laboratorios de la Estación de Apicultura y del área de Microbiología e Inmunología del Decanato de Ciencias Veterinarias de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, las muestras de propóleo fueron colectadas de las colonias de abejas en los apiarios de la Estación de Apicultura y los bio-preparados fueron elaborados según la metodología de Peschanskii (1973).

El propóleo usado para elaborar los bio-preparados fue obtenido en mallas tipo mosquito, de plástico, con dimensiones de 45 cm de largo por 55 cm de ancho, las cuales fueron colocadas durante 30 días, una en cada colmena que conforman los apiarios de la Estación de Apicultura de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Para obtener el peso real del propóleo, se procedió a comparar el peso de la malla al momento de instalarla con respecto al peso de la malla cubierta de propóleo una vez cosechado de la colmena, por diferencia se obtuvo el peso neto del propóleo a ser utilizado como materia prima para la elaboración de las tinturas; este peso promedio oscilo

en 40 g/malla/colmena. Las mallas con propóleo fueron retiradas de las colonias e introducidas en bolsas de polietileno y transportadas en cavas con hielo hasta El Laboratorio de Apicultura donde fueron congeladas a -4°C por 48h.

El propóleo fue retirado de las mallas congeladas usando la técnica de frotación manual, para luego proceder a preparar dos soluciones de propóleo, una al 20% y otra al 40%. Para ello, se maceró por 30 min en un mortero de porcelana 20 g y 40 g de propóleo respectivamente, al cual se le adicionó 100 cc de etanol al 96%, se filtró con gasa quirúrgica y el filtrado se colocó en un frasco color ámbar en un lugar oscuro a una temperatura de 27 °C por 7 días hasta el momento de su utilización

El microorganismo seleccionado para el estudio corresponde a un aislado clínico de *S. aureus* cepa N° 7695 perteneciente a la colección de bacterias del Laboratorio de Diagnóstico del Área de Microbiología e Inmunología del Decanato de Ciencias Veterinarias. Dicha cepa fue aislada a partir de la secreción purulenta de un canino macho, raza Terrier, de 2 años con diagnóstico de Pioderma facial y otitis externa ingresado al Hospital Veterinario "Humberto Ramírez Daza" del Decanato de Ciencias Veterinarias de la UCLA, y conservada en refrigeración a 4°C en tubos de Agar nutritivo (BBL™). La identificación de la especie *S. aureus* fue realizada siguiendo los esquemas bioquímicos de clasificación taxonómica para bacterias de importancia clínica y siendo consideradas las características morfológicas y afinidad tintorial de la bacteria a la tinción de Gram, morfología colonial en placas y patrones de hemólisis de agar sangre (Oxoid Limited), fermentación del manitol, (Oxoid Limited) y agar nutritivo (BBL™) y los resultados positivos de las pruebas bioquímicas: catalasa, oxidasa, coagulasa y DNAasa (Carter & Cole 1990, Finegold & Baron, 1993, Mac Faddin, 1980).

Con el objeto de evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto de propóleo; fueron impregnados 9 discos (5 mm) de papel estéril, tres con 10 ml de extracto alcohólico de propóleo al 20%, tres con 10 ml de extracto alcohólico de propóleo al 40% respectivamente, y tres discos con alcohol etílico al 96% sin propóleo como control negativo. Posteriormente, siguiendo la técnica de la Prueba de Difusión por Discos modificada por (Kirby- Bauer, 1996) y normalizada por la OMS en 1976 (Vandepitte et al. 1993); fueron inoculadas tres placas de Agar Müeller-Hintom con el inóculo líquido de *S. aureus* ajustado al patrón de turbiedad de Mc Farland (9×10^8 células/ml) cubriendo toda la superficie, sobre la cual luego de unos minutos fueron colocados los discos previamente preparados con solución de propóleo a

las diferentes concentraciones y el control, procediéndose a incubarlos a 35 °C por 18 h. El criterio de evaluación de la actividad antimicrobiana del propóleo se basó en la medición del diámetro (en mm) del halo de inhibición del crecimiento bacteriano observado para cada uno de los discos.

En un segundo experimento, se comparó el efecto antimicrobiano de los extractos de propóleo al 20% y al 40% con antibióticos comerciales recomendados por su alto efecto bactericida sobre la cepa en estudio. Para ello, se procedió a colocar los discos impregnados con solución alcohólica de propóleo a las concentraciones señaladas, un disco impregnado de solución alcohólica sin propóleo como control negativo y los discos comerciales de Neomicina 30 µg (Sensi Disk™.Becton Dickinson BBL. Made in USA), Enrofloxacin 5 µg (Baytril®. Bayer AG, Leverkusen. Made in England), Penicillin 10 UI/IE/UI (Sensi Disk™.Becton Dickinson BBL. Made in USA); sobre la superficie de las placas de Agar Müeller-Hintom inoculadas con *S. aureus*, siguiendo la técnica ya descrita (Kirby & Bauer, 1996; Vandepitte et al. 1993), cuya interpretación se evaluó siguiendo el mismo criterio de medición de los diámetros (en mm) de los halos de inhibición de crecimiento bacteriano para los cuales se usaron tres réplicas y un control. Después de 18 h de incubación a 35 °C, se midió con una regla el diámetro de los halos de inhibición de crecimiento de *S. aureus* en cada placa y se comparó con los índices de las tablas estandarizadas de inhibición de crecimiento bacteriano, para reportar los resultados en términos: sensible, intermedio y resistente. Los datos colectados fueron analizados mediante un análisis de la varianza de una sola vía, usando la Prueba de Duncan para la comparación de las medias entre los tratamientos aplicados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla I se presentan los resultados del efecto de dos concentraciones de la solución alcohólica de propóleo en un cultivo de *S. aureus* en donde se observa una notoria inhibición del crecimiento de la bacteria en el contorno de los discos impregnados con las soluciones alcohólicas de propóleo, mientras que en los discos impregnados con solución alcohólica sin propóleo no se observó inhibición del crecimiento bacteriano. Estos resultados evidencian la acción antimicrobiana de propóleo en solución alcohólica a través de la inhibición del crecimiento de la bacteria *S. aureus*. Los resultados de esta investigación concuerdan con los obtenidos por (ABD EL Hady & Hegazy, 2002), quienes determinaron la actividad antimicrobiana del propóleo proveniente de tres provincias al Este del Delta del Nilo en Egipto, sobre

los microorganismos *S. aureus*, *Escherichia coli* y *Cándida albicans*. Esos autores reportan que todas las muestras obtenidas de las tres provincias presentaron una evidente inhibición del crecimiento bacteriano y del hongo respectivamente, siendo el propóleo proveniente de la región de Sharkia el que tuvo mayor actividad antimicrobiana contra *S. aureus*. Resultados similares fueron reportados por (Miorín *et al.* 2003; Moreno *et al.* 1999) en Argentina en muestras de extractos etanólicos de propóleos de diferentes regiones fitogeográficas de la República, los cuales presentaron actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas que afectan a los humanos: *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*. Estos autores señalan que todos los extractos etanólicos de propóleo estudiados mostraron actividad antibacteriana sobre las bacterias Gram positivas, no observándose inhibición del crecimiento de las bacterias Gram negativas ensayadas.

Es importante señalar, que la actividad antimicrobiana del propóleo varía según los compuestos químicos presentes en la fuente botánica de donde las abejas colectan el mismo (Bankova *et al.* 2002; Marcucci 1995; Miorín *et al.* 2003) motivo por el cual se hace necesario identificar los diferentes compuestos responsables de la actividad antimicrobiana de cada zona apibotánica y determinar la calidad de este producto de la colmena.

En la Tabla II se ilustra la sensibilidad de las cepas de *S. aureus* con respecto a la solución alcohólica de propóleo usado a dos concentraciones y comparadas con los antibióticos comerciales donde se observa, que el mayor valor en el halo de inhibición del crecimiento bacteriano correspondió a la penicilina como producto comercial con un diámetro promedio de 44,6 mm, mientras que para los extractos de propóleo el mejor tratamiento fue la solución al 40% con un valor promedio en diámetro del halo de inhibición de crecimiento bacteriano de 11,8 mm. Sin embargo, al

analizar los datos estadísticamente, mediante la prueba de Duncan, se observó que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0,0001$) para un $\alpha = 0.05$.

En virtud de los resultados obtenidos en esta investigación y debido a la resistencia generada por los antibióticos comerciales, el uso del propóleo podría considerarse como una alternativa viable y económica para controlar las infecciones cutáneas producidas por esta bacteria, considerando las dificultades terapéuticas presentadas en los tratamientos de los piodermas caninos causados por especies de *Staphylococcus*. La aplicación tópica exclusiva de extractos de propóleo se muestra como una propuesta terapéutica económica y efectiva para el tratamiento de las dermatitis o Piodermas por *Staphylococcus* en caninos.

Dado su efecto antibacteriano *in vitro* y tomando en cuenta otras propiedades curativas atribuibles al propóleo como son la capacidad anti-inflamatorio, anti-ruriginosa y cicatrizante se podría inferir un potencial uso de este producto de la colmena tanto en la medicina veterinaria como humana.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, se concluye que la solución alcohólica de propóleo tiene un efecto antimicrobiano sobre la bacteria *S. aureus* en las concentraciones usadas. El efecto antimicrobiano de la solución alcohólica de propóleo fue moderado con respecto a los antibióticos comerciales usados en este estudio, evidenciado por el tamaño del diámetro en mm del halo de inhibición de crecimiento bacteriano.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar un profundo agradecimiento al personal técnico de los Laboratorios del Área de Microbiología e Inmunología y de La Estación de Apicultura del Decanato de Ciencias

TABLA I: Actividad antimicrobiana del extracto etanólico del propóleo (EEP) sobre *S. aureus*.

	DIAMETROS DE HALOS DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO BACTERIANO (mm)			
	R1	R2	R3	PROMEDIO
EEP 20%	9	8	13	10
EEP 40%	10	11	14	12
Control negativo	**0	0	0	0

** El valor 0 significa que no hubo halo de inhibición del crecimiento bacteriano en el tratamiento control; R1, R2 y R3 significan las réplicas usadas en el ensayo.

TABLA II. Diámetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano (mm) por acción del extracto etanólico de propóleo (eep) en comparación con los antibióticos comerciales.

ANTIBIOTICO	RESISTENTE	INTERMEDIO	SENSIBLE	PROMEDIO
	R1	R2	R3	
Neomicina	25	25	25	25
Enrofloxacina	31	31	32	31,5
Penicilina	45	45	44	44,6
EEP al 20%	9	8	13	10
EEP al 40%	10	11	14	12
Control	**0	0	0	0

** El valor 0 significa que no hubo halo de inhibición del crecimiento bacteriano en el tratamiento control EEP (Extracto Etanólico de Propóleo). R1, R2 Y R3 significan las réplicas usadas en el ensayo.

Veterinarias de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" por todo el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- ABD EL HADY, F.K. & Hegazi, A.G. (2002). Egyptian propolis: 2 Chemical composition, Antiviral and Antimicrobial Activities of East Nile Delta Propolis. *Z. Naturforsch* 57c 38394.
- ABD EL HADY, F.K. & Hegazi, A.G. (1994). Gas Chromatography- Mass spectrometry (GC/MS) study of the Egyptian propolis 2 flavonoids constituents. *Egyptian J. Appl. Sci* 9, 91-109.
- AMOROS, M.; Lurton, E.; Boustie, J.; Girre, L. (1994). Comparison of the antiherpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. *Journal of Natural Products* 57: 5, 644-647.
- AMOROS, M.; Simoes, C.M.O.; Girre, L.; Sauvager, F.; Cormier, M. (1992). Sinergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type I in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *Journal of Natural Products* 55: 12, 1732-1740.
- BANKOVA, V.; Popova, M.; Bogdanov, S. & Sabatini, A.G. (2002). Chemical composition of European Propolis: Expected and Unexpected Results. *Z. Naturforsch* 57c 530-533.
- BANKOVA, V.; Marcucci, M.C.; Simova, S.; Nikolova, Ujungiev, A.; Popova, M. (1996). Antibacterial diterpenic acids from Brazilian propolis. *Zeitschrift-fur-Naturforschung. Section C. Biosciences* 51: 5-6, 277-280.
- BAUER, A.W. & Kirby, W.M.M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardizer single method. *Am. J Clinich Pathol* 45: 493-496.
- BIRCHARD S. & Sherding R. (2001): Manual Clínico de Pequeñas Especies. Volumen 1. Primera Edición. Editorial Mc Graw- Hill Interamericana. México.
- CARTER, G.R. & Cole, J.R. (1990). Diagnostic procedure in Veterinary Bacteriology and Mycology. 1 Edition. Academic Press. INC. San Diego. 479-492 PP.
- CHENG, P.C.; Wong, G. (1996). Honey bee propolis: Prospects in medicine. *Bee World*. 77: 1, 8-15.
- FINEGOLD, S.M. y Baron, E.J. (1993). *Diagnóstico Microbiológico*. 7ª de. Editorial Médica Panamericana S.A.
- HEGAZI, A. G. (1998). Propolis an overview. *J. Bee Informed* 5 22-23 and 6 23-28.
- HOLT, J. H; Krieg, N.; Sneath, P.; Staley, J. and Willians, S. (1991): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Edition. Williams and Wilkins.
- GREENE, C.E. (1993). *Enfermedades Infecciosa en Perros y Gatos*. Primera Edición. Interamericana. McGraw-Hill. México.
- Mac FADDIN, J. F. (1980). *Biochemical Test For Identification of Medical Bacteria*. Waverly Press. Inc. 2nd edition.
- MARCUCCI, M. C. (1995). Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26: 2, 83-89.

- MIORIN, P.L., Levy Jr. N.C., Custodio A.R., Bretz, W.A., Marcucci, M.C. (2003). Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol.*; 95(5):913-20.
- MORENO, N., M.I.; Isla, M.I.; Cudmani, N.G.; Vattuone, M.A.; Sampietro, A.R. Screening of antibacterial activity of *Amaicha del Valle* (Tucumán, Argentina) propolis. *J. Ethnopharmacol.*, 68: 97-102.
- PESCHANSKII, A. (1973). Lechanie niekotorij Zabolevanil rastvorom propolisa. *Pchelovodstvo* 5 (38): 39.
- ROBERTS, S., O'shea, K., Morris, D., Robb, A., Morrison, D., Rankin, S. (2005). A real-time PCR assay to detect the Panton Valentine Leukocidin toxin in staphylococci: screening *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* strains from companion animals. *Vet Microbiol.* 25;107(1-2):139-44.
- VANDEPITTE J., Engbaek, K., Piot, P. y Heuck, C. (1993). *Métodos básicos de laboratorio en bacteriología clínica*. OMS; Ginebra.