



# Efecto biocida de extractos hidrosolubles de propóleos de abejas *Apis mellifera* y *Trigonas sp* sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Marielsa Gil <sup>1</sup> .

Catherine Monsalve <sup>2</sup> .

Laura Quintana <sup>3</sup> .

Smirna Castrillo <sup>4</sup> .

Greysys Ochoa <sup>5</sup> .

Esther Perozo <sup>6</sup> .

Andris Briceño <sup>7</sup> .

<sup>1</sup>Bioanalista Microbiólogo. Docente e Investigador del Departamento de Microbiología, Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas de la Universidad de Carabobo, Venezuela Laboratorio 12-12 Piso 2, Edif. Ciencias Biomédicas, Universidad de Carabobo, Campus Bárbula, municipio Naguanagua, Estado Carabobo, Venezuela.  
marielsagilfd@hotmail.com

<sup>2</sup>Bioanalista al servicio del Laboratorio de Diagnóstico Bacteriológico del Departamento de Microbiología, Escuela de Ciencias Biomédicas y

Tecnológicas de la Universidad de Carabobo, Venezuela

<sup>3</sup>Bioanalista al servicio del Laboratorio de Diagnóstico Bacteriológico del Departamento de Microbiología, Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas de la Universidad de Carabobo, Venezuela

<sup>4</sup>Bioanalista, Msc. en Investigación Educativa, Dra. en Educación. Docente e Investigador del Departamento de Investigación y Desarrollo Profesional Escuela de Bioanálisis de la Universidad de Carabobo, Venezuela

<sup>5</sup>Lcda. en Educación Mención Biología. Msc. en Investigación Educativa. Investigador del Departamento de Microbiología, Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas de la Universidad de Carabobo, Venezuela

<sup>6</sup>Citotecnólogo, Investigador del Departamento de Microbiología, Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas de la Universidad de Carabobo, Venezuela

<sup>7</sup>Bioanalista al servicio del Laboratorio de Diagnóstico Bacteriológico del Departamento de Microbiología, Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas de la Universidad de Carabobo, Venezuela

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 23 de Septiembre del 2016 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

## RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto biocida del extracto hidrosoluble de propóleos (EHP) de abejas *Apis mellifera* y *Trigona* sp. proveniente de San Cristóbal, Estado Táchira, Venezuela sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 y 25923 respectivamente. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) utilizando el método de macrodilución en tubos. Se observó que no hubo efecto bacteriostático, pero si bactericida sobre *Escherichia coli* CMB 50% en el EHP de *Apis mellifera*, mientras que en *Staphylococcus aureus* se obtuvo la CMI a 25% y la CMB a 50%. En cuanto al EHP de *Trigona* sp. se observó que no hubo efecto bacteriostático para ninguna de las cepas pero se obtuvo una CMB al 100% (puro), tanto para *Escherichia coli* como para *Staphylococcus aureus*. Se demostró que los EHP de ambos tipos de abejas tienen efecto antimicrobiano sobre las cepas estudiadas.

**PALABRAS CLAVE:** Propóleos hidrosolubles, *Apis mellifera*, *Trigona* sp, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

**BIOCIDAL EFFECT OF WATER-SOLUBLE EXTRACTS OF PROPOLIS FROM APIS MELLIFERA AND TRIGONA SP BEES OVER ESCHERICHIA COLI AND STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

## SUMMARY

The main focus of this research was to evaluate the biocidal effect of the water-soluble extract of propolis (WEP) from *Apis mellifera* and *Trigona* sp bees from San Cristobal, Tachira state, Venezuela, on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 and 25923 respectively. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)

was determined using the tubes macrodilution method. It was observed that there was no bacteriostatic effect but a bactericidal one on *Escherichia coli* MBC 50% on the WEP from *Apis mellifera*, while it was obtained a MIC of 25% and a MBC of 50% on *Staphylococcus aureus*. As for the WEP from *Trigona* sp, it was observed that there was no bacteriostatic effect for any of the strains, but MBC of 100% (pure extract) was obtained for *Escherichia coli* and for *Staphylococcus aureus*. It was demonstrated that the WEP from both types of bees have antimicrobial effect on the tested strains..

**KEY WORDS:** Water-soluble propolis, *Apis mellifera*, *Trigona* sp, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

## **EFFECTO BIOCIDA DE EXTRACTOS HIDROSOLUBLES DE PROPÓLEOS DE ABEJAS *APIS MELLIFERA* Y *TRIGONAS SP* SOBRE *ESCHERICHIA COLI* Y *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

### **INTRODUCCIÓN**

La organización mundial de la salud (OMS) destaca que las infecciones por microorganismos como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, son responsables cada año de unos tres millones de muertes en el mundo <sup>(1)</sup>.

Estas bacterias en los últimos años han sido capaces de desarrollar innumerables mecanismos de resistencia a los antibióticos, en el caso de *Staphylococcus aureus*, que tiene resistencia progresiva a los antibióticos betalactámicos, macrólidos, lincosamidas y glicopéptidos, así como también la *Escherichia coli*, con mecanismos de resistencia como la producción de betalactamasa de espectro expandido (BLEE), la expresión de sistemas de excreción (efflux pumps), que evitan que el fármaco alcance su blanco intracelular y las mutaciones que inhiben el contacto del antibiótico con el sitio de acción impidiendo la entrada del mismo a la bacteria <sup>(1,2)</sup>.

Una de las principales causas de la resistencia bacteriana ha sido el uso indiscriminado de los antibióticos. Por eso en enero del 2006, en Venezuela se reguló su distribución condicionando su venta a la presentación del recípe médico; sin embargo se determinó mediante el Programa Venezolano de Resistencia Bacteriana que la resistencia de las bacterias continuó en aumento aún después de esta regulación <sup>(3)</sup>.

Este incremento de los mecanismos de resistencia, es un problema que preocupa a los especialistas en el área de la salud, especialmente aquellos que involucran al bacilo Gram-negativo *Escherichia coli*, el cual es uno de los microorganismo que con mayor frecuencia ocasiona infecciones en el tracto urinario, meningitis, peritonitis, septicemia y diarrea hemorrágica, así como también al coco Gram-positivo *Staphylococcus aureus*, que produce graves infecciones en pacientes hospitalizados, en piel, tejidos blandos, huesos, aparato genitourinario e infecciones oportunistas <sup>(4,5)</sup>.

En este sentido, se ha desplegado diferentes investigaciones a nivel nacional e internacional para el estudio de sustancias naturales que poseen algunas propiedades farmacológicas con

efectos antimicrobianos <sup>(6)</sup>. Una de las sustancias estudiadas con mayor actividad antimicrobiana son los propóleos, que son resina ceras, de composición compleja y consistencia viscosa que las abejas elaboran y utilizan en la construcción y protección de la colmena, especialmente evitan la contaminación del panal con agentes biológicos extraños <sup>(7)</sup>.

Entre los compuestos químicos del propóleo se encuentran aldehídos, ácidos y ésteres alifáticos, aminoácidos, ácidos y ésteres aromáticos, chalconas, dihidrochalconas, flavanonas, flavonas, flavonoides, ácidos grasos, cetonas, terpenoides, esteroides y azúcares <sup>(8)</sup>. Sin embargo, entre los principios activos del propóleo a los cuales se le atribuyen la actividad antimicrobiana están los flavonoides. Entre las abejas productoras de propóleo tenemos las *Apis mellifera*, que tienen un aguijón y lo usan para defender la colmena, siendo estas abejas las principales de la industria apícola. También están las *Trigonas sp.*, que son abejas sin aguijón y para defender la colonia se enredan en el pelo de las víctimas o se introducen por los ojos, nariz y boca. Las mieles de ambas abejas son utilizadas para remedios caseros <sup>(9-11)</sup>.

La mayoría de las investigaciones apuntan hacia propóleos producidos por abejas *Apis mellifera* y en menor grado sobre propóleos de abejas sin aguijón, así como también la mayoría de los trabajos evalúan extractos etanólicos y no hidrosolubles. Es por ello que, la presente investigación evaluó el efecto biocida del extracto hidrosoluble de propóleos de abejas *Apis mellifera* y *Trigonas sp.* sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, determinando la concentración mínima Inhibitoria o bacteriostática (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó un diseño cuasi experimental, de tipo descriptivo de corte transversal.

### Extractos hidrosolubles de propóleos

Se utilizó un extracto hidrosoluble concentrado (100%) de propóleo producido por abejas con aguijón *Apis mellifera* y un extracto hidrosoluble concentrado (100%) de propóleo producidas por abejas sin aguijón *Trigonas sp.* ambas recolectadas y elaboradas artesanalmente en San Antonio del Táchira, Estado Táchira, Latitud 07°48'52"N, Longitud 72°26'35"W, Venezuela.

Paralelamente se utilizó un extracto etanólico de propóleo (EEP) al 50% de abejas *Apis mellifera* elaborado en el mismo apiario, con la finalidad de tener un punto de comparación del efecto inhibitorio.

### Cepas en estudio

Se trabajó con las siguientes cepas American Type Culture Collection (ATCC): *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, obtenidas del Centro Venezolano de Colección de Microorganismos (CVCM) y conservadas en el cepario del Laboratorio de Diagnóstico Bacteriológico de la Universidad de Carabobo, Venezuela.

## **Reactivación de las cepas bacterianas**

A fin de reactivar las cepas (ATCC) de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* conservadas en el cepario, se inocularon en caldo infusión cerebro corazón (BHI) marca BD BBL™, se incubaron durante 24 horas a 37°C para su reproducción. Luego se sembraron en agar sangre.

## **Preparación de las suspensiones bacterianas**

Del agar sangre se tomaron colonias aisladas suspendiéndolas en caldos BHI hasta alcanzar la turbidez del patrón 0,5 % Mc Farland equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC.

## **Preparación de las diluciones dobles seriadas**

Se utilizó el método de macrodilución en tubos la cual se describe a continuación siguiendo las especificaciones de Gil y colaboradores en el año 2012 <sup>(12)</sup>, con algunas modificaciones: se dispusieron 10 tubos 12 x 75 para cada propóleo y por cada bacteria a evaluar. Las diluciones fueron dobles seriadas. Cada tubo contenía 500 µL de caldo Müller Hinton marca BD BBL™ menos el primero que correspondió al EHP puro, al tubo 2 hasta el tubo 8 se realizaron las diluciones dobles seriadas 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, de esta manera las concentraciones obtenidas desde el tubo 1 al 8 fueron: 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%. El tubo 9 correspondió al control de viabilidad de la bacteria (control positivo) y el tubo 10 correspondió al control de esterilidad del propóleos (control negativo). Una vez realizadas las diluciones se procedió a inocular cada tubo menos el tubo 12 con 50 µL de la suspensión bacteriana de *E. coli* y *S. aureus*, correspondiente a cada serie al 0,5% de turbidez Mc Farland. Se incubaron por 24 horas a 37 °C <sup>(12)</sup>.

## **Determinación de la actividad bacteriostática y bactericida**

Siguiendo el protocolo de Gil y colaboradores 2012 <sup>(12)</sup>, trascurrido el tiempo de exposición de las bacterias con las distintas concentraciones de cada propóleo, se procedió a tomar 10 µL de cada tubo para sembrarlo en placas de BHI, utilizando la técnica de siembra en superficie con espátula de Drigalski, así mismo también se tomó con asa calibrada 10 µL de cada tubo y se inoculó en caldo BHI. Ambos procedimientos se incubaron durante 24 a 48 horas a 37°C. Posteriormente, se observó si hubo o no crecimiento del microorganismo tanto en las placas como en los caldos, determinando de esta manera las diluciones en la que se consigue la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) respectivamente <sup>(12)</sup>.

## **Controles utilizados durante el desarrollo de la metodología**

En cada ensayo se utilizó un control de viabilidad, el cual garantiza que el microorganismo es capaz de reproducirse en el agar y en el caldo BHI, también se utilizó un control de esterilidad con la finalidad de garantizar que los propóleos no estuviesen contaminados. Adicionalmente los tubos y en las placas donde se observó crecimiento bacteriano se realizó tinción de Gram y las pruebas bioquímicas convencionales para su identificación, con la finalidad de confirmar si se trata de las bacterias utilizadas o de una posible contaminación.

## **Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza de un factor con 3 niveles a través de la prueba no paramétrica *ANOVA* Univariante con el fin de contrastar si existen diferencias entre las medias de cada nivel. Posteriormente se realizaron comparaciones entre los propóleos a través de la prueba de *Tukey* HSD, para identificar el tratamiento con mayor inhibición con un 99% de nivel de confianza. Se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 19.

## RESULTADOS

Se puede destacar que la concentración mínima inhibitoria (CMI) se entiende como el valor de la menor dilución que inhibe completamente o parcialmente el desarrollo de las bacterias sobre el agar BHI. Mientras que la concentración mínima bactericida (CMB) es el valor de la menor dilución en la que no se observa crecimiento de las bacterias ni en agar ni en caldo BHI <sup>(12)</sup>.

Los resultados obtenidos en la determinación del efecto bacteriostático y bactericida del EHP de *Apis mellifera* sobre *Escherichia coli* se pudo evidenciar que no hubo efecto bacteriostático pero si bactericida cuya CMB fue de 50% (Tabla 1), mientras que sobre *Staphylococcus aureus* se pudo evidenciar que la CMI fue de 25% y la CMB de 50% .

**Tabla 1. Efecto bacteriostático y bactericida del extracto hidrosoluble de propóleos de *Apis mellifera* sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus***

Propóleos (%)	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Placas	Tubos	Placas	Tubos
	UFC		UFC	
100	0	-	0	-
50	0	-	0	-
25	>100	+	5±2	+
12,5	>100	+	30±5	+
6,25	>100	+	>100	+
3,12	>100	+	>100	+
1,56	>100	+	>100	+
0,7	>100	+	>100	+
0,3	>100	+	>100	+
0,1	>100	+	>100	+
Control positivo	>100	+	>100	+
Control negativo	0	-	0	-

+Turbidez, - sin crecimiento bacteriano, UFC: Unidades Formadoras de Colonia

En la determinación de la concentración del efecto bacteriostático y bactericida de EHP de

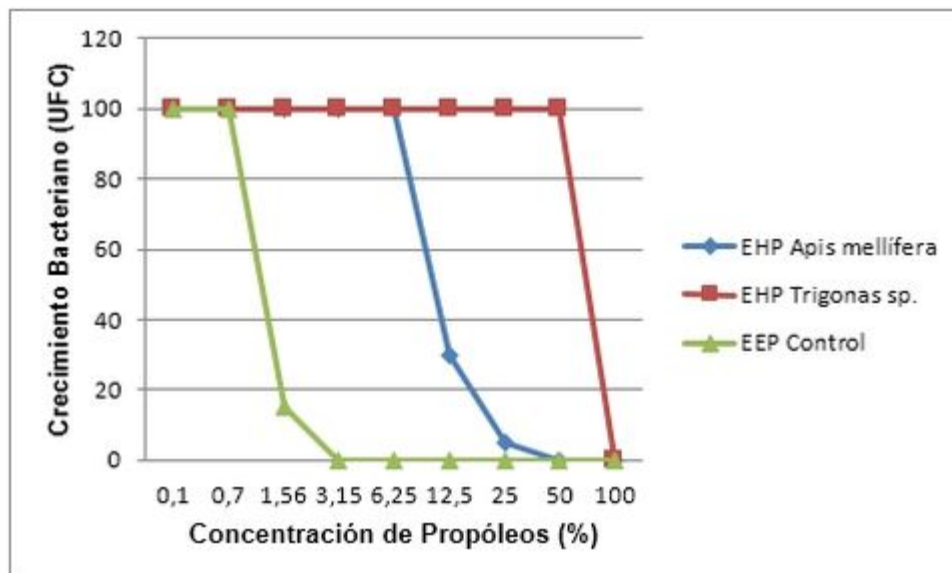
*Trigonas sp.* sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Tabla 2) se pudo observar que no hubo efecto bacteriostático pero si bactericida sobre ambas bacterias, obteniéndose la CMB a 100% es decir puro.

**Tabla 2. Efecto bacteriostático y bactericida del extracto hidrosoluble de propóleos de *Trigonas sp.* sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.**

Propóleos (%)	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Placas	Tubos	Placas	Tubos
	UFC		UFC	
100	0	-	0	-
50	>100	+	>100	+
25	>100	+	>100	+
12,5	>100	+	>100	+
6,25	>100	+	>100	+
3,12	>100	+	>100	+
1,56	>100	+	>100	+
0,7	>100	+	>100	+
0,3	>100	+	>100	+
0,1	>100	+	>100	+
Control Positivo	>100	+	>100	+
Control negativo	0	-	0	-

+ Turbidez, - sin crecimiento bacteriano, UFC: Unidades Formadoras de Colonia

Finalmente, se compararon los resultados obtenidos de ambos EHP con un EEP. Con el EEP se obtuvo una CMI 1,56% y CMB de 3,15% para *Staphylococcus aureus* mientras que para *Escherichia coli* no hubo efecto bacteriostático pero si bactericida CMB de 12,5%.



EHP: Extracto hidrosoluble de propóleo

EEP: Extracto etanólico de propóleo

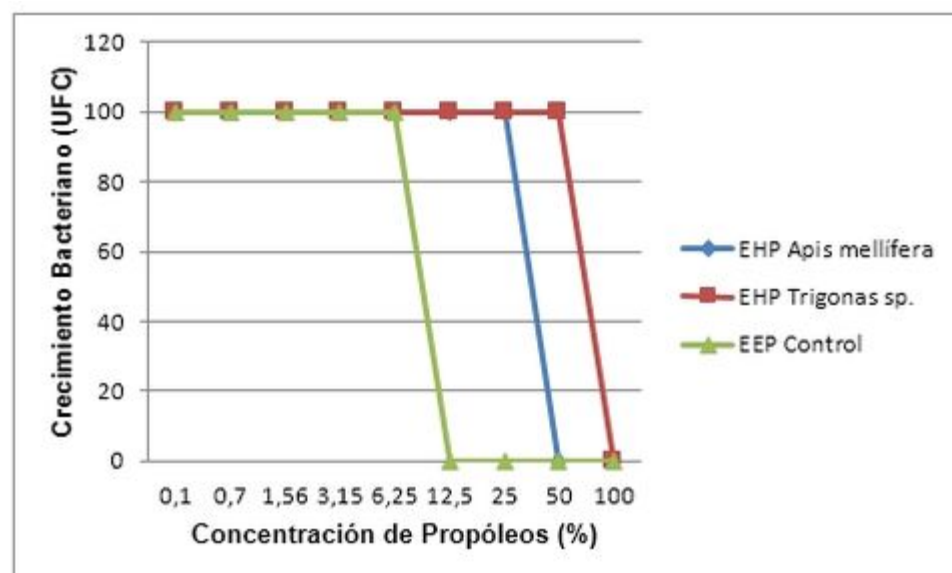
Tukey HSD

M1 vs M2  $p < 0.01$

M1 vs M3  $p < 0.01$

M2 vs M3  $p < 0.01$

Figura 1. Comparación del efecto inhibitorio de los Propóleos sobre *Staphylococcus aureus*



EHP: Extracto hidrosoluble de propóleo

EEP: Extracto etanólico de propóleo

Tukey HSD

M1 vs M2  $p < 0.01$

M1 vs M3  $p < 0.01$

M2 vs M3  $p < 0.01$

Figura 2. Comparación del efecto inhibitorio de los propóleos sobre *Escherichia coli*



## REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo 2014. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/> Consultado el 15 de Noviembre de 2015.
2. Casellas J. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la Infectología. Rev Panam Salud Pública 2011; 30 (6): 519-528 [Link](#)
3. Gómez C, Alonso G. Regulación de la dispensación de antibióticos en Venezuela y resistencia bacteriana. Rev. VITAE, 2013; 55(1): 1-8. [Link](#)
4. Pérez N, Pavas N, Rodríguez E. Resistencia de Staphylococcus aureus a los antibióticos en un hospital de la Orinoquia Colombiana. Infectio, 2010; 14 (3): 167-173 [Link](#)
5. Koneman E, Winn W, Allen S, Janda W, Procop G, Schreckenberger P, et al. Diagnóstico microbiológico. 6ta ed. Madrid-España: Editorial Médica Panamericana; 2008.
6. Gil M, Reyes D, Rojas T, Flores M. Actividad bacteriostática y bactericida de una tintura de propóleo proveniente del estado Cojedes sobre bacterias de interés clínico. Bol Venez de Infectol 2008; 19 (2): 124.
7. Farré R, Frasquet I, Sánchez A. El propolis y la salud. Ars Pharmaceutica 2004; 45: 21-43 [Link](#)
8. Marcucci M, Ferreres F, García-Viguera C, Bankova V, De Castro S, Dantas A. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. J Ethnopharmacol. 2001; 74 (2):105-12 [Link](#)
9. Alves E, Guzmán D, Figueroa J, Tello J, De Oliveira D. Caracterización antimicrobiana y fisicoquímica de propóleos de Apis mellifera L. (Hymenoptera: apidae) de la región andina colombiana. Acta biol Colomb 2011; 16 (1) 175-184. [Link](#)
10. Rodríguez S, Manrique A, Velásquez, M. Diversidad de la comunidad de abejas sin aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponina) en bosque seco tropical en Venezuela. Zoot Tropical 2008; 26 (4): 523-530. [Link](#)
11. Manrique A, Santana W. Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, Melipona quadrifasciata, Melipona compressipes, Tetragonisca angustula y Nannotrigona sp. de Brasil y Venezuela. Zoot Trop 2008; 26 (2) 157-166. [Link](#)
12. Gil M, Perelli A, Alvarado R, Arias Y, Blumenthal E. Actividad bacteriostática y bactericida de la tintura de propóleos sobre bacterias enteropatógenas. Salus 2012 16(3): 21-25. [Link](#)
13. Carrillo M, Castillo L, Mauricio R. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina (México). Inf tecnol 2011, 22 (5): 21-28. [Link](#)
14. Tolosa L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad

antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. Ars. pharm, 2004; 43(1) ,187-204.

[Link](#)

15. Madigan M, Martinko J, Parker J. Biología de los microorganismos, 10a ed, Pearson prentice Hall, Madrid, España 2004. pp 22-37.

16. Garedew A, Schmolz, E, Lamprecht I. Microbiological and calorimetric investigations on the antimicrobial actions of different propolis extracts: an in vitro approach. Thermochemica Acta, 2004; 422 (1):115-124. [Link](#)

17. Gil M, Colarusso V, Ferreira J, Muñoz A, Rojas T, Ochoa G, Perozo, E, et al. Efecto de un extracto etanólico de propóleos sobre Pseudomonas aeruginosa en estado planctónico y sésil. Salus, 2016; 20(1), 27-33. [Link](#)

18. Mirzoeva O. Grishanin R, Calder P. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. Microbiol. Res 1997; 152(3):239-46 [Link](#)

19. Takaisi-Kikuni N, Schilcher H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. Planta Médica. 1994; 60(3):222-7. [Link](#)

20. Gonzales G, Orsi R, Fernandes A, Rodrigues P, Funari S. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. J Venom Anim Toxins 2006; 12(2). [Link](#)

21. Manrique A. Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado Miranda, Venezuela. Efecto de la variación estacional. Zoot Trop 2006; 24 (1):43-53. [Link](#)

22. Ortega N, Campo N, Fajardo F. Actividad antibacterial y composición cualitativa de propóleos provenientes de zonas climáticas del Departamento del Cauca. Rev Bio Agro 2011; 9(1), 8-16. [Link](#)

23. Ramos J, Blásquez E, Medeiros E, Landero I. Comparación de especies de abejas comestibles en la sierra de Jibóia, (Bahia, Brasil) y Sierra de Zongolica (Veracruz, México) Rev Colomb de Entomol 2009; 35(2): 217-223