

# Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México

Fecha de recepción: 09/10/2007

Fecha de aceptación: 10/10/2007

Amparo Londoño Orozco<sup>1</sup>  
José Guillermo Penieres Carrillo<sup>2</sup>  
Carlos Gerardo García Tovar<sup>3</sup>  
Liborio Carrillo M.<sup>4</sup>  
María Leonor Quintero Mora<sup>5</sup>  
Susana Elvira García Vázquez<sup>6</sup>  
Marco Antonio Mendoza Saavedra<sup>7</sup>  
To natiuh Alejandro Cruz Sánchez<sup>8</sup>

## Palabras clave

*Actividad antifúngica, propóleo, Apis mellifera.*

## Key words

*Antifungal activity, Propolis, Apis mellifera.*

1. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Académico. Ciencias Biológicas. Teléfono/fax oficina: 52-55-56231831. Correo electrónico: amlorozco@yahoo.com.mx
2. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Consejero Técnico, Departamento de Ciencias Químicas. Teléfono/fax oficina: 52-55-56232024. Correo electrónico: penieres@servidor.unam.mx
3. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Jefe del Departamento de Ciencias Biológicas. Teléfono/fax oficina: 52-55-56231828. Correo electrónico: cgarciatov@yahoo.com.mx
4. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Jefe de Zootecnia del Departamento de Ciencias Pecuarias. Departamento de Ciencias Pecuarias. Teléfono/fax oficina: 52-55-56231829, 00, 22. Correo electrónico: liboriocarri@yahoo.com.mx
5. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Académico. Departamento de Ciencias Biológicas. Teléfono/fax oficina: 52-55-56231831 Correo electrónico: marileqm@hotmail.com
6. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Jefa de la Sección de Ciencias de la Salud Animal. Departamento de Ciencias Biológicas. Teléfono/fax oficina: 52-55-56231831. Correo electrónico: nikitassgav@hotmail.com
7. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Técnico Académico. Departamento de Ciencias Biológicas. Teléfono/fax oficina: 52-55-56231831. Correo electrónico: marco\_mdz@hotmail.com
8. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Académico. Departamento de Ciencias Biológicas. Teléfono/fax oficina: 52-55-56231831. Correo electrónico: tonatiuh86@hotmail.com

## Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la acción inhibitoria de un extracto etanólico al 15% de propóleo de la abeja *Apis mellifera*, procedente del apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, sobre el crecimiento de *Candida albicans* (ATCC 14055), *Cryptococcus neoformans*, y *Aspergillus fumigatus*, mediante dos pruebas de susceptibilidad: difusión en agar y microdilución. Se impregnaron los discos con el extracto de propóleo. Las pruebas de difusión fueron efectuadas sobre agar dextrosa Sabouraud (SDA), Müeller-Hinton con 2% de glucosa y 0,5 µg/mL de azul de metileno (MH-AM: documento NCCLS M-44A) y RPMI 1640 con agar noble. Para obtener la concentración inhibitoria mínima (CIM), se realizaron pruebas de microdilución según los métodos M27-A2 (levaduras) y M38-A (filamentosos) del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard: ahora Institute for Clinical Laboratory Standard). Se observó actividad inhibitoria sobre el desarrollo de todos los hongos estudiados. Estos resultados sugieren el posible potencial del propóleo como un tratamiento alternativo contra las infecciones por hongos, tanto levaduriformes como filamentosos.

## Abstract

The objective of the present work was to evaluate the inhibitory action of an ethanolic extract to 15% of propolis of the *Apis mellifera* bee, coming from the apiary of the Superior Studies Faculty of Cuautitlán, UNAM, on the growth of *Candida albicans* (ATCC 14055), *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*, through two tests of susceptibility: diffusion in agar and microdilution. The discs were impregnated with the propolis extract. The diffusion tests were carried out on Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Müeller-Hinton with 2% of glucose and 0,5 µg/mL of methylene

blue (MH-AM: document NCCLS M-44A) and RPMI 1640 with agar noble. In order to obtain the Minimum Inhibiting Concentration (CIM) microdilution tests were made according to methods M27-A2 (yeasts) and M38-A (filamentous) of NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard: now Institute for Clinical Laboratory Standard). Inhibitory activity was observed on the development of all the studied fungi. These results suggest the possible potential of the propolis like a treatment alternative against the infections by fungi, yeast and filamentous.

## Introducción

La inclinación del hombre hacia el aprovechamiento de los productos naturales se ha convertido, en la actualidad, en una opción insuperable para satisfacer las carencias en nutrimentos, o para ser empleados en el tratamiento de diversas enfermedades.

El propóleo es un material multifuncional usado por las abejas en la construcción y mantenimiento de sus colmenas. Es una sustancia resinosa, balsámica, gomosa, de consistencia viscosa y color verde pardo, castaño o incluso negro, sabor acre, frecuentemente amargo y olor agradable y dulce. Su color y composición dependen en gran medida de su origen botánico y del tipo de abeja que lo produzca. El propóleo de la especie *Apis mellifera* ha sido reconocido en países como Cuba, Brasil y Argentina por las propiedades biológicas que posee.

Su estudio científico se inició en la década de los 40 y se ha ido intensificando en la medida en que ha podido descifrarse su compleja composición y se han descubierto nuevos aspectos de su actividad biológica, que permiten su uso en diversas áreas como la Medicina, la Biología y la industria (2).

Entre las principales moléculas farmacológicamente activas del propóleo,

*La inclinación del hombre hacia el aprovechamiento de los productos naturales se ha convertido, en la actualidad, en una opción insuperable para satisfacer las carencias en nutrimentos, o para ser empleados en el tratamiento de diversas enfermedades.*

destacan flavonoides y ácidos fenólicos y sus ésteres; sin embargo, en un estudio se observó que muestras tropicales que no contenían esas sustancias mostraban actividad similar, lo cual sugiere que se requiere la combinación de diferentes compuestos para que sea biológicamente activo.

Múltiples reportes indican que el propóleo es relativamente no tóxico y tiene diversos efectos sobre bacterias, hongos, parásitos y virus, así como propiedades antitumorales, antioxidantes, como cicatrizante y regenerador de tejidos, entre otros.

Los estudios de la actividad antifúngica del propóleo se han restringido casi exclusivamente al género *Candida*, considerando que los sesquiterpenos, especialmente el bisabolol y flavononas (pinocembrina) son los principales compuestos responsables de esta actividad (2,5).

### Objetivo

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la acción inhibitoria de un extracto etanólico al 15% de propóleo de la abeja *Apis mellifera*, procedente del apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, sobre el crecimiento de *Candida albicans* (ATCC 14055),

*Cryptococcus neoformans*, y *Aspergillus fumigatus*, mediante dos pruebas de susceptibilidad: una cualitativa, prueba de difusión en agar, y una cuantitativa, prueba de microdilución.

### Metodología

El propóleo es obtenido del apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM (figuras 1 y 2) y a partir de este se prepara un extracto etanólico al 15%.

### Prueba de difusión en agar

Para realizar la prueba de difusión en agar, se impregnaron los discos con 25  $\mu$ L del extracto de propóleo. Las pruebas fueron efectuadas sobre tres medios diferentes: agar dextrosa Sabouraud (SDA), Müeller-Hinton con 2% de glucosa y 0,5  $\mu$ L de azul de metileno (MH-AM) y RPMI 1640 con agar noble (3, 4).

### Prueba de microdilución

Para obtener la concentración inhibitoria mínima (CIM), se realizaron pruebas de microdilución según los métodos M27-A2 para levaduras (6) y M38-A para hongos filamentosos (7) del NCCLS (ahora Institute for Clinical Laboratory

*Múltiples reportes indican que el propóleo es relativamente no tóxico y tiene diversos efectos sobre bacterias, hongos, parásitos y virus, así como propiedades antitumorales, antioxidantes, como cicatrizante y regenerador de tejidos, entre otros.*



Figuras 1 y 2. Propóleo obtenido del apiario Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Flechas: Propóleo).

Standard), haciendo modificaciones en las diluciones, ya que estos documentos están estandarizados para trabajar con compuestos puros por lo que se emplean concentraciones muy bajas; sin embargo, al trabajar con extractos obtenidos de productos naturales siempre tenemos una mezcla de compuestos y se requiere el empleo de concentraciones mayores. En primer lugar, se eliminó el etanol del extracto y el producto resultante se pesó para preparar una solución stock del propóleo con 1600 µg/mL, usando como solvente dimetil sulfóxido grado analítico (DMSO). A partir de esta solución, se realizaron diluciones, obteniendo concentraciones desde 1 hasta 1024 µg/mL (6, 7).

### Preparación de inóculos

Para *Aspergillus fumigatus* se emplearon cultivos de 7 días de crecimiento a 35 °C en agar dextrosa papa (ADP), para inducir la formación de conidios. Se suspendieron los conidios en solución salina fisiológica y se dejaron sedimentar durante 3 a 5 min. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo estéril y se preparó una suspensión con una densidad equivalente al tubo 0,5 de Mc Farland (DO de 0,09-0,17, 80-82% de transmitancia), lo cual corresponde a una concentración de  $1-5 \times 10^6$  conidios/mL. Se diluyó 1:50 en el medio de prueba RPMI 1640 (7).

Para *Candida albicans* se emplearon cultivos de 24 horas y para *Cryptococcus neoformans* de 48 horas de incubación en agar dextrosa Sabouraud (SDA). Se resuspendieron las colonias en solución salina fisiológica, ajustando a una densidad equivalente al tubo 0,5 de Mc Farland ( $1-5 \times 10^6$  UFC/mL). Posteriormente, se realizó una dilución 1:1000 con medio RPMI 1640 (6).

### Inoculación de microplacas

Se emplearon microplacas de 96 pozos, con fondo redondo, adicionando en los pozos del 1 al 10, 100 µL del inóculo

estandarizado y 100 µL de cada dilución. A la columna 11 se le adicionaron 100 µL del inóculo estandarizado y 100 µL del medio de prueba RPMI1640 sin propóleo, lo cual sirvió como control de crecimiento y a la columna 12 se le adicionaron 200 µL del medio de prueba RPMI1640 sin inóculo ni propóleo, lo cual sirvió como control de esterilidad del medio. Las placas se incubaron a 35 °C por 48 horas. *C. neoformans* puede requerir 72 horas de incubación (6,7).

### Determinación de la Concentración Fungicida Mínima (CFM)

Para determinar la CFM, se tomaron 10 µL del último pozo que dio positivo (crecimiento mínimo) en la microplaca y de los tres pozos siguientes, que muestran visualmente una inhibición del crecimiento completa, se cultivaron en SDA y se incubaron a 35 °C por 24 ó 48 horas (1).

### Resultados

#### Prueba de difusión en agar

Se observó actividad inhibitoria sobre el desarrollo de todos los hongos estudiados.

Se obtuvieron halos de inhibición con mayor diámetro empleando MH-AM o RPMI 1640. Se muestran los resultados obtenidos con *C. neoformans* (cuadro 1 y figura 3).

**Cuadro 1.** Prueba de difusión en agar: Las pruebas fueron efectuadas sobre tres medios diferentes: agar dextrosa Sabouraud (SDA), Mueller-Hinton con 2% de glucosa y 0,5 µL de azul de metileno (MH-AM) y RPMI 1640 con agar noble, empleando discos impregnados con 25 µL del extracto de propóleo.

**Diámetro de los halos de inhibición  
*C. neoformans***

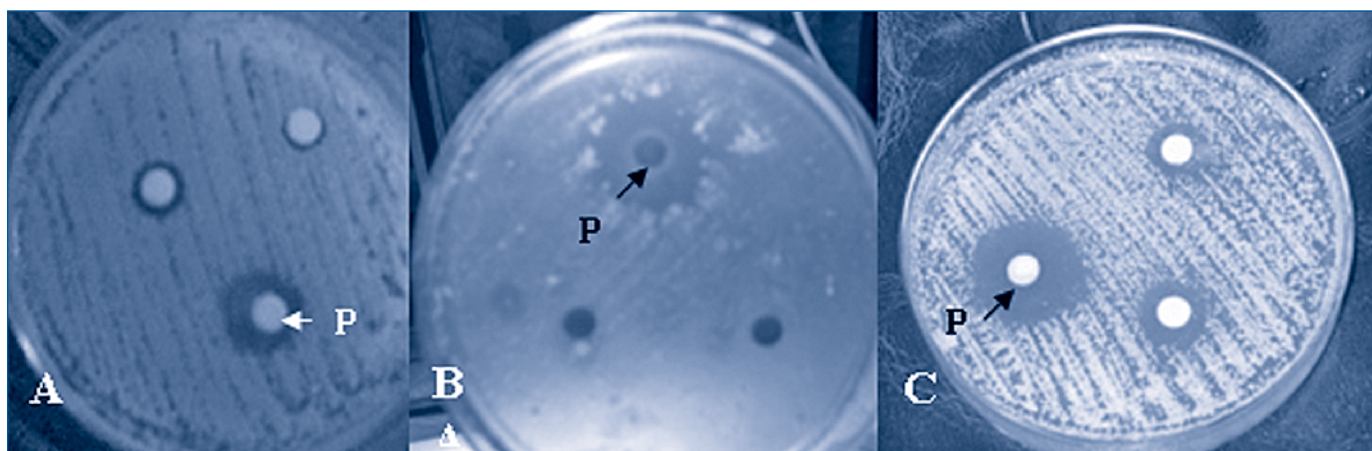


Figura 3. Prueba de difusión en agar. A: SDA, B: MH-AM, C: RPMI 1640. P: Propóleo.

SDA	MH-AM	RPMI 1640
10 mm	20 mm	20 mm

#### Prueba de microdilución

Las lecturas de las pruebas de microdilución se realizaron a las 24 y 48 horas para todas las cepas, verificando en primer lugar que los resultados obtenidos con los controles fueran los esperados; esto es, que el control negativo estuviera completamente transparente y en el control positivo hubiera suficiente crecimiento. Posteriormente, se realizó la lectura de los demás pozos, comparando la cantidad de crecimiento de cada uno con el crecimiento del control, y determinando si hubo o no reducción de crecimiento o en su caso, ausencia de este.

*Lectura visual:* la lectura se realizó de manera visual, considerando: ninguna reducción del crecimiento +++++; ligera reducción del crecimiento o que contiene un 75% de crecimiento comparada con el control positivo ++++; una prominente reducción del crecimiento o un 50% comparada con el control positivo ++; poco crecimiento o tan solo el 25% del crecimiento del control positivo + y completamente claro, sin ningún

crecimiento comparando con el control positivo 0.

*Lectura espectrofotométrica:* se realizó la lectura a 530 nm, agitando previamente cada pozo con la ayuda de un palillo estéril, para obtener una suspensión homogénea. Para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM), se restó la lectura de la absorbancia del pozo control negativo a la lectura del pozo control positivo, multiplicando después por 0,5 para obtener el 50% de inhibición de crecimiento o por 0,8 para obtener el 80% de inhibición de crecimiento. Finalmente,

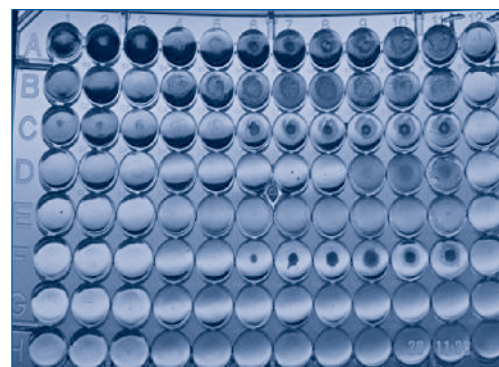


Figura 4. Prueba de microdilución en placa: fueron realizadas según los métodos descritos por el NCCLS en los documentos M27-A2 y M38-A para levaduras y hongos filamentosos respectivamente, haciendo modificaciones en las diluciones.

Cuadro 2. Resultados de la prueba de microdilución

Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) ( $\mu\text{g/ml}$ )			
Cepa de hongo	Porcentaje de inhibición		
	100%	80%	50%
<i>C. albicans</i>	512	256	32
<i>C. neoformans</i>	128	64	32
<i>A. fumigatus</i>	128	64	32

se sumó de nuevo el valor del control negativo y se compararon los resultados

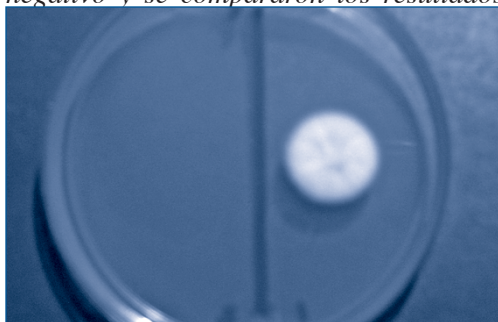


Figura 5. Determinación de la Concentración Fungicida Mínima (CFM) para *A. fumigatus*, fue de 256  $\mu\text{g/mL}$ .



Figura 6. Determinación de la Concentración Fungicida Mínima (CFM) para *C. neoformans*. Con 128  $\mu\text{g/mL}$  que fue la CIM se formaron 7 colonias; de acuerdo con el NCCLS, debe haber menos de tres colonias para ser considerada como CFM.

con las absorbancias obtenidas para cada dilución.

Los resultados obtenidos se muestran en el cuadro 2.

### Concentración fungicida mínima

### Discusión

Desde 1988 se reportó la actividad del extracto etanólico de propóleo contra 23 cepas de levaduras aisladas de diferentes partes del cuerpo humano, encontrando que fue fungistático a una concentración de 0,55 mg/mL (8). Otros autores reportaron que la mínima concentración fungicida del extracto etanólico de propóleo contra 15 cepas probadas fue de 3 a 7 mg/mL siendo *C. albicans* más susceptible que otras especies como *C. tropicalis*, *C. krusei*, y *C. guilliermondii* (5). Algunos autores han recomendado la utilización del propóleo como un antiséptico para la prevención y tratamiento de la candidiasis oral; incluso, se ha reportado que el extracto etanólico de propóleo podría ser usado como una medicina alternativa en el tratamiento de las candidiasis de pacientes HIV positivos, siendo tan efectivo como la nistatina y superando a otros antifúngicos como clotrimazol, econozol y fluconazol (5). Sin embargo, no se han realizado reportes en relación con la actividad sobre otros hongos, como fue en este trabajo, contra *C. neoformans* y *Aspergillus fumigatus*, cuyos

resultados sugieren el posible potencial del propóleo como un tratamiento alternativo contra las infecciones por hongos, tanto levaduriformes como filamentosos. Serán de gran relevancia los estudios que se realicen para sustentar estas observaciones.

## Conclusiones

El extracto etanólico al 15% de propóleo de la abeja *Apis mellifera* procedente del apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las levaduras *Candida albicans* (ATCC 14055) y *Cryptococcus neoformans*, y sobre el hongo filamentoso *Aspergillus fumigatus*, el cual fue demostrado mediante dos pruebas de susceptibilidad: difusión en agar y microdilución, lo cual sugiere el posible potencial del propóleo en el tratamiento de las enfermedades causadas no solo por hongos levaduriformes, sino, también, por hongos filamentosos.

## Bibliografía

Espinel-Ingroff, A.; Fothergill, A.; Peter, J.;

Rinaldi, M. G. & Walsh, T. J. "Testing. 2002. Conditions for Determination of Minimum Fungicidal Concentrations of new and Established Antifungal Agents for *Aspergillus* spp: NCCLS Collaborative Study". *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 3204- 3208.

González, G. A. R. 2007. *Avances y Perspectivas del Propóleos en la Salud Humana*. Ensayo. Memorias del XXI Seminario Americano de Apicultura. Organización Nacional de Apicultores. Mazatlán, Sinaloa.

Hazen, K.C. y cols. 2003. "Comparison of the susceptibilities of *Candida* spp. to fluconazole and voriconazole in a 4-year global evaluation using disk diffusion". *J. Clin. Microbiol.* 41:5623-5632.

Kirkpatrick, W.R. y cols. "Fluconazole Disk Diffusion Susceptibility Testing of *Candida* Species". *Journal of Clinical Microbiology*, Nov. 1998, p. 3429–3432 Vol. 36, No. 11

Martins, R.S. y cols. 2002. "Effect of commercial ethanol propolis extract on the in vitro growth of *Candida albicans*". *J. Oral Sci.* 44 (1): 41-48.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*. M27-A2. NCCLS, Villanova, Pennsylvania.

National Committee for Clinical Laboratory