

CUALIFICACIÓN MICROBIOLOGICA DEL PROPÓLEO COLOMBIANO, FRENTE A CUATRO MODELOS BIOLOGICOS COMO APORTE PARA LA DENOMINACIÓN DE ORIGEN

Talero Urrego Cesar Augusto* Figueroa Ramirez Judith**

** Zootecnista. Estudiante de Maestría en Salud y Producción Animal. Línea de Investigación en Microbiología de los Productos de la Colmena. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. catalerou@unal.edu.co. Teléfono (571) 3165000 Extensión 15365. Colombia. Sur América.*

*** Microbióloga. M.Sc. Microbiología. Profesor Asociado. Directora Línea de Investigación en Microbiología de los Productos de la Colmena. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. jfigueroaa@unal.edu.co. Teléfono (571) 3165000 Extensión 15365. Colombia. Sur América.*

Resumen

La identificación de las propiedades terapéuticas de los propóleos colombianos aún es insipiente y con base en los reportes internacionales sobre la dependencia de la actividad biológica frente a la composición química y a su vez del origen fitogeográfico, despierta un gran interés investigativo desde distintos enfoques en nuestro país, puesto que la topografía colombiana con tres cordilleras, dos océanos, selvas húmedas, llanuras tropicales, páramos e incluso montañas con nieves perpetuas posibilitan la existencia de un gran número de especies vegetales distribuidas en varios ecosistemas, influenciados por la temperatura, las precipitaciones, el tipo de suelo, la humedad relativa, brillo solar y la evapotranspiración. En este sentido la similitud en algunos componentes básicos de algunos vegetales, variarían por las diversas combinaciones de los fenómenos locales y juegan un papel importante en la relación entre el origen botánico, la composición química del propóleo y sus propiedades biológicas.

El proyecto de investigación que se realiza en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, frente a la acción biológica *in vitro* del propóleo, recolectados en cuatro ecoregiones de Colombia, evaluando la capacidad antiviral, antibacteriana, antifúngica y antiprotozoaria en cepas de referencia de los extractos etanolicos obtenidos bajo dos niveles de alcohol etanolic, estableciendo la correlación entre los resultados obtenidos de cada uno de los modelos biológicos utilizados y el nicho geográfico de producción del propóleo, así como su huella olfatométrica y los hallazgos palinológicos y paleoecológicos de los propóleos muestreados.

1. INTRODUCCION

La resina proveniente del metabolismo de las plantas y colectada por las abejas *Apis mellifera* en su actividad natural como material de refuerzo y estabilización de la colmena, denominado “propóleo”; a ganado interés en la comunidad científica internacional, no solo desde el punto de vista estructural o fisicoquímica, sino principalmente por sus propiedades biológicas, que resultan importantes en la salud humana.

Es claro el papel que juega la relación del origen botánico, la composición química del propóleo y sus propiedades medicinales de cada región del mundo. Los expertos han determinado que la topografía colombiana con tres cordilleras, dos océanos, selvas húmedas, llanuras tropicales, páramos e incluso montañas con nieves perpetuas y su ubicación geográfica posibilita la existencia de un gran número de especies animales y vegetales, distribuidas en varios ecosistemas. (Instituto Alexander von Humboldt, 2007).

Dentro de la flora colombiana existen diversas especies de interés apícola, ellas son fuentes de polen, néctar y de propóleos.

Barragán L., Ortiz J. y Barragan C. (1988), recolectaron muestras de propóleo provenientes de Fusagasugá, Tunja y Neiva, con el fin de verificar la actividad biológica del propóleo de Colombia. Los microorganismos utilizados en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) provenientes del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Colombia, fueron *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus piogens*, *Corynebacterium sp.* (2 cepas). Los solventes seleccionados para establecer un sistema de solubilidad del propóleo óptimo fueron etanol (96%), propilenglicol y etanol: propilenglicol en proporciones 1 a 1, 1 a 2 y 2 a 1. Los rangos de solubilidad obtenidos en cada sistema solvente se describen en la siguiente tabla.

Tabla. Rangos de solubilidad del propóleo estudiado

SISTEMA SOLVENTE	PORCENTAJE DE SOLUBILIDAD
Etanol 96%	23,3 % a 28,3 %
Propilenglicol	10,9 % a 15,7 %
Etanol:Propilenglicol (1:1)	14,0 % a 26,0 %
Etanol:Propilenglicol (2:1)	19,2 % a 24,3 %
Etanol:Propilenglicol (1:2)	16,5% a 23,6 %

En general los resultados de la CMI están por debajo de 1,0 mg de propóleo por 10 ml de medio de cultivo. Las muestras de Fusagasugá presentaron los menores valores de CMI y los extractos de etanol:propilenglicol 1:2 presentaron menores valores de CMI.

Solano, Coronado y Sanabria (2000), seleccionaron tres tipos de propóleo de diferentes regiones de Colombia (Boyacá, Quindío y Cundinamarca) con el fin de ser analizados por sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas. Los microorganismos de ensayo seleccionados fueron *Bacillus subtilis*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*,

Micrococcus luteus, *Escherichia coli*, *Salmonella tiphy*, *Pseudomona aeruginosa*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor sp.*

Por medio de los resultados del método de Perforación y Difusión en gel, se hallaron las Concentraciones Críticas (CC) de los extractos de propóleo, realizando la grafica de los diámetros de inhibición al cuadrado (X^2) vs. el logaritmo natural de la concentración.

Concluyendo que frente al *Bacillus subtilis* los propóleos presentaron una actividad antibacteriana elevada (Concentraciones Críticas: 26, 20 y 17 $\mu\text{g/ml}$) y frente a *S. agalactiae*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *S. aureus* una concentración Crítica de 5, 13, 17, 21 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

Moreno Z., Martinez P. y Figueroa J. (2007), tomaron cuatro muestras de propóleo argentino, cinco colombianos y uno cubano, buscando establecer el efecto antimicrobiano *In vitro* sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175; principal microorganismo implicado en el desarrollo de la caries dental.

Empleando la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en concentraciones 15 a 3.75 mg/ml, la totalidad de las muestras analizadas manifestaron actividad contra *S. mutans*. Las muestras colombianas presentaron actividad inhibitoria a concentraciones bajas, luego de periodo de exposición de 24 horas.

La diversidad botánica y las experiencias terapéuticas de conocimiento popular frente a patologías en humanos y animales en el país, hacen entrever un potencial alto del producto como agente antibiótico; de tal manera que esta actividad biológica debe ser investigada y certificada, influyendo en el valor agregado del producto.

Los diferentes modelos biológicos (Virus, bacterias, hongos y parásitos) empleados en este estudio van a permitir proponer la hipótesis sobre la correlación de las zonas fitogeográficas de producción de propóleo de *Apis mellifera* y su acción biológica en Colombia, lo que contribuye como aporte fundamental para alcanzar denominación de origen.

2. OBJETIVO GENERAL

Cualificar la actividad biológica *in vitro* de propóleos de abejas *Apis mellifera* de las zonas productivas de los departamentos de Magdalena, Santander, Boyacá y Cundinamarca.

2.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer el potencial antiviral del propóleo, de las regiones geográficas muestreadas frente al Adenovirus tipo 5 humano ATCC VR-1516.

- Establecer el comportamiento del propóleo en cuanto a su capacidad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y Gram negativas: *Escherichiae coli* ATCC 31617 por la técnica de concentración mínima inhibitoria (CMI).
- Determinar si los propóleos de las diferentes regiones presentan principios activos que inhiban el crecimiento de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, como modelo aplicado a hongos dermatofitos.
- Valorar si los propóleos colombianos presentan la misma actividad antiparasitaria de los propóleos cubanos asumiendo como modelo *Chilomonas paramecium*.
- Comparar si los extractos etanólicos de propóleo (EEP) al 70% y 96% tiene la misma actividad antibacteriana, antifúngica y antiparasitaria *in vitro*.
- Correlacionar los hallazgos de la actividad en microorganismos por los extractos etanolicos de propóleo en las zonas productoras en estudio.

3. MATERIALES Y METODOS

Recolección de muestras

El propóleo se colectara por reconocimiento de zonas geográficas diferenciadas por altitud, cobertura vegetal circundante y énfasis en la producción de propóleos por las abejas, en las producciones apícolas que conforman las asociaciones de apicultores que integran este proyecto; para esta diferenciación se esta ejecutando en la actualidad, un proyecto sobre cobertura vegetal de interés en la actividad de *Apis mellifera*. De acuerdo a las zonas identificadas se tomaran muestras según el inventario de apicultores por zona y la frecuencia de recolección por época del año.

Obtención del Extracto Etanólico de Propóleo (EEP)

Se retiraran impurezas mecánicas, se pesaran muestras de 50 g de propóleo cada una, se almacenara en un recipiente adecuado y se agregaran 250 cc de alcohol etílico de 70 y 96% respectivamente, se taparan herméticamente en frascos de vidrio protegidos de la luz. Se agitará cada muestra durante 28 días y se dejara decantar durante 8 días. Al cabo de ese tiempo se pasara por papel filtro. Del extracto recolectado, se tomara una submuestra de 5 mL y se llevara a horno a 47°C por 24 horas para obtener el extracto blando. Posterior a esto, se pesa el extracto blando y se comprueba la concentración mg/ml de propóleo del total de cada muestra (Tolosa, 2002; Park *et al.*, 1998).

Microorganismos

Los microorganismos a utilizar en esta investigación para verificar la actividad biológica del propóleo, serán líneas estandarizadas American Type Culture Collection (ATCC) ha excepción del protozario (Ver tabla).

Tabla. Microorganismos a usar en el estudio

Microorganismo <i>in vitro</i>		Técnica de análisis
VIRUS		
Adenovirus tipo 5 humano	ATCC VR-1516.	Plaqueo
BACTERIAS GRAM POSITIVAS		
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	CMI
BACTERIAS GRAM NEGATIVAS		
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 31617	CMI
HONGOS		
<i>Trichophyton rubrum</i>	ATCC 28188	CMI
PARASITARIO		
<i>Chilomonas paramecium</i>	UN FMVZ LM	CLP
ATCC American Type Culture Collection; UN FMVZ LM Laboratorio Microbiología; CMI Concentración Mínima Inhibitoria; CLP Concentración de Lisis Parasitaria.		

Procedimientos Microbiológicos

Actividad antiviral - Método de Plaqueo Viral: Se infectara un cultivo celular ATCC HB-293 (células tipo hibridoma) con el *adenovirus tipo 5 humano* ATCC VR-1516 en placas de cultivo y se adicionara el medio nutritivo del mismo en fase semisólida (agar, agarosa, carboximetilcelulosa, metilcelulosa). De esta manera, cuando el virus infecte una célula, su progenie sólo puede migrar a las células inmediatamente vecinas, y no a las alejadas, ya que el medio semisólido limita su movilidad. En las células con tinción previa (colorante vital, rojo neutro) se observarán zonas no teñidas (placas de lisis), correspondientes a las células destruidas por el virus inoculado. En este caso, se indica que a cada placa de lisis corresponde una única partícula infectante (Davis *et al.*, 1990). El EEP se pondrá en contacto con el virus antes de infectar el cultivo celular en concentraciones conocidas. El conteo de placas determinara la muerte viral. Se llevara un control con alcohol al 96% y una palca sin efecto del EEP.

Bacterias ATCC: Se procederá a la activación de las cepas de acuerdo a la indicación de la casa comercial. La cepa activada se sembrara en Agar con incubación (37°C/24 h.);

observado el crecimiento bacterial como control de verificación de la idoneidad de la bacteria, se tomara una colonia media que se diluirá en 10 ml de solución salina a una escala de turbidez de Mc. Farland No. 3 equivalente a 9×10^8 UFC/mL, y se incubara ($37^\circ\text{C}/24$ h.). Dejando lista la solución bacteriana para la posterior inoculación.

Actividad Antibacteriana: La técnica empleada para hallar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), fue adaptada de la reportada por el equipo de Tolosa (2002). Consiste en tomar los 10 primeros microtubos de la caja de microdilución con 10 μL de caldo MH en cada uno y 50 μL de este caldo para todos los restantes; a estos 10 primeros microtubos se añade 90 μL del extracto de propóleo (EEP con alcohol de 70% y 96%) y se realizan diluciones seriadas en base dos. De esta manera se consiguen las diluciones mg/mL de propóleo, de acuerdo al porcentaje de principio activo que se obtenga del extracto blando.

Posteriormente, se inocula 20 μL de solución bacteriana en todos los microtubos. Para este estudio se incluirá un control con alcohol etílico al 96%. Luego de este proceso, se incuba por 24 horas a 37°C . Pasado este lapso de tiempo se siembra de cada microtubo con asa calibrada en placa de Petri con Agar BHI y se lleva nuevamente a incubación bajo las mismas condiciones. Este proceso se repite luego de 48 horas de exposición de la bacteria al propóleo.

Actividad Antifúngica: En el caso del hongo la recuperación se hará de acuerdo al método que recomiende la ATCC según sea el caso; se empleara la misma técnica en busca de la Concentración Mínima Inhibitoria empleando el método de dilución en medio papa dextrosa agar (PDA); se colocara la espora en el centro de la placa de Petri e incubando a 30°C en cuarto húmedo por 20 días, luego se observa el crecimiento radial del hongo de acuerdo al NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1998) y se calculará el porcentaje de inhibición = $((\text{crecimiento micelial del control} - \text{crecimiento micelial en propóleo}) / \text{crecimiento micelial del control}) \times 100$ (Reyes Chilpa *et al.* 1997; citados por Quiroga E. N., 2006).

Actividad Antiparasitaria - Concentración de Lisis Parasitaria (CLP): Las *Chilomonas paramecium* previamente purificadas en el laboratorio en placas de Petri, se tomaran 2 mL de este cultivo, junto con 8 mL de agua destilada para realizar un control de supervivencia inicial en cámara de Neubauer (tiempo 0). Una vez realizado el control, se agregara una cantidad conocida de EEP (70% y al 96% para diferentes cultivos) a diferentes diluciones, y se procederá a cuantificar el porcentaje de lisis parasitaria en contacto con el propóleo en Cámara de Neubauer y su influencia en el tiempo (tiempo 1,2,3 ..n) (Hollands I. *et al.* 1988).

Porcentaje de lisis = $100 - ((100 \times \text{número de Chilomonas móviles al tiempo 1,2,3..n}) / \text{número de Chilomonas móviles al tiempo 0})$. Serán considerados positivos los ensayos que mostraron un porcentaje de lisis superior al 50 % (Amador *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2004).

4. RESULTADOS ESPERADOS

Los resultados esperados en el presente proyecto son:

- Conocer la CMI, CLP y la concentración que inhibe el plaqueo para cada uno de los modelos biológicos propuestos, a partir del EEP.
- Encontrar correlación de los propóleos según las zonas productoras y su acción frente a microorganismos.
- Dar valor agregado al producto, bajo la justificación científica de su acción biológica.
- Incluir al propóleo dentro de los productos diferenciados, buscando mejores alternativas de comercialización.
- Dar el sustento científico para posteriores investigaciones en el uso *in vivo* del propóleo con animales y seres humanos.
- Proveer al apicultor colombiano de una herramienta científica que promueva aún más el consumo ya tradicional del propóleo, como herramienta en el mejoramiento de la calidad de vida.
- Fortalecer el laboratorio de microbiología en el análisis de este tipo de pruebas para el fortalecimiento de la Cadena de las Abejas y la Apicultura.

5. BIBLIOGRAFIA

- AMADOR E. *et al.*, Proteasa dependiente de cisteína en *Trypanosoma cruzi* útil en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Rev cubana med trop; 50(1):75-81. 1998
- AMOROS M, LURTON F, BOWTIE J, *et al.* Comparison of the antiherpes simplex virus activities of propolis and 3-methylbut-2 enyl caffeate. J Nat Prod, 57, 644-7. 1994.
- BARRAGAN Y ORTIZ. Estudio de la actividad biológica del propóleo. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Tesis pregrado. 1988.
- DAVIS, DULBECCO, EISEN y GINSBERG. Microbiology. J.B. Lippincott Company, Filadelfia. p.789. 4º Edición., 1990.

- HOLLANDS I. *et al.* Control de la calidad de la Propolisina (extracto alcohólico de propóleos) utilizado como coccidiostático mediante un método biológico. Revista Cubana de Ciencias Veterinarias 19 (4) 319-326. 1988.
- MORENO Z., MARTINEZ P. Y FIGUEROA J. Efecto antimicrobiano In vitro de propóleos argentinos, colombianos y cubano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. NOVA - Publicación científica - ISSN:1794-2470 vol.5 no. 7 enero - junio:1-100 de 2007.
- PARK Y.K., M. IKEGAKI. y J.A. da SILVA ABREU. Estudo da preparação dos extratos de propolis e suas aplicações. Ciencia y Tecnología de Alimentos, 18(3): 313-318. 1998.
- QUIROGA E. N. *et al.*, Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. Journal of Applied Microbiology 101. 103–110. 2006.
- SOLANO y CORONADO. Actividad antibacteriana y antifúngica de propóleo nacional. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Tesis de pregrado. 2000.
- TOLOSA L, CAÑIZARES E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. Ars Pharmac.; 43:187-204. 2002.