

Caracterización antibacteriana del propóleo de los municipios de Madruga y Mariel de la Provincia la Habana

Autores:

Gisela Valdés **, Miguel Ruíz ** y Milena Martín **

RESUMEN

La acción antibacteriana del propóleo de los municipios de Mariel y Madruga de la provincia de la Habana fueron determinados en este trabajo .

Por ello se realizaron tres muestreos en épocas diferentes de cada municipio y se analizaron un total de 91 muestras de propóleo de diferentes apiarios.

El trabajo se realizó in vitro con extractos alcohólicos de propóleo mediante la técnica de doble difusión radial en medio agarizado frente a diferentes cepas .

Se obtuvo como resultado que todos los propóleos presentaron actividad antibiótica, donde fueron más efectivos frente a las bacterias gram positivas que gram negativas. Fue posible apreciar que la acción antibacteriana de los extractos, es igual o cercana en un mismo mes, de años diferentes y no fue posible ubicar zonas dentro de los municipios Mariel o Madruga que tengan una determinada efectividad, lo que permite constatar que hay gran diversidad de acción antibacteriana de los extractos de propóleo.

* Estación Experimental Apícola, Carretera El Cano, La Lisa, ciudad Habana.

* Trabajo presentado en el I Simposio sobre los Efectos del

Propóleo en la Salud Humana y Animal, Varadero, 25 de Marzo de 1988. Introducción

Es conocido en el mundo entero las propiedades antimicrobianas del propóleo, las cuales han sido reportadas por varios autores tales como Kivalkina (1948) y Hambleton (1958), citados por Lavie (1980); Lavie (1960), Akopian y col (1970), Cizmarik y Matel (1970), Marin (1974), Makashvili y col (1974). En nuestro país ya se han dado los primeros pasos encaminados al estudio tanto biológico, químico como terapéutico de este importante producto apícola donde se han obtenido resultados de sus propiedades antimicrobianas (Rojas y col 1987; Valdés y col 1985 y 1987) y como apiterapéutico en la terapia del asma bronquial e hipertensión (Giral y col 1987) y en estos momentos se están realizando estudios del efecto del propóleo sobre otras afecciones en el hombre.

Con el fin de caracterizar el propóleo cubano desde el punto de vista antibacteriano, nos propusimos en este trabajo el estudio de extractos alcohólicos de propóleo de diferentes apiarios, los cuales se enfrentaron a un grupo de bacterias gram positivas y gram negativas, con vista a conocer la potencialidad del propóleo de las diferentes regiones del país para posibilitar su explotación encaminada a este fin.

Materiales y Métodos

Los microorganismos empleados en este trabajo fueron cepas gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC, *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium*), y cepas gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp y *Proteus mirabilis*).

Muestras de propóleo : Las muestras fueron seleccionadas aleatoriamente de diferentes apiarios de la Provincia La Habana. Fueron estudiadas 44 muestras de propóleo del

municipio Mariel y 47 del municipio de Madruga recolectadas en diferentes épocas (febrero de 1986, noviembre de 1986 y febrero de 1987).

Se prepararon extractos alcohólico de propóleo a una concentración de 1:6 en alcohol al 70% manteniéndolo en maceración por 72 hrs y temperatura ambiente.

Como inóculo se empleó suspensión bacteriana a una concentración similar al tubo No 2 de la escala de Mc.Farland en solución salina fisiológica estéril.

La actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión radial de doble capa en medio agarizado (Grove y Randall 1955), con cortes cilíndricos.

Todo el trabajo se realizó en paralelo, la predifusión se realizó a 4-10°C por 3-4 hrs, la incubación se realizó a 37°C por 24 hrs, al cabo de las cuales se efectuaron las lecturas de los halos de inhibición en mm. Se emplearon como controles, solución de alcohol al 70%.

Como análisis estadístico, se empleó un factorial de doble entrada completamente aleatorizado, análisis de varianzas y test de Duncan para el procesamiento de los resultados.

Resultados y Discusión

Los análisis estadísticos realizados a los resultados de cada uno de los muestreos frente a las cepas estudiadas, arrojó que hay una gran diferencia significativa entre los apiarios, correspondiente a un mismo muestreo dentro de una misma región (Madruga o Mariel), no fue posible ubicar zonas dentro de los municipios que aportaran muestras de propóleo de una determinada efectividad, es necesario destacar que apiarios cercanos difieren significativamente y apiarios distantes no difieren en cuanto su acción frente a las cepas estudiadas.

Esto se puede deber a la transhumancia que se establecen en las brigadas apícolas, sin un previo raspado del propóleo, lo que conlleva a que las muestras recogidas no sean características de la zona en que se recoge, si no que haya una mezcla de zonas diferentes. También este efecto se pudiera deber a que el lugar que estén ubicados los apiarios tengan o no una floración similar (bosques, praderas, cultivos, etc.).

En todos los casos el control con solución de alcohol al 70% no inhibió el crecimiento de los microorganismos.

En la tabla 1 y 2 se muestran los promedios de los halos de inhibición obtenidos de los extractos de propóleo de los tres muestreos de Madruga y el % de efectividad de los mismos frente a cada una de las cepas.

Donde se observa que las bacterias gram positivas estudiadas para el muestreo I, el *B.subtilis* resultó ser la cepa más sensible estadísticamente probado, le siguen el *S.epidermidis* y por último el *S.aureus* ATCC.

Para el muestreo II el *B.subtilis* y el *S.epidermidis* no difieren entre sí y fueron las más sensibles, no sucedió así con el *S.aureus* ATCC, el cual reportó un valor de halo de inhibición por debajo de lo estudiado hasta el momento, no todos los propóleos fueron efectivos solo el 45% de los extractos sobre esta cepa. En el muestreo III las cepas más sensibles fueron el *B.subtilis* y *S.aureus* ATCC, la media más baja correspondió al *S.epidermidis*.

Todas estas cepas fueron inhibidas por el 90-100 % de los extractos, con excepción del *S.aureus* ATCC frente a los propóleos del muestreo II.

En cuanto a las bacterias gram negativas se observa en dicha tabla que para ninguno de los 3 muestreos fueron efectivos los propóleos sobre las cepas de *E.coli* P.auriginosa y *Shigella* spp no siendo inhibida por ninguno de los extractos.

A pesar de estos resultados *Salmonella* spp fue la más efectiva para los muestreos I y II ya que reportó un valor de halo de inhibición superior.

Al comparar los 3 muestreos de Madruga frente a cada grupo de microorganismos empleados, dió como resultado que difieren significativamente para un 99.9 % de probabilidad. (ver tabla #5)

Cuando se aplicó el Test de Duncan para el 95 % coinciden que para ambos grupos de microorganismos todos los muestreos difieren entre sí, en cuanto a su efectividad, donde el muestreo I fué el más efectivo seguido del III y el II como el menos efectivo. Es de señalar que a pesar de que difieren dichos muestreos (I y III) están cercanos en cuanto a su efectividad, lo que pudiera indicar que como estos fueron recolectados en el mismo mes (febrero), aunque de años diferentes por lo que la flora en este período del año están cercanas en cuanto a su composición, tenemos el inconveniente de tener efectos confundidos ya que los apiarios en su gram mayoría no coinciden en las tres épocas del año.

En la tabla 3 y 4 se encuentran los resultados obtenidos de los extractos de propóleo recolectados en el municipio Mariel frente a las diferentes cepas. Para el muestreo I frente a las bacterias gram positivas, se observa que se obtuvieron valores del halo de inhibición superiores a todos los demás muestreos y la efectividad fué del 100 %, excepto para el *S.epidermidis* que fué del 83.3 %, la sensibilidad de estas cepas para este muestreo no difieren.

Para los demás muestreos frente a este grupo de microorganismos el *B.subtilis* fué la cepa más sensible estadísticamente probado y la que mayor halo de inhibición reportó, también para el muestreo I.

Para las bacterias gram negativas el muestreo I fué el único que reportó efectividad sobre las cepas *E.coli*, *P.aeruginosa* y *Salmonella* spp, con un % de efectividad del 15,40 y 20 % respectivamente.

Frente a la *Salmonella* spp a excepción del muestreo 3 que reportó un 100 % de efectividad, en los demás casos fué para el muestreo I del 30 % y para el muestreo II fué nula. Al comparar los tres muestreos del Mariel frente a los dos grupos de microorganismos empleados, (ver tabla #5), obtuvimos como resultado que frente a las bacterias gram positivas no existe diferencia significativa entre los tres muestreos, es decir la efectividad se comporta de forma igual, lo que permite inferir que la floración circundante en esos apiarios se comporta similar en las tres épocas estudiadas.

Sin embargo frente a las bacterias gram negativa existen diferencias significativas entre los muestreos, para un 99 % de probabilidad donde el muestreo I y III no difiere entre sí, siendo los más efectivos, diferenciando ambos del muestreo II. Lo que permite pensar que la composición floral coinciden en el mes de febrero de un año a otro frente a estas cepas. Es de destacar que tanto para Madruga como para Mariel es significativo que la media de los valores de halo de inhibición fué similar o mayor al de las cepas *Proteus mirabilis* y *Salmonella* spp con los obtenidos en las gram positivas, no obstante a esto es evidente que todos los extractos probados fueron más efectivos sobre las bacterias gram positivas que sobre las gram negativas (ver fig.#1 y 2). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Vajovina (1975) y Večet (1975).

Además se observa que los muestreos de ambas regiones se comportan de forma similar frente a cada grupo de microorganismos, es decir su acción fué similar. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Janes (1975), que reportó la existencia similar de todos los propóleos.

Al igual que Kivalkina (1976), suponemos que como los principales componentes naturales del propóleo, son las sustancias resinas, que no son idénticas en diferentes especies botánicas, es posible suponer que la acción antimicrobiana de los diferentes extractos

de propóleos es también distintos. Sin embargo no encontramos ningún caso que no manifestara su acción antimicrobiana.

Conclusiones

- 1.- No es posible en este trabajo determinar zonas dentro del mismo municipio con determinada efectividad.
- 2.- Todos los extractos de propóleo tienen actividad antimicrobiana.
- 3.- La cepa *B.subtilis* fue la más sensible en la mayoría de las muestras y en todos los casos la de mayor valor de halo de inhibición reportó, siendo inhibida por el 100 % de los extractos.
- 4.- La cepa *Proteus mirabilis* fue la única cepa gram negativa que fue inhibida por el 100 % de los extractos.
- 5.- Las cepas de *E.coli*, *Ps. aeruginosa* y *Shigella spp* fueron inhibidas por 15; 40 y 20 % respectivamente de los extractos del muestreo I del Mariel.
- 6.- Para ambos municipios el muestreo II no fue efectivo sobre la cepa *Salmonella spp*.
- 7.- Frente a las bacterias gram positivas la muestra del Mariel tiene igual efectividad.
- 8.- Para los muestreos del Mariel frente a las cepas gram negativa y para los de Madruga frente a ambos grupos microorganismos estudiados, se pone de manifiesto que la efectividad antibacteriana del propóleos es igual o cercana en un mismo mes de años diferentes. ambas regiones.
- 9.- Frente a ambos grupos de m.o. los extractos de ambas regiones se comportan de forma similares.
- 10.- Fueron más efectivo los propóleos sobre las cepas gram positivas que sobre las gram negativas.

Recomendaciones

- 1.- Antes de realizar la transhumancia de las colmenas, debe llevarse a cabo un raspado de todo el propóleo posible, con el fin de evitar mezclas de propóleo de diferentes lugares lo que interfiere en el estudio y caracterización en todos los campos de esta sustancia.
- 2.- Realizar estudios encaminados a conocer la relación exacta de las propiedades biológicas del propóleos, su posible origen floral, lo cual posibilitaría explotar a un mayor nivel nuestra potencia apícola.

Agradecimientos

A los compañeros Humberto Torres y Radilio Díaz del Establecimiento de Prov. Habana, y a todos los apicultores de la brigada Mariel y Madruga. Así como al Lic. Guillermo Valdés, por la colaboración prestada para la realización de este trabajo.

ABSTRACT:

The antibacterial action of propolis from the municipalities of Mariel and Madruga in the province of Havana was determined by this work.

Three samplings were carried out in different seasons in each municipality and it was analyzed a total amount of 91 samples of propolis from different apiaries.

This work was in vitro using alcoholic extracts of propolis, following the technique of the double radial diffusion in agar with different stumps.

The results demonstrated that all propolis showed an antibiotic activity and they proved to be

more effective against the gram positive and gram negative bacterias. It could be appreciated that the antibacterial action of the extracts is the same or almost the same within a month in different years; and it was not possible to locate specific zones or areas in the municipalities of Mariel and Madruga which have a determinate effectiveness. This makes possible to infer the diversity of antibacterial action of propolis extracts.

TABLA #1. RELACION DE LOS HALOS DE INHIBICION PARA LOS MUESTREOS DE MADRUGA FRENTE A LAS CEPAS.

CEPAS	MUESTREOS			
	X	I	II	III
GRAM Positi- vas				
B.subtilis	19.84	13.95	16.25	
S.aureus	14.45	5.5	15.5	
S.epidermidis	15.34	13.95	12.12	
GRAM Negati- vas				
E. coli	0	0	0	
Shigella spp	0	0	0	
Salmonella spp	23.10	0	14.41	
Ps.aeruginosa	0	0	0	
P.mirabilis	19.95	13.1	11.41	

Tabla #2. PORCIENTO DE EFECTIVIDAD DE CADA UNO DE LOS MUESTREOS DE MADRUGA

CEPAS	MUESTREOS		
	I	II	III
Efectividad			
GRAM + B.subtilis	100.0	100.0	100.0
Positivo S.aureus	97.1	45.4	100.0
vas S.epidermidis	91.3	100.0	100.0
GRAM - E. coli	0	0	0
Negativo Shigella spp	0	0	0
vas Salmonella spp	100.0	0	100.0
Ps.aeruginosa	0	0	0
P.mirabilis	100.0	100.0	100.0

TABLA #3. RELACION DE LOS HALOS DE INHIBICION PARA LOS MUESTREOS DE MARIEL FRENTE A LAS CEPAS.

CEPAS	MUESTREOS			
	X	I	II	III
GRAM + B.subtilis	22.9	17.6	17.0	
Positivo S.aureus	20.3	16.7	16.3	
vas S.epidermidis	19.64	NP	15.32	
B.megaterium	19.0	NP	NP	
GRAM - E. coli	10*	0	0	
Negativo Shigella spp	15.6*	0	0	
vas Salmonella spp	12.13*	0	16.1	
Ps.aeruginosa	10.10*	0	0	
P. mirabilis	17.26	18.37	17.7	

Leyenda: NP - no probado

Tabla #4. PORCIENTO DE EFECTIVIDAD DE CADA UNO DE LOS MUESTREOS

DE MARIEL

CEPAS		MUESTREOS		
Efectividad		I	II	III
GRAM	B.subtilis	100.0	100.0	100.0
Positi-	S.aureus ATCC	100.0	100.0	100.0
vas	S.epidermidis	83.3	NP	100.0
	B.megaterium	100.0	NP	NP
GRAM	E. coli	15.0	0	0
Negati-	Shigella sp	0	0	0
vas	Salmonella sp	30.0	0	100.0
	Ps.auriginosa	40.0	0	0
	Prot.mirabilis	100.0	100.0	100.0

TABLA #5. DATOS DEL PROCESAMIENTO ESTADISTICOS DE LAS MUESTRAS DE MARIEL Y MADRUGA.

F	Cv	MUESTREO	X	n	X
xxx		I	16.3 a	138	
Gram	32,3 %	Madruga	II	14.6 b	72
Positivas	16.53		III	12.2 c	64
xxx		I	12.3 a	161	
Gram	101.7%	Madruga	II	7.3 b	84
Negativas	21.09		III	3.9 c	66
ns		I	17.3	135	
Gram	27.4%	Mariel	II	17.1	48
Positivas	1.37		III	16.2	72
xx		I	9.6 a	84	
Gram	101.6%	Mariel	II	9.1 a	130

Bibliografía

- 1.- Akopian, SM; Shakarian, G.A y Danielian, S.G. "Chuvstnitel'nost mikroorganizmovk propolisa v niekotorig oblastiaj Arnuanskoi SSR". Bioloquicheskii Zhurnal Armeii 23 (9):70-74, 1970.
- 2.- Cizmarik, I y Matel, Y. "Examination of the chemical composition of propolis. I. Isolation and identification of the 3,4- dihidroxicinamic acid (caffeic acid) from propolis". a Experimenti 26(4):731, 1970.
- 3.- Grove, D.C. y Randall, W.A. "Assa y methods of antibiotics, A Laboratory Manual, Medical Encyclopedia, Inc. New York (1955).
- 4.- Janes. K. "El propóleos y algunas de sus propiedades". Propóleos. Apimondia Bucarest 1975.
- 5.- Kivlakina VP. "Balance y perspectiva de la investigación del propóleos. II Simposio

- Internacional de Apiterapia. Apimondia Bucarest 1976.
- 6.- Lavie, P. " Le substances antibacteriennes dans la colonie d'abeille. *Apis mellifica* L. Universit'e de Paris, theses doctoraux, *Annales de L'Abeille* 3:103-183, 201-305, 1960.
 - 7.- Lavie, P. "Propiedades antibióticas, antifúngicas y fitoinhedorias del propóleo". *Apiacta* N° 3, 108-114, 1980.
 - 8.- Makashvili, Z.A; Katsitadze, G.K; Sakvarelidze, N.K. "Antimikrobnie suetva propolisa". *Pechelovodstvo*, 10:28, 1974.
 - 9.- Marin, M. "Terapia con propóleo". Simposio Apimondia de Apiterapia. Madrid, 1974.
 - 10.-Rojas, N.M; Valdès, G.G y Morales, C.V. Actividad antibacteriana de extractos acuosos y alcohólicos de propóleos. *Revista Biología* Vol. I, N° 3, 1987.
 - 11.- Vajonina, T. "Los macrocomponentes del propóleos y sus cualidades antimicrobianas". *Propóleos Apimondia*. Bucarest 1975.
 - 12.- Valdès, G.G; Rojas, N.M y Morales, C.V. Estudio comparativo de la acción antimicrobiana del propóleos con antibióticos y desinfectantes convencionales. *Ciencia y Técnica. Apicultura*, Vol I, Agosto 1985.
 - 13.- Valdès, G.G; Rojas, N.M y Morales, C.V. Ensayo preliminar de la acción de extractos de propóleos sobre *Candida albicans*. *Ciencia y Técnica. Apicultura*, Vol I, 1987.
 - 14.- Vechet, L. " Efectos del propóleo en algunas especies de microorganismos y mohos". pàg 49, *Propóleos*. Apimondia Bucarest, 1975.