

Compuestos fenólicos y flavonoides en la actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos

Rodríguez Pérez Betsabé¹, Canales Martínez Margarita², Cruz Sánchez Tonatiuh Alejandro¹, Penieres Carrillo José Guillermo¹

¹Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Carretera Cuautitlán-Teoloyucan Km. 2.5, San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, C.P. 54714. México.

²Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad de Biotecnología y Prototipos. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Av. de los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, CP. 54090, México.

*Autor para correspondencia: berope380@hotmail.com

Recibido:

15/junio/2017

Aceptado:

02/agosto/2017

Palabras clave

Propóleos, actividad antimicrobiana, flavonoides

Keywords

Propolis, antimicrobial activity, flavonoids

RESUMEN

El propóleo es una mezcla compleja que las abejas *Apis mellifera* recolectan a partir de la vegetación circundante a su colmena, por lo que su composición química es variable siendo de gran importancia los compuestos fenólicos y flavonoides que le confieren actividad antimicrobiana. En el presente trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de dos extractos etanólicos de propóleos (EEP) del Estado de México y Guanajuato frente a cepas de referencia: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Aspergillus flavus* (cepa clínica) y se presentan los resultados obtenidos. El análisis mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM), permitió la detección de flavonoides en el EEP del Estado de México y componentes de aceites esenciales en el EEP de Guanajuato.

ABSTRACT

Propolis is a complex mixture that *Apis mellifera* bees collect from the surrounding vegetation to their hive, reason why its chemical composition is variable being of great importance the phenolic compounds and flavonoid that give it antimicrobial activity. The present study evaluated the antimicrobial activity of two ethanolic extract of propolis (EEPs) from the State of Mexico and Guanajuato against reference strains: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Aspergillus flavus* (clinical strain) and the results obtained are presented. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis allowed the detection of flavonoids in the EEP of the State of Mexico and essential oils in the EEP of Guanajuato.

Introducción

El propóleo es un material resinoso que las abejas *Apis mellifera* elaboran a partir de exudados de la vegetación circundante a la colmena y tiene en ella fines desinfectantes, reducir vías de acceso y para consolidar sus componentes estructurales (Bankova, 2005).

El propóleo se caracteriza por poseer propiedades antioxidantes y antimicrobianas, las cuales son atribuidas a la presencia de compuestos fenólicos, principalmente flavonoides (Sforcin y Bankova, 2011), que son compuestos que en su estructura química básica tienen un número variable de grupos hidroxilo; además, poseen un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilo (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano. Estos compuestos difieren en concentración, dependiendo del origen geográfico y botánico del propóleo, y actividad biológica.

La actividad antimicrobiana es una de las propiedades fundamentales constatadas en los propóleos, lo cual se puede constatar por la existencia de múltiples estudios bacteriológicos *in vivo* e *in vitro* de ellos, donde se ha confirmado su acción bacteriostática y bactericida que involucra la inhibición de ácidos nucleicos y degradación de la membrana citoplasmática principalmente debido a los flavonoides: acetina, apigenina, crisina, galangina, kaempferol, naringenina, pinobanksina, pinoembrina y quercetina (Vargas et al., 2014).

Por tales motivos, los propóleos son usados en la industria farmacéutica, agrícola, cosmética y alimentaria, entre otras (Matsuka, 2000; Soto, 2015).

Metodología

Recolección de propóleos

El muestreo de propóleos en greña se efectuó en forma aleatoria de diferentes colmenas de apiarios del Estado de México y Guanajuato. Posteriormente, se eliminaron las impurezas presentes y el material fue almacenado en frascos ámbar y conservado a -4 °C hasta su análisis. Se realizó la evaluación del color, olor, aspecto y consistencia a temperatura ambiente (Rodríguez, 2015)

Especificaciones químicas

Preparación de los extractos etanólicos (EEP)

Las muestras se colocaron en etanol al 70% para someterlas a extracción por la técnica de sonicación (Trusheva et al., 2007). Pasado este tiempo, se filtró y

el extracto resultante se concentró a vacío y se dejó a sequedad utilizando una bomba de vacío, protegido de la luz. Los EEP obtenidos se almacenaron en viales ámbar y se refrigeraron a -4°C hasta su posterior evaluación (Gutiérrez, 2011).

Contenido de fenoles totales

Los compuestos fenólicos fueron determinados por el método de *Folin-Ciocalteu*. Se utilizó ácido gálico como referencia para la curva de calibración y los resultados se expresaron como mg de ácido gálico/g de EEP (González, 1997; Kuropatnicki et al., 2013).

Contenido de flavonoides

El contenido de flavonoides se realizó utilizando $AlCl_3$ para formar un complejo colorido. Se utilizó quercetina como referencia para construir la curva de calibración y los resultados se expresaron como mg de quercetina/g de EEP (González, 1997; Kuropatnicki, 2013).

Propiedades antioxidantes

La capacidad para capturar radicales libres de los extractos fue determinada utilizando como referencia la disolución de 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH). Se expresó como la capacidad antioxidante (CA_{50}) en $\mu g/mL$, lo que corresponde a la cantidad de radical DPPH neutralizado por el extracto a una determinada concentración (Kuropatnicki et al., 2013)

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

Se realizó esta técnica en un cromatógrafo de gases (Modelo 6850) acoplado a un espectro de masas (Modelo 5975C) marca *Agilent Technologies*. Se utilizó una columna HP-5MS de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro y grosor de película de 0.25 mm (Gutiérrez, 2011).

Actividad antimicrobiana

Los microorganismos evaluados fueron: la bacteria Gram negativa (*Escherichia coli* ATCC 8739), la bacteria Gram positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC B-1005), el hongo levaduriforme (*Candida albicans* ATCC 14065) y el hongo filamentoso (*Aspergillus flavus* cepa clínica).

Se utilizó el método de difusión en agar en disco de *Kirby-Bauer* (para *A. flavus* se utilizó el método de inhibición de crecimiento radial). Se impregnaron discos de papel Whatman de 6 mm previamente esterilizados, con 6 mg

de EEP, como control negativo se utilizó etanol al 70% y como controles positivos, se utilizaron antifúngicos y antibióticos comerciales (Londoño et al., 2010; CLSI, 2008).

Resultados y discusión

Especificaciones físicas

El color constituye una de las características organolépticas más importantes para clasificar a los propóleos de diversos orígenes (Lozina et al., 2010). Ambos propóleos en greña tuvieron color marrón verdoso con tintes amarillos y los EEP presentaron color marrón (figuras 1 y 2).



Figura 1. Propóleo del Estado de México. A. Vista macroscópica, B. Vista con microscopio estereoscópico (0.8 X), C. Extracto etanólico.

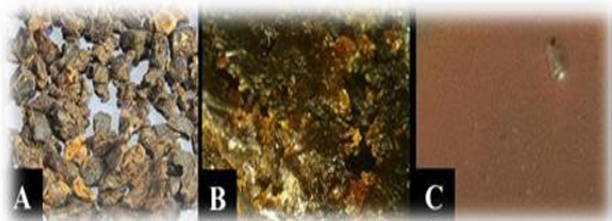


Figura 2. Propóleo del Estado de Guanajuato. A. Vista macroscópica, B. Vista con microscopio estereoscópico (0.8 X), C. Extracto etanólico.

Composición química

En los últimos años diversas investigaciones han destacado al propóleo como un antioxidante de origen natural, para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades de origen oxidativo (Farré et al., 2004).

La cuantificación de fenoles y flavonoides mostró que el EEP del Estado de México presentó mayor cantidad de dichos compuestos y los resultados cromatográficos (Tabla 1) indican la presencia de quercetina en su composición, lo que se corrobora con una mejor capacidad antioxidante como lo reporta Quiñones et al., 2012. Este flavonoide posee mayor actividad neutralizadora de radicales libres por el grupo fenólico que posee al actuar

directamente capturando electrones desapareados, neutralizando especies reactivas de oxígeno (ERO) y puede quelatar iones metálicos de transición como el hierro o el cobre (Vargas et al., 2014).

El EEP de Guanajuato no contiene en su composición algún flavonoide, lo que indica que su propiedad antioxidante es baja, ya que solo se identificó un componente de aceite esencial.

EEP	Fenoles (mg AG/g EEP)	Flavonoides (µg Q/g EEP)	CA ₅₀ (µg/mL)	Compuestos propuestos (CG-EM)
Edo. de México	281 ± 0.0008	0.0043 ± 0.341	1.74	Pinocebrina, Kaemferol, Crisina y Quercetina
Gto.	29.1 ± 0.0001	0.0025 ± 0.073	2.93	(E)-α-Damascona (Aceite esencial)

Tabla 1. Contenido de fenoles y flavonoides y propiedad antioxidante de los propóleos estudiados.

Actividad antimicrobiana

Nuestros resultados confirman lo reportado por Sagdic et al., 2007, ya que en las concentraciones de propóleos evaluadas no se presentó efecto alguno sobre la bacteria Gram negativa, *E. coli*. Mientras que en la bacteria Gram positiva, *S. aureus* se encontró la más alta efectividad (figura 3). Esta actividad fue correlacionada con la presencia de crisina y pinocebrina. Mirzoeva et al., 1997, demostraron que la quercetina y naringenina incrementan la permeabilidad y disipan el potencial de la membrana bacteriana (fuerza motriz de protones), disminuyendo la resistencia bacteriana a los antibióticos, así como la inhibición de la motilidad bacteriana, factor importante en la virulencia.

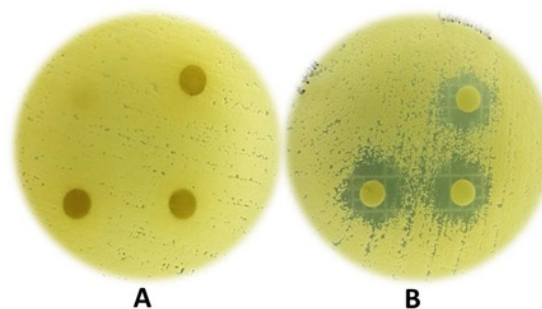


Figura 3. Método de difusión en agar en disco de Kirby-Bauer. A. EEP de Guanajuato frente a *E. coli* sin efecto bactericida ni bacteriostático. B. Halo de inhibición con 6 mg del EEP del Edo. de México frente a *S. aureus* demostrando efecto bactericida.

Actividad antifúngica

Ninguno de las muestras presentó actividad frente a *C. albicans* (responsable de candidiasis vaginal y oral) ni a *A. flavus* (hongo que produce micotoxinas en granos de semillas al estar almacenados en ambientes húmedos).

Conclusiones

Los principales factores que determinan la presencia o ausencia de fenoles y flavonoides en el propóleo son la flora del área donde es recolectado, el tipo de abeja, factores ambientales y la época de recolección,

La capacidad antioxidante y antimicrobiana de los extractos de propóleos se atribuye a la presencia de un alto contenido de compuestos fenólicos, principalmente flavonoides y ácidos fenólicos, y a la posible interacción individual o sinérgica de cada una de las estructuras que los conforman. Estos metabolitos son considerados indicadores de calidad por los entes reguladores de la producción de propóleos en países, como Brasil, Argentina, entre otros.

Es importante que en México se fomente la producción de propóleos mediante sistemas de producción que permitan una recolección y procesamiento de manera estandarizada, para garantizar que su composición química no se altere en perjuicio de sus propiedades y sea un beneficio económico para el sector apícola.

A escala mundial, la venta anual de propóleos alcanza unos seis mil millones de dólares. Los principales exportadores de esta resina son los países latinoamericanos, pero México no forma parte de este bloque (aunque sus productos son de calidad y superan los parámetros internacionales) debido a la falta información, capacitación y producción nacional.

El costo promedio de un kilogramo de propóleos en nuestro territorio es de 750 pesos, mientras que su precio internacional es de 100 dólares, por lo que un apicultor por cada kilogramo obtendría un beneficio de hasta cinco mil pesos, en promedio, lo que representaría una ganancia de poco más de 4 mil pesos.

Agradecimientos

A los proyectos PAPIIT IT200915, PI-API1632, PI-API1618 y beca CONACYT por el apoyo recibido.

Referencias

Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, 100:114-117.

CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (2008). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. Approved Standard-Second Edition. *CLSI Document M38-A*, 28 (16): 5-15.

Farré, R., Frasset, I., Sánchez, A. (2004). El propolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*. 45(1): 23-43.

González G. A. (1997). Propóleos: un camino hacia la salud. 1ª Ed. Pablo de la Torre, 94-117.

Gutiérrez E. (2011). Actividad antibacteriana y perfil químicos de propóleos mexicanos sobre cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de conejos. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Kuropatnicki, A., Szliszka E., Wojciech, K. (2013). Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013: 1 - 11.

Londoño O. A.; Ávila A. J.; Canales M. M., Hernández D, C.; Serrano, R.; Flores O, C.; Durán D, A.; Penieres C, J.; García T. C. & Cruz S. T. (2010). Antibacterial comparative study extracts of Mexican propolis and of three plants which use *Apis mellifera* for its production. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9: 1250 - 1254.

Lozina, L.; Peichoto, M.; Acosta, O., Granero, G. (2010). Estandarización y Caracterización organoléptica y Físico-Química de 15 Propóleos Argentinos. *Latin American Journal of Pharmacy*, 29, 102 - 110.

Matsuka, M. (2000). Criteria of propolis in Japan. Japan Propolis Conference. Tokio: *Japan Health Food and Nutrition Food Association*, 4.

Mirzoeva, O.K., Grishanin, R.N. y Calder, P.C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiology Research*, 152: 239-46.

Quiñones, M. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1): 76 - 89.

Rodríguez B. (2015). Perfil químico de propóleos mexicanos para su aplicación en Medicina Veterinaria. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Sagdic, O., Silici, S., Yetim, H. (2007). Fate of *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in apple juice treated with propolis extract. *Annals of Microbiology*, 57(3): 345-348.

Sforcin, J. Bankova, V. (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 253 - 260.

Soto V.M. (2015). Metabolitos secundarios, cuantificación de fenoles y flavonoides totales de extractos etanólicos de propóleos de tres localidades del Perú. *In Crescendo. Institucional*; 6(2): 22-32.

Trusheva, B., Trunkova, D., Bankova, V. (2007). Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, 1:13.

Vargas-S. R., Torrescano U. G., Mendoza W. A., Vallejo G., Acedo F. E., Sánchez E. J., Peñalba G. M., Sánchez E. A. (2014). Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleos. *Bioteconia*, XVI (1): 32-37.