



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE PROPÓLEOS DE MAGDALENA DE KINO Y SONOYTA, SONORA

ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF PROPOLIS METHANOLIC EXTRACTS FROM MAGDALENA DE KINO AND SONOYTA, SONORA

Moisés Navarro-Navarro*¹, Ramón Efraín Lugo-Sepúlveda², María del Carmen García-Moraga², Rafael de la Rosa-López², Ramón Enrique Robles-Zepeda¹, Eduardo Ruiz-Bustos¹, Carlos Arturo Velázquez-Contreras¹

¹Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Universidad de Sonora, Unidad Regional Centro, Rosales y Luis Encinas, CP 83,000, Hermosillo, Sonora, México.

²Departamento de Ciencias Químico Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Sonora, Unidad Regional Norte, Avenida Universidad e Irigoyen, CP 83600, H. Caborca, Sonora, México.

RESUMEN

Se evaluó la actividad antibacteriana y antioxidante de propóleos procedentes de Magdalena de Kino (MKP) y Sonoyta (SP), dos regiones del estado de Sonora en el noroeste de México. Las actividades antibacterianas y antioxidantes se determinaron por los métodos de microdilución en caldo y DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracilo) respectivamente. MKP y SP presentaron una mayor actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae* y escasa actividad frente a *Escherichia coli*. MKP mostró la mayor actividad frente a *S. aureus*, seguido de *V. cholerae* y *E. coli* con una concentración mínima inhibitoria (CMI₉₀) de 200,0 µg/mL, 400,0 µg/mL y >400,0 µg/mL respectivamente. SP presentó una CMI₉₀ >400,0 µg/mL frente a cada uno de los microorganismos ensayados. Además, MKP exhibió moderada actividad antioxidante (35,0±0,4% a 100 µg/mL) en comparación con la vitamina C (94,0±0,1% a 70,0 µmol/L). SP presentó menor actividad antioxidante (4,0±0,1% a 100 µg/mL). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo permiten una caracterización parcial de la actividad biológica de MKP y SP. Los extractos metanólicos de propóleos de Magdalena de Kino y Sonoyta presentan una

buena a moderada actividad antibacteriana frente a *S. aureus*, *V. cholerae* y *E. coli*, así como una baja a moderada actividad antioxidante.

Palabras clave: actividad antibacteriana, antioxidante, propóleos.

ABSTRACT

The antibacterial and antioxidant activities of propolis collected from two different areas of Sonora State [Magdalena de Kino propolis (MKP), and Sonoyta propolis (SP)] in northwestern Mexico were evaluated. The antibacterial and antioxidant activities of MKP and SP were determined by the broth microdilution method and the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) assay, respectively. Both propolis samples showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Vibrio cholerae* and scarce activity against *Escherichia coli*. The MKP showed the highest antibacterial activity against *S. aureus*, followed by *V. cholerae* and *E. coli* with a minimal inhibitory concentration (MIC₉₀) of 200.0 µg/mL, 400.0 µg/mL and >400.0 µg/mL, respectively. The MKP sample showed antibacterial activity against *V. cholerae* (MIC₉₀ 400,0 µg/mL). The SP exhibited MIC₉₀ of >400.0 µg/mL against all the microorganisms studied. Additionally, MKP ex-

*Autor para correspondencia: Moisés Navarro Navarro
Correo electrónico: moisesn@guayacan.uson.mx

Recibido: 26 de junio de 2012

Aceptado: 14 de septiembre de 2012

hibited moderate antioxidant activity ($35.0 \pm 0.4\%$ at $100 \mu\text{g/mL}$) in comparison with that of vitamin C ($94.0 \pm 0.1\%$ at $70.0 \mu\text{mol/L}$). Low values of antioxidant activity were obtained for SP ($4.0 \pm 0.1\%$ at $100 \mu\text{g/mL}$). These results allow for a preliminary biological activity characterization of MKP and SP. These methanolic extracts have a good to moderate antibacterial activity against *S. aureus*, *V. cholerae* and *E. coli*, and a low to moderate antioxidant activity.

Keywords: antibacterial activity, antioxidant, propolis.

INTRODUCCIÓN

Las abejas (*Apis mellifera* L.) recolectan resinas excretadas en yemas, hojas y exudados de plantas cercanas a la colmena y las mezclan con cera para formar lo que se conoce como propóleos (Sahinler y Kaftanoglu, 2005). Los propóleos han sido utilizados para el tratamiento de diversas enfermedades en la medicina tradicional de diversos pueblos en muchas regiones del mundo (Bankova, 2005). Estudios recientes han demostrado que los propóleos poseen actividad antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiinflamatoria, anticancerígena, hepatoprotectora y antioxidante, lo que ha generado gran interés en la industria farmacéutica (Farré, 2004; Bankova, 2005). La composición química de los propóleos y su actividad biológica depende del tipo de vegetación que se encuentra en un radio de 3 a 4 kilómetros alrededor de la colmena (Bosio *et al.*, 2003). Diversos informes indican que las muestras de propóleos de Europa, América del Sur y Asia presentan diferente composición química y actividad biológica (Bankova *et al.* 2002; Salomao *et al.* 2004; da Silva *et al.* 2006), pero son pocos los estudios provenientes de regiones áridas y semiáridas del continente americano (Wollenweber y Buchmann, 1997; Muñoz *et al.* 2001; Russo *et al.* 2004). Los propóleos son utilizados como aditivos en bebidas y alimentos y como suplementos nutricionales para mejorar la salud y prevenir enfermedades (Banskota *et al.* 2001). Por lo anterior, existe el interés por estudiar la actividad biológica de

propóleos recolectados de diferentes regiones del Estado de Sonora, México. El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antibacteriana de dos extractos metanólicos de propóleos de las regiones de Magdalena de Kino y Sonoyta, Sonora frente a *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*, especies bacterianas que pueden causar enfermedad en el ser humano y se les ha relacionado con multirresistencia a los antibióticos (Foster, 2004; Rodríguez-Baño y Navarro, 2008; Kitaoka *et al.* 2011), así como su actividad antioxidante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Propóleos

Se recolectaron durante el mes de abril de 2009 por el método de raspado de colmenas ubicadas en las regiones de Magdalena de Kino ($30^{\circ}36'41.8''\text{N}; 110^{\circ}57'32.7''\text{W}$) y Sonoyta ($31^{\circ}51'43.9''\text{N}; 112^{\circ}50'36.2''\text{W}$), Sonora, a 770 y 386 metros sobre el nivel del mar respectivamente. Las muestras se almacenaron en la oscuridad a -20°C .

Extractos Metanólicos de Propóleos (EMP)

Las muestras de propóleos, previamente maceradas, se sometieron a extracción con 300 mL de metanol, en agitación, a temperatura ambiente por 24 horas. Después de su filtración con papel filtro, el metanol fue evaporado en un rotavapor y posteriormente en un horno al vacío a 40°C por 24 horas. Los EMP se almacenaron en la oscuridad a -20°C (Velazquez *et al.*, 2007). Antes de los ensayos, 50,0 mg de los EMP se disolvieron en 1,0 mL de dimetilsulfóxido (Merck) hasta una concentración final de $50,000 \mu\text{g/mL}$.

Cepas Bacterianas

Escherichia coli ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P fueron donadas por el cepario del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora. *Vibrio cholerae* no O1 fue donado por el Laboratorio Estatal de Salud Pública. Las cepas bacterianas fueron conservadas a -20°C en caldo BHI con glicerol al 15,0%.

Actividad Antibacteriana

Se determinó utilizando el método de microdilución en caldo (Velazquez *et al.*, 2007). Se tomaron por triplicado 200 µL de cada una de las concentraciones de los propóleos y se depositaron en microplacas de 96 pozos de fondo plano. A un conjunto de estos pozos se les adicionó el inóculo bacteriano y se preparó otro conjunto sin bacterias. Además se prepararon tres pozos con 200 µL de caldo de cultivo conteniendo el antibiótico gentamicina (12 µg/mL), tres pozos con 200 µL de caldo de cultivo con la máxima concentración de solvente al que las bacterias estuvieron expuestas en los pozos de prueba y tres más con caldo de cultivo como control de esterilidad. Los pozos de prueba y los controles se inocularon con 15 µL de una suspensión bacteriana previamente estandarizada (10⁸ UFC/mL). Después de la inoculación, la placa se incubó a 36°C y se leyó la densidad óptica a 620 nm (DO₆₂₀) de los pozos a las 0, 6, 12, 24 y 48 h. La densidad óptica de los pozos de prueba fue corregida al sustraerles la densidad óptica de los pozos con caldo y propóleos. Con las lecturas se realizaron curvas de desarrollo bacteriano, graficando tiempo vs DO₆₂₀. El porcentaje de inhibición y la mínima concentración inhibitoria (MCI) se determinó aplicando la siguiente fórmula (Baizman *et al.* 2000):

$$\left(\frac{(\text{DO}_{\text{bacterias sin tratamiento}}) - (\text{DO}_{\text{concentración de prueba}})}{\text{DO}_{\text{bacterias sin tratamiento}}} \right) \times 100$$

(en donde DO representa la densidad óptica a 620 nm).

La máxima concentración del solvente presente en los pozos de prueba, no interfirió con el desarrollo bacteriano en los pozos con bacteria sin tratamiento.

Actividad Antioxidante

Se determinó evaluando la capacidad de los EMP para estabilizar el radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), utilizando el método descrito por Velázquez *et al.* (2007). Diferentes concentraciones de propóleos se mezclaron por

triplicado con volúmenes iguales de una solución etanólica de DPPH (Sigma-Aldrich) (300 µmol/L) y se agitaron en vórtex por 10 segundos. Después de 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, se hicieron lecturas de absorbancia a 517 nm. La actividad antioxidante se expresó en porcentaje comparando la absorbancia de la prueba con la del control constituido por DPPH y etanol. Se utilizó el ácido ascórbico (vitamina C) (Sigma-Aldrich) (70.0 µmol/L) como un antioxidante estándar.

Análisis Estadístico

Se hizo un análisis de varianza y prueba de Tukey-Kramer utilizando el programa de cómputo NCCSS 2000 (Number Cruncher Statistical Software), se consideró significativa una p<0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de determinar la actividad antibacteriana, evaluamos el efecto de los EMP sobre el desarrollo de una bacteria Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) y dos Gram negativas (*Escherichia coli* y *Vibrio cholerae* no O1). El EMP de Magdalena de Kino (PMK) demostró una fuerte actividad antibacteriana frente a *S. aureus* (MCI₉₀ 200,0 µg/mL) (figura 1, tabla 1). PMK presentó una inhibición del desarrollo de *S. aureus* cercana al 100% tanto a la concentración de 400,0 como 200,0 µg/mL, a las 24 horas de incubación (tabla 1). El efecto inhibitorio se presentó de una manera dependiente de la concentración. PMK presentó una MCI₉₀ de 400,0 µg/mL frente a *V. cholerae* no O1, mientras que la concentración de 200,0 µg/mL inhibió el 83,0% del desarrollo a las 24 horas de incubación (tabla 1). PMK presentó una MCI₉₀ >400,0 µg/mL frente *E. coli*. PMK tuvo un efecto inhibitorio moderado frente a *E. coli*, con un 72,0% de inhibición a la máxima concentración ensayada (400,0 µg/mL) (figura 1, tabla 1). El EMP de Sonoyta (PS) demostró un menor efecto antibacteriano, ya que presentó una MCI₉₀ >400,0 µg/mL frente a los tres microorganismos ensayados. SP inhibió el 88,0, 79,0 y 34,0% del desarrollo de *V. cholerae* no O1, *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente a las 24 horas de incubación (tabla 1).

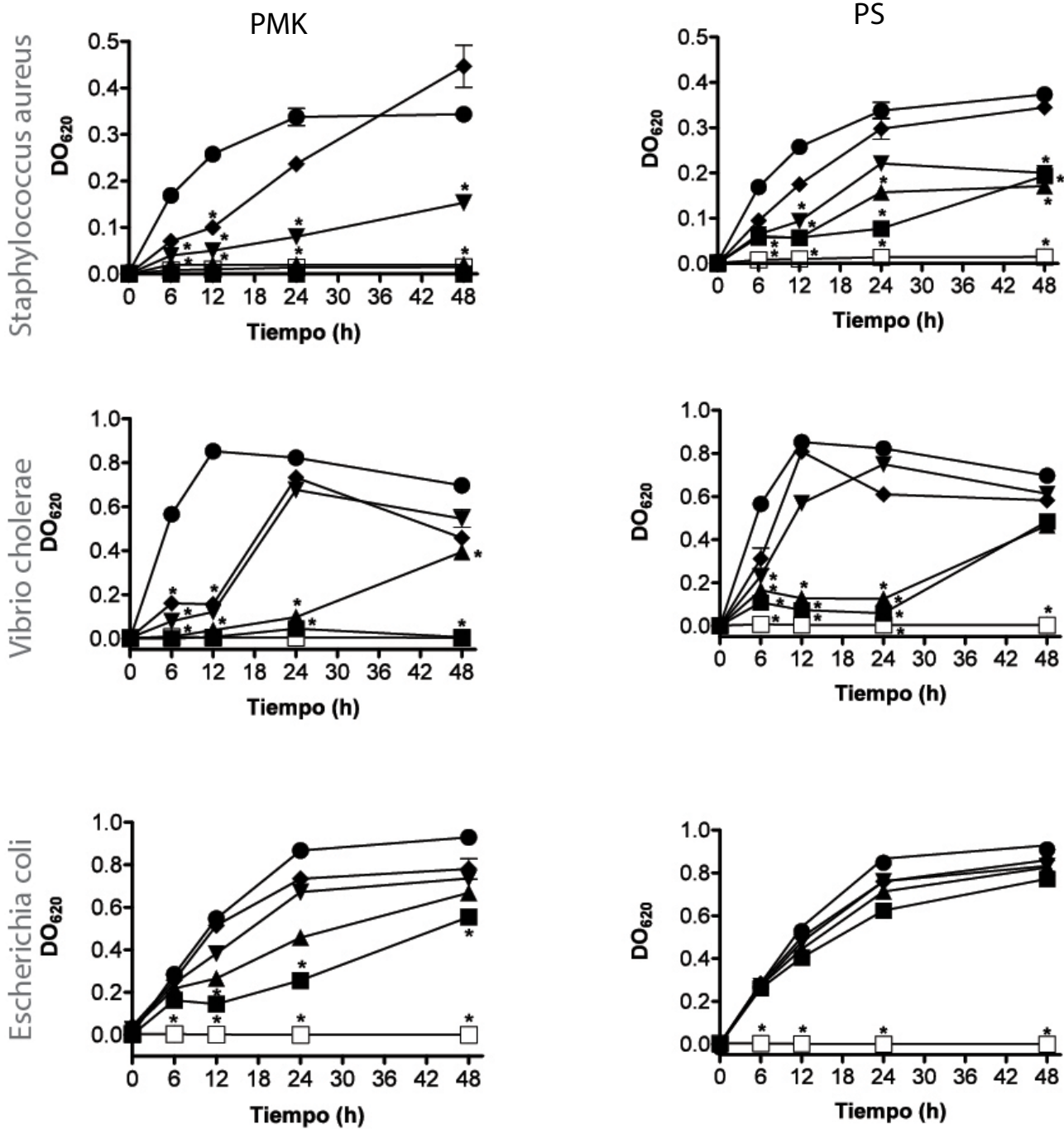


Figura 1. Efecto de diferentes dosis de extractos metanólicos de propóleos de Magdalena de Kino (MK) y de Sonoyta (PS) sobre la cinética de desarrollo de *S. aureus*, *E. coli* y *V. cholerae* O1. 400,0 µg/mL (■), 200,0 µg/mL (▲), 100,0 µg/mL (▼), 50,0 µg/mL (◆), 0,0 µg/mL (●), gentamicina (□) (12, µg/mL). Los datos son la media ± la desviación estándar de n = 3. Las diferencias significativas (p < 0,05) se indican con asteriscos.

Figure 1. Effect of different doses of methanolic extracts from propolis from Magdalena de Kino (MK) and Sonoyta (PS) on growth of *S. aureus*, *E. coli* and *V. cholerae* O1. 400,0 µg/mL (■), 200,0 µg/mL (▲), 100,0 µg/mL (▼), 50,0 µg/mL (◆), 0,0 µg/mL (●), gentamicin (□) (12, µg/mL). Values represent the Average ± standard deviations of n = 3. Significant differences (p < 0,05) are indicated with asterix.

Tabla 1. Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de propóleos de Magdalena de Kino y Sonoyta, Sonora.

Table 1. Antibacterial activity of propolis methanolic extracts from Magdalena de Kino and Sonoyta, Sonora.

Porcentaje de inhibición						
Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Propóleos de Magdalena de Kino			Propóleos de Sonoyta		
	<i>S. aureus</i>	<i>V. cholerae</i> no O1	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>V. cholerae</i> no O1	<i>E. coli</i>
400,0	99,0 ^a	98,0 ^a	72,0 ^a	79,0 ^a	88,9 ^a	34,0 ^a
200,0	99,5 ^a	83,0 ^b	52,0 ^b	57,0 ^b	84,0 ^a	23,0 ^b
100,0	78,0 ^b	15,0 ^c	29,0 ^c	40,0 ^c	15,0 ^b	19,0 ^b
50,0	26,0 ^c	30,0 ^d	22,0 ^c	23,0 ^d	30,0 ^c	17,0 ^b

Diferentes superíndices entre líneas representan diferencia significativa ($p < 0.05$).

Estos resultados concuerdan con informes previos en los que los EMP presentan una mayor actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas (Pepeljnjak y Kosalec, 2004; Uzel *et al.*, 2005). Pepeljnjak y Kosalec (2004), evaluaron la actividad antibacteriana de propóleos de dos regiones de Croacia frente a aislamientos clínicos de *S. aureus* sensibles y resistentes al antibiótico meticilina, encontrando una MCI_{90} mayor (650-5,680 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a la obtenida para PMK. Salomao *et al.* (2004) evaluaron el efecto antibacteriano de una muestra de propóleos de Bulgaria frente a un aislamiento de *S. aureus* sensible y uno resistente al antibiótico meticilina, encontrando una MCI_{90} de 102,0 y 409,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente, resultados semejantes a los obtenidos en el presente trabajo al evaluar la actividad de MKP frente a *S. aureus*. En Turquía, Uzel *et al.* (2005), evaluaron la actividad antibacteriana de 4 muestras de propóleos, encontrando MCI_{90} menores (8-128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a los del presente trabajo, frente a *S. aureus* ATCC 6538P y *E. coli* ATCC 11230. Velázquez *et al.* (2007) evaluaron la actividad antibacteriana de EMP de tres regiones del Estado de Sonora, Ures, Caborca y Pueblo de Álamos. Los EMP demostraron una fuerte actividad antibacteriana frente a *S. aureus* con una MCI_{90} de 100,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 200,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los propóleos de Ures y Caborca respectivamente y una baja actividad frente a las especies de microorganismos Gram

negativos *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* ($\text{MCI}_{90} > 400,0$ $\mu\text{g}/\text{mL}$). Velázquez *et al.* (2007) también determinaron que algunos constituyentes de los EMP como el éster fenílico del ácido cafeico y los flavonoides pinocembrina y 3-O-acetato de pinobanksina presentaron una fuerte actividad antibacteriana frente a *S. aureus* con MCI_{90} de 0,1, 0,4 y 0,8 mM respectivamente. La diferente actividad antibacteriana entre los propóleos de distintas regiones pudieran ser debidas a diferencias cualitativas y cuantitativas en su composición química, así como diferencias en la aplicación de metodologías que no han sido estandarizadas para evaluar la actividad antibacteriana de compuestos naturales (Cushnie y Andrew, 2005). La actividad antioxidante de PMK y PS se determinó evaluando su capacidad para neutralizar el radical libre DPPH. Las actividades antioxidantes de los EMP presentan un efecto dosis respuesta y se muestra en la figura 2. PMK presentó una actividad antioxidante del $35,0 \pm 0,4\%$ a la máxima concentración ensayada (100,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), mientras que el PS presentó una escasa actividad antioxidante, menor al $4,0 \pm 0,1\%$ a la máxima concentración probada (100,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (figura 2). Velázquez *et al.* (2007), utilizaron el método de neutralización del DPPH y encontraron una actividad antioxidante de 75,0, 26,0 y 22,0% para los EMP de Ures, Caborca y Pueblo de Álamos (Sonora, México), respectivamente; mientras que

Moreira *et al.* (2008), utilizando el mismo método, informaron que los extractos metanólicos de propóleos de Portugal presentan hasta 94,0% de actividad antioxidante a una concentración de 20,0 µg/mL.

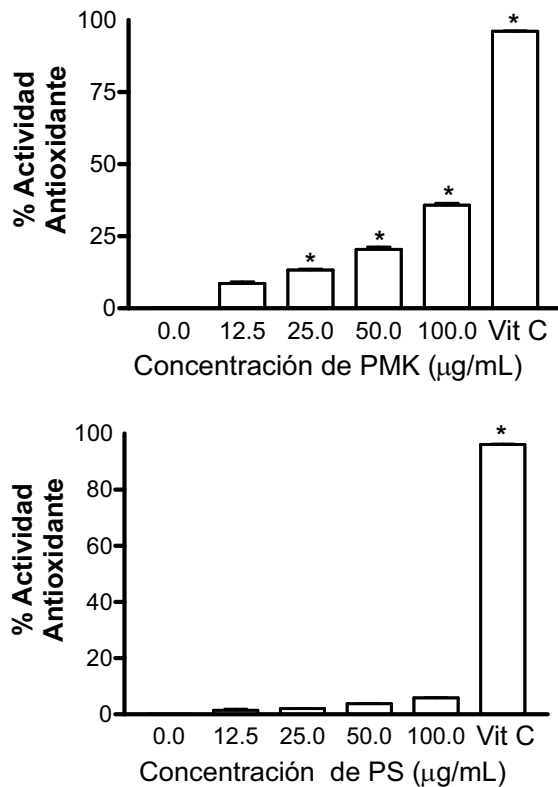


Figura 2 Actividad antioxidante de los EMP de Magdalena de Kino (PMK) y Sonoyta (PS). Las diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a los valores del control se indican con asteriscos.

Figure 2 Antioxidant activity of PME from Magdalena de Kino (PMK) and Sonoyta (PS). Significant differences ($p < 0.05$) regards to control values are indicated with an asterix.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados aportan conocimientos que permiten caracterizar parcialmente la actividad biológica de propóleos provenientes del Estado de Sonora. Los EMP de Magdalena de Kino y Sonoyta presentan actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *V. cholerae* y una escasa a moderada actividad antioxidante. Es necesario realizar estudios

que permitan conocer la composición química de PMK y PS y los efectos biológicos de dichos componentes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto 83462) para la realización del presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Baizman, E.R., Branstrom, A.A., Longley, C.B., Allanson, N., Sofia, M.J., Gange, D. y Goldman, R. C. 2000. Antibacterial activity of synthetic analogues based on the disaccharide structure of moenomycin, an inhibitor of bacterial transglycosylase. *Microbiology-(UK)*.146: 3129-3140.
- Bankova, V., Popova, M., Bogdanov, S. y Sabatini, A. G. 2002. Chemical composition of European propolis expected and unexpected results. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 57:530-533.
- Bankova, V. 2005. Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. 2:29-32.
- Banskota, A.H., Tezuka, Y. y Kadota, S. 2001. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*. 15:561-571.
- Bosio, K., Avanzini, C., D'Avolio, A., Ozino, O. y Savoia, D. 2003. *In vitro* activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Letters in Applied Microbiology*. 31:174-177.
- Cushnie, T.P.T. y Andrew, J.L. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26:343-356.
- da Silva, J.E.M., de Souza, M.C., Matta, S.R., de Andrade, M. y Vidal, F.V.N. 2006. Correlation analysis between phenolic levels of Brazilian propolis extracts and their antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry*. 99:431-435.
- Farré, R., Frasquet, I. y Sánchez, A. 2004. El própolis y la salud. *Ars Pharmaceutica* 45:21-43
- Foster, T.J. 2004. The *Staphylococcus aureus* "superbug". *Journal of Clinical Investigation*. 114:1693-1696.
- Kitaoka, M., Miyata, S.T., Unterweger, D. y Pukatzki, S. 2011. Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholerae*. *Journal of Medical Microbiology*. 60:397-407.

- Moreira L., Dias L.G., Pereira, J.A. y Estevinho, L. 2008. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 3482–3485
- Muñoz, O., Peña, R.C., Ureta, E., Montenegro, G. y Timmermann, B.N. 2001. Propolis from Chilean matorral hives. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 56:269-272.
- Pepeljnjak, S. y Kosalec, I. 2004. Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*. 240:111-116.
- Rodríguez-Baño, J. y Navarro, M.D. 2008. Extended-spectrum β -lactamases in ambulatory care: a clinical perspective. *Clinical Microbiology and Infection*. 14:104-110.
- Russo, A., Longo, R. y Vanella, A. 2002. Antioxidant activity of propolis role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia* 73:521-529.
- Sahinler, N. y Kaftanoglu, O. 2005. Natural product propolis chemical composition. *Natural Product Research* 19:183-188.
- Salomao, K., Dantas, A.P., Borboa, C.M., Campos, L.C., Machado, D.G., Aquino-Neto, F.R. y de Castro, S.L. 2004. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *Letters in Applied Microbiology*. 38:87-92.
- Uzel, A., Sorkun, K., Öncag, Ö., Cogulu, D., Gencay, Ö. y Sali, B. 2005. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiology Research*. 160:189-195.
- Velazquez, C., Navarro, M., Acosta, A., Angulo, A., Dominguez, Z., Robles, Z., Robles-Zepeda, R., Lugo, E., Goycoolea, F.M., Velazquez, E.F., Astiazaran, H. y Hernandez, J. 2007. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology*. 103:1747-1756.
- Wollenweber, E. y Buchmann, S.L. 1997. Feral honey bees in the Sonoran desert: propolis sources other than poplars (*Populus* spp.). *Zeitschrift für Naturforschung C*. 52: 530-535.