

Eficacia del Propóleo sobre *Malassezia pachydermatis*. Correlación de distintas Técnicas *in Vitro*.

Laura LOZINA ^{1*}, Silvia BOEHRINGER ², Miguel D'AQUINO ³ & Ofelia ACOSTA ¹

¹ Cátedra de Farmacología y

² Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias.
UNNE, Sgto. Cabral 2139(3400). Corrientes. Argentina.

³ Cátedra de Microbiología. Facultad de Farmacia y Bioquímica.
Universidad de Buenos Aires, Junín 956, Buenos Aires, Argentina

RESUMEN. El propóleo es un producto obtenido en la colmena, conocido por sus propiedades antimicrobianas. Varios ensayos han demostrado esta actividad, pero los resultados son contradictorios y escasos. El objetivo de este trabajo fue determinar la acción del extracto etanólico de propóleo sobre cepas de *Malassezia pachydermatis*, aisladas del conducto auditivo de caninos con diagnóstico clínico de otitis externa. Diferentes técnicas de siembra fueron comparadas, a los efectos de seleccionar entre ellas la más adecuada, para determinar la eficacia del propóleo sobre *M. pachydermatis*. De todas las técnicas empleadas la dilución en placa de agar Sabouraud fue la más apropiada, ya que permitió realizar una lectura clara y sencilla de los resultados obtenidos. A través de la misma se demostró la sensibilidad *in vitro* de las cepas estudiadas al extracto etanólico de propóleo utilizado en el presente trabajo.

SUMMARY. "Efficiency of Propolis on *Malassezia pachydermatis*. Correlation of Different *In Vitro* Techniques". Propolis is a product obtained in the beehive, well-known by its antimicrobial activity. Several assays have demonstrated such activity, but the results were scarce and contradictory. The objective of this work was to determine the action of the ethanolic extract of propolis over strains of *Malassezia pachydermatis*, isolated of the external ear channel of dogs with clinical diagnosis of external otitis. Different inoculation techniques were compared to select the most appropriate method for assessing the antimicrobial activity of the propolis over *M. pachydermatis*. The agar dilution method using Sabouraud agar demonstrated to be the most suitable, for it allowed a clear and simple reading of the obtained results. The susceptibility *in vitro* of the studied strains of *Malassezia pachydermatis* to the ethanolic extract of propolis used in the present work was observed.

INTRODUCCIÓN

El propóleo es una resina cerosa, de composición compleja y consistencia viscosa, que las abejas elaboran a partir de partículas resinosas de diferentes vegetales y que utilizan en la construcción, reparación y protección de la colmena. Este producto es ampliamente utilizado por sus variadas actividades biológicas, entre las cuales se pueden mencionar la antiinflamatoria ^{1,2}, antiviral ³, antibacteriana ^{1,3,4} y antifúngica ⁵.

Muestras de propóleo obtenidas de diferentes orígenes geográficos han demostrado actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, antifúngica sobre *Candida albicans* y antiviral contra los virus de la influenza aviar ⁶. La actividad de todas las muestras fue similar a pesar de las diferencias en la composición química de las mismas, concluyendo que la acción biológica del propóleo no se debe a una sustancia en particular como único elemento responsable de las acciones estudiadas ⁶.

Investigaciones hechas sobre la acción antibacteriana de sustancias individuales aisladas del propóleo muestran que un solo componente no tiene mayor actividad que el total del extracto, sugiriendo sinergismo entre los constituyentes ^{7,8}.

Las propiedades antimicóticas del propóleo han sido establecidas por numerosos autores. Estudios *in vitro* de extractos de propóleo de diferentes orígenes mostraron actividad antifúngica sobre dermatofitos y especies de *Candida*. Esta actividad dependía del origen del propóleo y del solvente usado para su extracción ⁵.

La composición del propóleo varía de acuerdo a la vegetación que pueda encontrarse en cada región específica. Sin embargo, muestras de propóleo de diferentes regiones con diferencias en su composición, han demostrado similares efectos antimicrobianos ⁶.

Las infecciones micóticas del conducto auditivo externo, son producidas por hongos sapro-

PALABRAS CLAVE: Propóleo, *In vitro*, *Malassezia pachydermatis*.

KEY WORDS: Propolis, *In vitro*, *Malassezia pachydermatis*.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: lauratt@latinmail.com

fitos y /u oportunistas. Normalmente son secundarias a una otitis bacteriana. Entre los hongos productores de otitis externa en caninos se ha estudiado el papel de *Malassezia pachydermatis* como causante de este proceso, discutiéndose su rol como agente primario, ya que ha sido aislada tanto de oídos de perros sanos, como enfermos^{9,10}.

El objetivo del trabajo fue determinar la acción del extracto etanólico del propóleo sobre *Malassezia pachydermatis*, determinar la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) que produce una turbiedad equivalente a la del tubo N° 1 de Mc Farland y encontrar la técnica más adecuada para demostrar la eficacia del propóleo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación del extracto

En el laboratorio, el propóleo fue sometido a los controles de calidad, según un protocolo establecido que tiene en cuenta las normas de referencias RST-RSFSR-317-77, Norma Búlgara 25724-84 y Norma Ramal Cubana NRAG 1135 11. Posteriormente fue cortado en trozos pequeños, pulverizado en mortero de porcelana y extraído con alcohol de 96°. Se prepararon los extractos alcohólicos al 30% (Tintura madre, "TM") por maceración durante tres días a 37 °C en estufa. Al cuarto día la solución se sometió a una temperatura de 0 °C durante dos horas. En medio estéril se realizó el filtrado por papel de filtro.

Preparación de la suspensión de levaduras

Se utilizaron 4 cepas de *Malassezia pachydermatis* provenientes de aislamientos de oído externo de caninos, con sintomatología de otitis. Las muestras fueron obtenidas empleando hisopos estériles con medio de transporte culturrette (Eurotubo(r)). A partir de un cultivo de 72 h de incubación en estufa a 37 °C, en agar Sabouraud, se suspendió el material de varias colonias en agua destilada estéril, hasta alcanzar la concentración del tubo N°1 de la escala de Mc Farland por comparación de turbiedad. Se realizaron las siguientes diluciones 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10.000. Se procedió al conteo de células en microscopio utilizando la cámara de Neubauer. Posteriormente se efectuó la cuenta de microorganismos viables, sembrando 100 µl de cada dilución, usando espátula de Drigalski, en placas de agar Sabouraud, las que se incubaron a 37 °C durante 3 días. Para facilitar el recuento de las colonias desarrolladas se empleó un

cuenta colonias, consistente un dispositivo constituido por un soporte que lleva una caja metálica iluminada interiormente y con un orificio superior que permite observar aumentadas e iluminadas las colonias.

Prueba de difusión con el uso de pocillos

En una caja de Petri se colocó 1 ml de la suspensión de la levadura y se adicionaron 20 ml de agar Sabouraud. Se fabricaron 5 pocillos, de un diámetro aproximado de 3 mm, con un sacabocados, uno de los cuales fue cargado con 1,5 µl. de la tintura madre y los restantes con diluciones al 10, 20 y 30% respectivamente. Además se incluyó un blanco colocando 1,5 µl de alcohol. Las placas se incubaron en estufa a 37 °C y se observaron a partir de las 72 h, dado el lento desarrollo del microorganismo.

Prueba de difusión con discos

Se impregnaron discos de papel Whatman N° 4, de 1 cm de diámetro, con 7 µl de tintura madre y las siguientes diluciones: 10, 20 y 30 % respectivamente, y un blanco con alcohol etílico. Se dejaron en estufa, a 37 °C, durante 24 h. En una placa de Petri se colocó 1 ml del inóculo y 20 ml de agar Sabouraud. Posteriormente se depositaron los discos sobre el agar. Las placas se incubaron en estufa a 37 °C y se observaron a partir de las 72 h.

Prueba de dilución en agar

Volúmenes crecientes (0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 ml) de una dilución al 10% del extracto etanólico de propóleo se agregaron a tubos que contenían 20 ml de agar Sabouraud, a una temperatura de 40 °C. Esos volúmenes fueron volcados en placas de Petri estériles, obteniéndose concentraciones finales de 0,15 a 0,7 mg de extracto de propóleo por mililitro de agar, en la placa. En el medio de cultivo se efectuó la siembra, empleando un hisopo estéril embebido en la suspensión de levaduras. Se realizaron cinco controles con el solvente de la extracción (alcohol etílico de 96°) empleando igual volumen que el usado en la dilución del propóleo. Una última placa testigo contenía solo el medio de cultivo y el inóculo. Todas las placas fueron incubadas a 37 °C durante tres días, en estufa de cultivo, prolongándose la observación durante 7 días más. Se repitió la técnica incorporando variantes en la siembra de la suspensión, utilizando para inocular ansa calibrada estéril y siembra en superficie con espátula de Drigalski.

Prueba de dilución en tubos

Se realizó una dilución alcohólica del 5 % (v/v) de la TM de propóleos. En cinco tubos de ensayos se colocaron volúmenes crecientes (0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 ml) de la dilución de propóleos. Se incorporó caldo Sabouraud hasta un volumen final de 20 ml obteniéndose una concentración de 0,375 a 0,075 mg / ml en caldo Sabouraud. Por último se incorporó el inóculo. Por otro lado se realizaron los controles en cinco tubos, usando iguales volúmenes que el usado en la dilución con la tintura, con el solvente de extracción (alcohol etílico de 96°). Los tubos se incubaron en estufa a 37 ° durante 24 h. Luego se extrajo 0,5 ml de cada tubo con micropipeta y esos volúmenes se colocaron en placas que contenían 10 ml de agar Sabouraud. Las placas se incubaron durante 7 días a 37 °C.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos permitieron determinar que la concentración existente en una suspensión de *Malassezia pachydermatis* de turbiedad equivalente a la del tubo N° 1 de Mc Farland era de 1 a 3 x10⁴ UFC / ml.

En las técnicas de difusión de la droga en placa, por pocillos y por discos impregnados se pudo observar la inhibición del crecimiento microbiano y además un aumento del halo de inhibición al aumentar la concentración de la tintura. En el centro de la placa se observó el blanco, que no presentó halo de inhibición. En la Tabla 1 se muestran los resultados de la acción de los extractos alcohólicos de propóleos sobre las colonias de *M. pachydermatis*. Las placas 1 a 5 contenían concentraciones decrecientes del extracto etanólico. En las placas 1 a 4 no hubo crecimiento microbiano, representando la última de ellas la concentración inhibitoria mínima

(CIM), que fue de 0,30 mg/ml. En la placa 5 (0,15 mg/ml) hubo desarrollo de *M. pachydermatis*. En las placas 6 a 10, correspondientes a los controles alcohólicos, hubo crecimiento microbiano en todas las diluciones, al igual que en la placa testigo que sólo contenía el medio y el inóculo.

En las diluciones seriadas en tubos (Tabla 2), no se distinguió el desarrollo microbiano debido a que el propóleos provocaba turbiedad en el medio. En la resiembra en placas de agar Sabouraud se observó crecimiento microbiano sólo en la menor concentración utilizada (0,07 mg/ml). En el testigo y en los controles se registró desarrollo microbiano.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

El número de UFC/ml determinadas en suspensiones de turbiedad equivalente a la del tubo N° 1 de la escala de Mc Farland fue coincidente con el citado en otros trabajos¹². En todos los ensayos y la repetición realizada, se demostró claramente la susceptibilidad de la levadura en estudio, al propóleos.

Las cepas de *Malassezia pachydermatis* han sido sensibles a concentraciones muy bajas de la tintura, lo que significa un alto contenido de principios activos responsables de la acción farmacológica.

Nuestros resultados confirmaron lo reportado por otros autores^{4,13}, refiriéndose a que el alcohol es el solvente de elección para extraer los principios activos de la resina en cuestión. La solubilidad de ciertas sustancias en el alcohol estaría sugiriendo la existencia de varias estructuras aromáticas y de compuestos flavonoides en la composición del propóleos.

A pesar del resultado obtenido, la falta de valores estandarizados para la medición de los

Placa	Dilución	Concentración	Desarrollo microbiano
1	0,5 ml EA	0,70 mg/ml	No
2	0,4 ml EA	0,60 mg/ml	No
3	0,3 ml EA	0,44 mg/ml	No
4	0,2 ml EA	0,30 mg/ml	No
5	0,1 ml EA	0,15 mg/ml	Sí
6	0,5 ml alcohol etílico	–	Sí
7	0,4 ml alcohol etílico	–	Sí
8	0,3 ml alcohol etílico	–	Sí
9	0,2 ml alcohol etílico	–	Sí
10	0,1 ml alcohol etílico	–	Sí
Testigo	Sabouraud + inóculo	–	Sí

Tabla 1. Acciones registradas para los extractos alcohólicos de propóleos y los controles alcohólicos, en diluciones seriadas en placa. **EA:** extracto alcohólico de propóleos.

Tubo	Dilución	Concentración final en el caldo	Desarrollo microbiano
1	0,5 ml dilución al 5 %TM	0,37 mg/ml	No
2	0,4 ml dilución al 5 %TM	0,30 mg/ml	No
3	0,3 ml dilución al 5 %TM	0,22 mg/ml	No
4	0,2 ml dilución al 5 %TM	0,15 mg/ml	No
5	0,1 ml dilución al 5 %TM	0,07 mg/ml	Sí
6	0,5 ml alcohol etílico	-	Sí
7	0,4 ml alcohol etílico	-	Sí
8	0,3 ml alcohol etílico	-	Sí
9	0,2 ml alcohol etílico	-	Sí
10	0,1 ml alcohol etílico	-	Sí
Testigo	Caldo Sabouraud+inóculo	-	Sí

Tabla 2. Acción del extracto de propóleos y controles en diluciones seriadas en tubos.

halos, en las técnicas de difusión con discos y con el uso de pocillos, representa un inconveniente, ya que no se tiene un parámetro de comparación para poder cuantificar los resultados. Nuevos estudios deberían realizarse con otras cepas y así poder volcar los resultados en un diagrama de dispersión a fin de compararlos con los valores obtenidos en las pruebas de dilución, de estas nuevas cepas.

En la técnica de diluciones seriadas en placa, se obtuvo un valor de la CIM equivalente a 0.30 mg/ml de agar, todos los controles alcohólicos presentaron desarrollo microbiano, al igual que el testigo. En cuanto a la siembra del microorganismo en agar con ansa calibrada no se logro una distribución uniforme. Se obtuvieron mejores resultados empleando hisopos estériles, sin embargo la técnica más apropiada fue la siembra con micropipeta y espátula de Drigalski, que permitió la incorporación de una concentración exacta y uniforme de la levadura en el agar.

Comparando los resultados de las técnicas de dilución seriada en placa utilizando micropipetas y espátula de Drigalski, y la dilución seriada en tubos y resiembra, se sugiere que el efecto del propóleos sobre las cepas de *Malassezia pachydermatis* estudiadas en el presente trabajo, es tanto fungistático como fungicida. El primero se mostró en los ensayos en placa donde se obtuvieron valores de CIM. El efecto inhibitor no puede ser evaluado en los tubos por la turbiedad que provoca la droga en el medio, no obstante, la resiembra en placa representa una alternativa valida para medir el efecto fungicida y determinar valores de CFM (Concentración Fungicida Mínima) considerando distintos tiempos de exposición de la droga al microorganismo. En nuestra experiencia, esta acción fue cualitativa, ya que en 24 h los resultados mostraron valores de desarrollo o ausencia a una determinada concentración. Sería importante una vez con-

siderados estos puntos, hallar valores de CFM, sometiendo al organismo a diferentes tiempos de exposición mas cortos y efectuar recuentos cuantitativos de los sobrevivientes a fin de extrapolar estos valores en una forma farmacéutica para su empleo in vivo en otitis crónicas de caninos, resistentes a otros tratamientos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brater, C., M. Tregel, C. Liebenthal & H.D. Volk (1999) *Forsch. Komplementarmed.* **6**: 256-60.
2. Kooh, H., B.P. Gomez, P.L.Rosalen, G.M. Ambrosano, Y.K. Park & JA Cury (2000) *Arch. Oral Biol.* **45**: 141-8.
3. Pepeljnjak, S., I. Jalsenjak & D. Maisinger (1982) *Pharmazie* **37**: H.12.
4. Metzner, J., H Bekermeier, M. Peaintz & E. Schneidewind. (1979) *Pharmazie* **34**: 97-102.
5. Cafarchia C.; N.De Laurentis, M.A. Milillo; V. Losacco; & V. Puccini (1999) *Parasitologia* **41**: 587-90.
6. Kujumgiev A., I. Tsvetkova, Y. Serkedjieva, V. Bankova, R. Christov & S. Popov. (1999) *J. Ethnopharmacol.* **64**: 235-40.
7. Kujumgiev A., V. Bankova, S. Popov. (1993) *Pharmazie* **48** : 785-6.
8. Serra Bonvehi J., F. Ventura Coll & R. Escola Jorda (1994) *J. Am. Oil Chem. Soc.* **71**: 529-32.
9. Gabal, M.A.(1988) *Mycopathol.* **104**: 93-8.
10. Gedek B; K. Brutzel; R. Gerlach; F. Netzer, H. Rokken, H. Unger & J. Symoens (1979) *Vet. Rev.* **84**: 138-48.
11. Guerra González A, R.B. Méndez (1997) *Propóleos: un camino hacia la salud*, Editorial Pablo de la Torriente, La Habana, págs. 95-119.
12. Candido R., L. Zaror, O. Fischman, Z. Gregorio, T. Isidoro, J. Castaña (1996) *Boletín Micológico* **11**: 51-4.
13. Nieva Moreno, M.I., M. Isla, N. Cudmani, M. Vattuone & A. Sampietro (1999) *J. Ethnopharmacol.* **68**: 97-102.