

EFFECTO SOBRE HONGOS FITOPATÓGENOS DE UN EXTRACTO ACUOSO DE PROPÓLEO OBTENIDO DE LAS ABEJAS DOMÉSTICAS.

Bucio Villalobos C. M.^{a,b,*}, Navarro López F. A.^a, Martínez Jaime O. A.^a, Torres Morales J. J.^c

^aUniversidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca, División Ciencias de la Vida, Departamento de Agronomía. Ex-Hacienda "El Copal", Km. 9 carretera Irapuato-Silao, C.P. 36821, Irapuato, Guanajuato, México.

^bUniversidad De La Salle Bajío, Escuela de Agronomía. Av. Universidad 602, Col. Lomas del Campestre, C.P. 37150, León, Guanajuato, México.

^cUniversidad de Guanajuato, Campus Celaya-Salvatierra, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías. Prolongación Río Lerma s/n, Colonia Suiza, C.P. 38069, Celaya, Guanajuato, México.

* buciovillalobos@yahoo.com.mx

RESUMEN:

300 gramos de propóleo fueron fraccionados y adicionados a 500 ml de etanol al 70%, dejándose por 15 días en agitación continua. Por filtración al vacío se separó la fase líquida, a la cual le fue evaporado el etanol en un rotoevaporador accionado a 90 rpm y 80° C. El residuo final fue resuspendido con agua destilada obteniéndose así el extracto acuoso. Tintura de propóleo obtenida con etanol concentrado fue utilizada como control, agregando además controles de etanol y agua. La actividad antifúngica del extracto fue evaluada mediante la técnica de pozos con difusión en agar, utilizando cepas de *Fusarium* sp, *Penicillium* sp y *Aspergillus niger*, aisladas de raíces de papa, e incubadas a temperatura ambiente por 72 horas y midiendo el halo de inhibición y la producción de esporas al término de dicho tiempo. Solo la tintura usada como control inhibió el crecimiento micelial y la producción de esporas de las tres cepas, mientras que el extracto acuoso no tuvo efecto alguno, concluyéndose que los ingredientes activos del propóleo no son solubles en agua, por lo que se pierden en un proceso de extracción acuosa.

ABSTRACT:

300 grams of propolis were fractionated and added to 500 ml of ethanol 70%, and leaving for 15 days under continuous stirring. The liquid phase was obtained by vacuum filtering, and ethanol was evaporated in a rotoevaporator at 90 rpm and 80° C. The final residue was resuspended with distilled water, and thus obtaining the aqueous extract. Propolis tincture was obtained with concentrated ethanol, and was used as a control (ethanolic extract); were adding water and ethanol controls. The antifungal activity of the extract was evaluated by the technique of wells with agar diffusion, using strains of *Fusarium* sp, *Penicillium* sp and *Aspergillus niger* isolated from roots of potato, and incubated at room temperature for 72 hours and measuring the halo of inhibition and spore production within that time. Only the ethanolic extract used as a control inhibited mycelial growth and spore production of the three strains, while the aqueous extract had no effect, concluding that the active ingredients of propolis are not soluble in water, so that lost in a aqueous extraction process.

Palabras clave:

Propóleo de abeja, actividad microbiana, hongos fitopatógenos.

Keyword:

Bee propolis, antimicrobial activity, phytopathogenic fungi.

Área: Microbiología y Biotecnología.

INTRODUCCIÓN

Al propóleo recolectado por las abejas domésticas (*Apis mellifera*) se le atribuyen efectos benéficos por contar con propiedades antimicrobianas, razón por lo que numerosos estudios han sido desarrollados para evaluar su efecto contra microorganismos de diversos tipos, en algunos casos con resultados exitosos (Anastasiu, 1978; Bankova *et al.*, 2014; Delgado *et al.*,

2006; Vechet, 1975). Aun con este potencial uso, la producción de propóleo en México es baja en la mayoría de las zonas apícolas del país, lo cual tiene que ver con la falta de un mayor mercado y los precios bajos del producto en bruto.

En base a lo anterior, se realizó el presente trabajo con el objetivo de evaluar la actividad antifúngica de un extracto acuoso de propóleo colectado en un apiario ubicado en Irapuato, Guanajuato, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

300 gramos de propóleo colectado en un apiario ubicado en Irapuato, Guanajuato, México, fueron fraccionados y adicionados a 500 ml de etanol al 70 %, dejándose por 15 días en agitación continua. Por filtración al vacío, se separó la fase superior líquida. El etanol contenido en dicha fase fue evaporado en un rotoevaporador accionado a 90 rpm y 80° C. El extracto blando final fue resuspendido con agua destilada, obteniéndose así el extracto acuoso. Tintura de propóleo obtenida con etanol concentrado fue utilizada como tratamiento de referencia (extracto etanólico), agregando además controles de etanol y agua. La actividad antifúngica del extracto fue evaluada mediante la técnica de pozos con el inóculo difundido sobre el agar, utilizando cepas de *Fusarium* sp, *Penicillium* sp y *Aspergillus niger* aisladas previamente de raíces de plantas de papa colectadas en un campo agrícola comercial del municipio de León, Gto. Fue utilizado el medio de cultivo de Papa-Dextrosa-Agar, con un período de incubación de 72 horas a temperatura ambiente. La evaluación de la inhibición del crecimiento micelial se logró midiendo el “halo de inhibición” formado alrededor de cada pozo. La inhibición de la esporulación fue estimada tomando tres discos representativos por caja de petri utilizando un sacabocados de 1.4 cm de diámetro; los discos fueron colocados en un tubo de ensayo con 10 ml de agua destilada estéril y agitados por un minuto a 3,000 rpm, para posteriormente cuantificar, con la ayuda de una cámara de Neubauer, el número de esporas/ml y extrapolarlo a número de esporas/cm² producidas sobre el medio de cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El extracto acuoso de propóleo no tuvo efecto sobre ninguna de las cuatro cepas de hongos evaluadas, sí en cambio el extracto etanólico el cual fue utilizado en la presente investigación como un tratamiento de referencia por ser la forma tradicional usada por los apicultores cuando hacen sus extractos de propóleo, y el cual presentó un efecto de inhibición del crecimiento micelial de los tres hongos (tabla 1), lo que concuerda con otros estudios donde se han encontrado efectos similares de extractos etanólicos de propóleo sobre *Fusarium*, *Penicillium expansum* y otros hongos de interés agrícola (Curifuta *et al.*, 2012). Esta inhibición fue diferencial, ya que un mayor halo de inhibición fue observado en *Penicillium* sp (2.6 cm), seguido de *Aspergillus niger* (1.6 cm) y por último de *Fusarium* sp (1.2 cm). Este efecto diferencial sugiere que el propóleo inhibe en forma desigual a los diferentes hongos, lo cual es presumiblemente explicado por las propiedades específicas de cada propóleo, las cuales dependen de la composición química particular de ellos, y que puede ser variable por depender de la flora local de cada región (Aliboni, 2014); por ejemplo, la pinocebrina resultó un compuesto activo presente en el propóleo que inhibió el crecimiento micelial de *Penicillium*

italicum (Peng *et al.*, 2012). Igualmente se ha demostrado la inhibición del crecimiento del micelio de *Aspergillus parasiticus* (Hashem *et al.*, 2012).

Por otro lado, el proceso de esporulación se mostró significativamente afectado con el extracto etanólico en las cepas de *Penicillium* sp y *Aspergillus niger*, al inhibirse totalmente en ambos casos la producción de esporas; este efecto sin embargo quedó confundido dado que el control con etanol presentó los mismos resultados de inhibición (tabla I). La cepa de *Fusarium* sp no esporuló por lo que el efecto del propóleo sobre este proceso fisiológico no pudo ser evaluado. Efectos del propóleo sobre la esporulación de los hongos han sido demostrados en otros trabajos, como es el caso de diversas investigaciones donde se demostró una disminución de la producción de esporas o su posterior proceso de germinación en *Aspergillus parasiticus* (Hashem *et al.*, 2012), *Aspergillus flavus* (Ghaly *et al.*, 1998) y *Penicillium digitatum* (Soylu *et al.*, 2008). No hubo efectos significativos en el proceso de esporulación de ambos hongos con el extracto acuoso.

Tabla I. Inhibición del crecimiento micelial y la esporulación de tres hongos aislados de raíces de papa y expuestos a los extractos acuosos y etanólico de propóleo.

Tratamiento	Halo de inhibición (cm)			Esporulación (conidios/cm ²)		
	<i>Fusarium</i> sp	<i>Penicillium</i> sp	<i>A. niger</i>	<i>Fusarium</i> sp	<i>Penicillium</i> sp	<i>A. niger</i>
Extracto acuoso	0	0	0	No esporuló	1.69 (x10 ⁷)	5.46 (x10 ⁷)
Extracto etanólico	1.2	2.6	1.6	No esporuló	0	0
Control (con etanol)	0	1.2	0	No esporuló	0	0
Control (con agua)	0	0	0	No esporuló	1.83 (x10 ⁷)	5.24 (x10 ⁷)

CONCLUSIONES

1) El extracto acuoso de propóleo no presentó actividad antifúngica contra ninguna de las cepas de hongos evaluadas, de lo que se concluye que los ingredientes activos del propóleo no son solubles en agua, por lo que se pierden en un proceso de extracción acuosa.

2) Se encontró un efecto de inhibición del extracto etanólico de propóleo al disminuir el crecimiento micelial de los tres hongos evaluados. *Penicillium* sp fue el hongo con mayor inhibición, seguido de *Aspergillus niger* y *Fusarium*, lo que sugiere un efecto diferencial del propóleo contra las diferentes especies de hongos.

3) La esporulación de *Aspergillus niger* y *Penicillium* sp se vieron disminuidas totalmente con el extracto etanólico, considerando este efecto confundido con el del etanol contenido en dicho extracto, ya que el control con este compuesto presentó también la misma inhibición.

BIBLIOGRAFÍA

- Aliboni A. 2014. Propolis from northern California and Oregon: chemical composition, botanical origin, and content of allergens. *Z. Naturforsch C.* 69:10-20.
- Anastasiu RI. 1978. Effect of propolis on *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro* experiments. *Memorias de APIMONDIA*, Bucarest. p98–103.

- Bankova V, Popova M, Trusheva B. 2014. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chem Cent J.* 2:8-28.
- Curifuta M, Vidal J, Sanchez-Venegas J, Contreras A, Salazar LA, and Alvear M. 2012. The *in vitro* antifungal evaluation of a commercial extract of Chilean propolis against six fungi of agricultural importance. *Ciencia e Investigacion Agraria* 39:347-359.
- Delgado HM, Quijano CE, Pérez MI, Quintero ME, Catzín VG. 2006. Actividad antimicrobiana del propóleo recolectado por *Apis mellifera* y *Melipona beecheii* en el estado de Yucatán. *Memorias del XX Seminario Americano de Apicultura*. Querétaro, Qro. México.
- Ghaly MF, Ezzat SM, and Sarhan MM. 1998. Use of propolis and ultrariseofulvin to inhibit aflatoxigenic fungi. *Folia Microbiologica* 43:156-160.
- Hashem A, Abd-Allah EF, and Alwathnani HA. 2012. Effect of propolis on growth, aflatoxins production and lipid metabolism in *Aspergillus parasiticus* Spear. *Pakistan Journal of Botany* 44:1153-1158.
- Peng LT, Yang SZ, Cheng YJ, Chen F, Pan SY, and Fan G. 2012. Antifungal activity and action mode of pinocembrin from propolis against *Penicillium italicum*. *Food Science and Biotechnology* 21:1533-1539.
- Soylu EM, Ozdemir AE, Erturk E, Sahinler N, and Soyly S. 2008. Antifungal activity of propolis against postharvest disease agent *Penicillium digitatum*. *Asian Journal of Chemistry* 20:4823-4830.
- Vechet L. 1975. Efecto del propóleos en algunas especies de microorganismos y mohos. *Memorias de APIMONDIA*, Bucarest. pp49–53.

Agradecimientos.

A la Universidad De La Salle Bajío por el apoyo económico otorgado a través de la 11^a Convocatoria de Investigación, gracias al cual se pudo desarrollar el presente proyecto, así como a la Universidad de Guanajuato quién con un apoyo complementario ayudó igualmente al buen éxito del mismo