

Acción del propóleo sobre una levadura (*Malassezia pachydermatis*) aislada a partir de otitis externa canina*

Lozina, L.¹; Boehringer, S.²; Teibler, P.¹; Acosta de Pérez, O.¹

¹ Cátedra de Farmacología, ² Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE, Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Argentina. Tel. 03783-425753.
E-mail: patmed@vet.unne.edu.ar

Resumen

Lozina, L.; Boehringer, S.; Teibler, P.; Acosta de Pérez, O.: Acción del propóleo sobre una levadura (*Malassezia pachydermatis*) aislada a partir de otitis externa canina. Rev. vet. 16: 1, 32–35, 2005. *Malassezia pachydermatis* es una levadura capaz de provocar micosis en seres humanos y animales. El propósito de este trabajo fue determinar la acción de extractos alcohólicos y acuosos de propóleo sobre cepas de dicho microorganismo, extraídas del conducto auditivo externo de 5 caninos. La levadura fue sembrada en la superficie de placas de agar Sabouraud que contenían distintas diluciones de propóleo, con sus correspondientes controles alcohólicos. Los extractos acuosos no demostraron acciones inhibitorias sobre el crecimiento de la levadura, pero algunos extractos etanólicos de propóleo impidieron su desarrollo, estableciéndose la concentración inhibitoria mínima en 0,30 mg/ml. Los resultados indican que el producto ensayado puede resultar útil para el tratamiento de la otitis externa producida por *M. pachydermatis*.

Palabras clave: canino, otitis externa, *Malassezia pachydermatis*, propóleo.

Summary

Lozina, L.; Boehringer, S.; Teibler, P.; Acosta de Pérez, O.: Action of propolis on a yeast (*Malassezia pachydermatis*) isolated from canine external otitis. Rev. vet. 16: 1, 32–35, 2005. The purpose of this work was to determine the action of alcoholic and watery extracts of propolis on *Malassezia pachydermatis* isolated from canine external ear canal. Yeast was cultured in different dilutions of Sabouraud agar, with the corresponding alcoholic controls. The work allowed to determine the minimum inhibitory concentration of the ethanolic propolis extract, being of 0.30 mg/ml. The watery extracts did not present effects for the same concentrations and on the same strain.

Key words: dog, external otitis, *Malassezia pachydermatis*, propolis.

INTRODUCCIÓN

Distintos productos derivados de la apicultura se utilizan desde tiempos inmemorables para tratar diferentes dolencias. El término propóleo proviene del griego (pro: "delante" o "en defensa de" y polis: ciudad; delante de la ciudad, es decir, de la colmena) y es utilizado en su acepción original en casi todas las lenguas indoeuropeas¹.

Las abejas (*Apis mellifera*) recogen con sus mandíbulas partículas resinosas de las yemas, brotes y pecíolos de las hojas de diferentes vegetales y, una vez en la colmena, las mezclan con cera y secreciones salivales para obtener el propóleo. La producción anual de esta resina (10–300 g/colmena) difiere en función de la variedad de abejas, el clima, la flora y el método de re-

colección. Entre estos últimos pueden mencionarse el raspado de diferentes partes de la colmena no expuestas al aire libre, así como el uso de mallas especialmente diseñadas para tal fin.

Las abejas utilizan el propóleo para recubrir todas las grietas y aberturas de la colmena. Además de cumplir esta función, el propóleo evita contaminaciones debido a que posee acciones fungicida y antibiótica. Es una sustancia de compleja composición química pues contiene más de 160 componentes activos, entre ellos flavonoides (principalmente quercetina), ácido benzoico y ácido cafeico y sus derivados¹⁴.

Muestras de propóleo de diferentes orígenes geográficos han demostrado actividades antibacterianas (sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), antifúngicas (*Candida albicans*) y antivirales (*Avian influenza virus*)⁹. En todas las muestras la actividad biológica fue similar a pesar de existir diferencias en su composición; es opinión generalizada que no existe una sustancia individual o una clase particular de sustancias responsable de esta acción⁹. La actividad antibacteria-

Recibido: 18 abril 2005 / Aceptado: 20 mayo 2005

* Este trabajo forma parte de la Tesis Doctoral que desarrolla la Farm. Laura Lozina, en la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA).

na de sustancias individuales aisladas del propóleo no reveló mayor actividad que la del total de componentes del extracto^{10,13}. Las propiedades antimicóticas del propóleo han sido estudiadas por numerosos investigadores, quienes aseveran que tal actividad depende tanto del origen del propóleo como del solvente usado para su extracción⁴.

Los compuestos identificados en propóleos de colmenas ubicadas en emplazamientos cercanos entre sí no difieren significativamente, aunque desde el punto de vista cuantitativo pueden ser variables. Ello implica que los propóleos deban ser estudiados y normatizados en función de la zona geográfica de ubicación de las colmenas.

El objetivo de este trabajo fue verificar las propiedades físicas y la composición química del propóleo obtenido en el noroeste de la Provincia de Corrientes, así como comprobar su efecto deletéreo sobre levaduras (hongos) patógenos para animales domésticos, como *Malassezia pachydermatis*, la cual desempeñaría algún papel en las otitis micóticas del canino, ya sea como agente primario o secundario, pues ha sido aislada tanto en perros sanos como enfermos^{3,7}.

MATERIAL Y MÉTODOS

Normatización del propóleo. Se recolectaron muestras de propóleos obtenidas por raspado de distintas partes de la colmena, descartando resinas muy expuestas al aire libre (fotooxidación) y se realizaron análisis organolépticos, teniendo en cuenta su estructura, consistencia, color, aroma y sabor. Para ello se utilizaron las normas de referencia RST-RSFSR-317-77, Norma Búlgara 25724-84 y Norma Ramal Cubana NRAG 1135⁸. Se efectuaron análisis que incluyeron la determinación de la cantidad de cera (método gravimétrico), índice de oxidación (basado en el poder oxidante del permanganato de potasio sobre compuestos fenólicos del propóleo), detección de principios activos (reacciones colorimétricas para revelar presencia de polifenoles y flavonoides), contenido de resinas totales (extracción con etanol de 96° a 40°C durante 72 h y ulterior filtración del sobrenadante a 0°C para retener ceras e impurezas mecánicas, evaporación del solvente y titulación de resinas por gravimetría) y determinación de mezclas mecánicas y compuestos fenólicos (basada en la adsorción de los compuestos fenólicos del propóleo sobre el óxido de aluminio activado y la capacidad de máxima dilución en la mezcla cloroformo-acetona).

Elaboración de extractos. El propóleo fue cortado en trozos pequeños y posteriormente pulverizado en mortero de porcelana, siendo extraído con alcohol de 96° y agua. Se prepararon extractos alcohólicos y acuosos al 30% (tintura madre) por maceración durante tres días a 37°C en estufa. Al cuarto día la solución se sometió 0°C durante dos horas y luego se filtró a través de papel de filtro, en medio estéril.

Aislamiento de *M. pachydermatis*. Se utilizaron 5 cepas provenientes del oído externo de caninos con sintomatología de otitis, asistidos en el Hospital de Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE. Las muestras fueron obtenidas empleando hisopos estériles con medio de transporte (culturette, Eurotubo) y se realizaron cultivos sobre agar Sabouraud, donde se desarrollaron sin inconvenientes. El examen microscópico directo reveló que el material extraído del conducto auditivo externo de los caninos presentaba células levaduriformes pequeñas, ovales, alargadas, con brotes de base, de implantación ancha y presencia de collarite característica del género *Malassezia*. A partir de un cultivo de 72 h de incubación en estufa a 37°C, se suspendió material de varias colonias en agua destilada estéril, hasta alcanzar la concentración del tubo 1 McFarland por comparación de turbidez.

Pruebas de inhibición del desarrollo de *M. pachydermatis*. Se ensayaron distintas técnicas de siembra, resultando más adecuada la de dilución en placas de agar. Se probaron cinco cepas distintas de *M. pachydermatis*, observándose los mismos resultados en todos los ensayos. El agar Sabouraud fue adicionado a distintas diluciones del extracto etanólico de propóleos a una temperatura de 40°C, en placas de Petri estériles, obteniendo concentraciones de 0,15 a 0,70 mg de extracto de propóleos por mililitro de agar. Para obtener estas concentraciones se realizaron diluciones al 10 % de la tintura madre y se tomaron 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, y 0,1 ml, las que se adicionaron a un volumen total de 20 ml de agar en placas, lográndose concentraciones de 0,70, 0,60, 0,44, 0,30 y 0,15 mg/ml de agar respectivamente. Las placas fueron inoculadas empleando hisopo estéril embebido en la suspensión acuosa descripta anteriormente. Se realizaron cinco controles con el solvente de la extracción (alcohol etílico de 96°) empleando igual volumen que el usado en las diluciones. Una última placa (testigo) contuvo solo el medio de cultivo y el inóculo. Todas las placas fueron incubadas en estufa de cultivo a 37°C durante tres días, prolongándose la observación durante 7 días más.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se detallan los resultados obtenidos para el control de calidad del propóleo estudiado. El producto regional cumplió con los requerimientos de calidad determinados por las normas vigentes. A partir del protocolo de control de calidad se estableció un estándar regional de propóleos, que garantiza su autenticidad y legitimidad

En la Tabla 2 se muestran los resultados de la acción de los extractos alcohólicos de propóleos sobre las colonias de *M. pachydermatis*. Solo se verificaron acciones inhibitorias con extractos alcohólicos, pues el extracto acuoso demostró tener poca eficacia en los estudios *in vitro*. Las placas 1 a 5 (Figura 1) contenían concentraciones decrecientes del extracto etanólico. En las placas

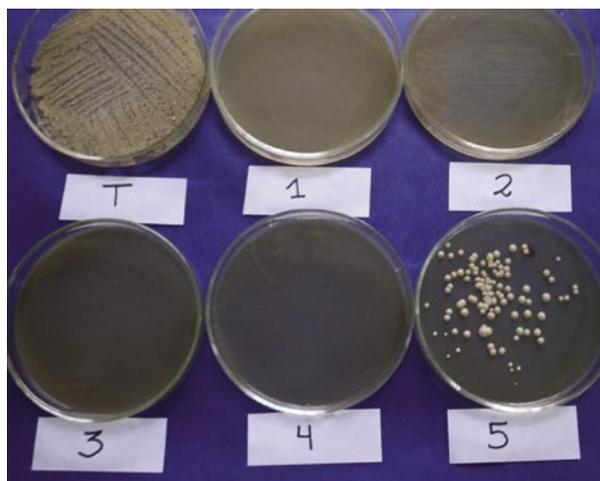
Tabla 1. Control de calidad del propóleo empleado.

parámetros estudiados	resultados obtenidos
color	pardo oscuro, negruzco
olor	aromático, penetrante
consistencia (a temperatura ambiente)	viscosa, pegajosa
aspecto	masa sólida en pedazos suelos sin comprimir
reacción cualitativa ante flavonoides	positiva
cera	30%
mezclas mecánicas	18%
índice de oxidación	11 seg
compuestos fenólicos	42,3%

Tabla 2. Acciones registradas para los extractos alcohólicos de propóleos y los controles etanólicos.

placa	dilución	concentración	desarrollo microbiano
1	0,5 ml EE	0,70 mg/ml	no
2	0,4 ml EE	0,60 mg/ml	no
3	0,3 ml EE	0,44 mg/ml	no
4	0,2 ml EE	0,30 mg/ml	no
5	0,1 ml EE	0,15 mg/ml	sí
6	0,5 ml etanol	–	sí
7	0,4 ml etanol	–	sí
8	0,3 ml etanol	–	sí
9	0,2 ml etanol	–	sí
10	0,1 ml etanol	–	sí
testigo	Sabouraud + inóculo	–	sí

EE: extracto etanólico de propóleos.

**Figura 1.** Inhibición del desarrollo de *Malassezia pachydermatis* verificada en placas de cultivo conteniendo extractos alcohólicos de propóleos.

T: testigo, 1 a 5: placas con extractos alcohólicos de propóleos, cuya numeración coincide con las concentraciones 1 a 5 detalladas en Tabla 2. Nótese el desarrollo microbiano verificado en la placa 5 (0,15 mg/ml) y la inhibición del crecimiento de la levadura en las placas 1 a 4 (0,70 a 0,30 mg/ml).

1 a 4 no hubo crecimiento microbiano, representando la última de ellas la mínima concentración inhibitoria, que fue de 0,30 mg/ml. En la placa 5 (0,15 mg/ml) las colonias se desarrollaron. 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 solo contenía el medio y el inóculo.

A pesar de los esfuerzos de instituciones sanitarias, educativas, profesionales y especialmente de la farmacovigilancia ejercida por los farmacéuticos, el producto natural propóleos, como otros del mismo origen, se utiliza indiscriminadamente para distintas afecciones, la mayoría de las veces en ausencia de ensayos farmacológicos documentados. Mediante el protocolo establecido en este trabajo se pudo lograr un propóleos estándar, es decir acorde a los requerimientos de calidad estipulados, a partir del cual se demostró *in vitro* que varias cepas de *M. pachydermatis* fueron sensibles a concentraciones muy bajas de la tintura, lo cual indica alto contenido de los principios activos responsables de la acción farmacológica.

En el Hospital de Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE se detectó reiteradamente la presencia de *M. pachydermatis* en otitis caninas. Es una levadura no lipofílica de interés veterinario, aunque también ha sido responsabilizada como agente etiológico en casos esporádicos de micosis sistémica en seres humanos, principalmente en recién nacidos¹¹. Para combatir a esta levadura se ha preconizado el uso de nistatina⁶, miconazol y sulfuro de bismuto². Esta investigación agrega un potencial agente farmacológico, como el extracto alcohólico de propóleos. Su acción antifúngica también fue demostrada sobre el género *Candida*, estableciéndose que los valores de concentración fungicida mínima disminuyen con el incremento del tiempo de exposición¹². El efecto inhibitorio del propóleos fue asimismo demostrado sobre cepas de *Aspergillus nidulans*⁵.

En conclusión, el extracto alcohólico de propóleos se revela capaz de inhibir el desarrollo de *M. pachydermatis*, estableciéndose la concentración inhibitoria mínima en 0,30 mg/ml. Los extractos acuosos, a igual concentración y sobre las mismas cepas, no son eficaces. Resta aún determinar, mediante técnicas microbiológicas, la concentración fungicida mínima, para así poder extrapolar estos valores a una forma farmacéutica aplicable en la terapéutica de otitis crónicas resistentes a otros tratamientos.

REFERENCIAS

1. Bedascarrasbure EL, Maldonado LM, Álvarez AR, Rodríguez E. 2003. Contenidos de propóleos argentinos. *Bol Apic* 24: 7–10.
2. Bond R, Saiyonmaa–Koulumici LE, Lloyd DH. 1995. Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on healthy dogs. *J Small Anim Pract* 36: 147–150.

3. **Cabal MA.** 1988. Preliminary studies on the mechanism of infection on characterization of *Malassezia pachydermatis* in association with canine otitis externa. *Mycopathol* 104: 91–98.
4. **Cafarchia C, De Laurentis N, Milillo MA, Losacco V, Puccini V.** 1999. Antifungal activity of Apulia region propolis. *Parasitol* 41: 587–590.
5. **De la Torre RA, Gomez B, Hollands I.** 1988. Estudio genético de la acción de la propolisina en un hongo ascomiseto. *Memorias del I Simposio sobre los Efectos del Propóleo en la Salud Humana y Animal*, Varadero, Cuba, p. 88–93.
6. **Feigl MH, Mos EN, Larson CE, Santos MA.** 1981. Estudio microbiológico das otites externas em caes. *Rev Microbiol* 12: 88–91.
7. **Gedek B, Brutzel K, Gerlach R, Netzer F, Rokken H, Unger H, Symoens J.** 1979. The role of *Pityrosporum paucidermatis* in otitis externa of dogs evaluation of a treatment with miconazol. *Vet Rev* 84: 138–148.
8. **Guerra Gonzalez A, Mendez RB.** 1997. *Propóleos: un camino hacia la salud*, Editorial Pablo de la Torriente, La Habana, p. 95–119.
9. **Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S.** 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethopharm* 64: 235–240.
10. **Kujumgiev A, Bankova V, Popov S.** 1993. Antibacterial activity of propolis, some of its components and their analogs. *Pharmazie* 48: 785–786.
11. **Michelsen PA, Viano–Paulson MC, Stevens, DA.** 1988. Clinical and microbiological features of infection with *Malassezia pachydermatis* in high–risk infants. *J Infect* 157: 1163–1168.
12. **Rojas N, Lugo S.** 1988. Efecto antifúngico del propóleo sobre cepas del género *Candida*. *Memorias del I Simposio sobre los Efectos del Propóleo en la Salud Humana y Animal*, Varadero, Cuba, p. 42–53.
13. **Serra Bonvehi J, Ventura Coll F, Escola Jorda R.** 1994. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis on dietetics. *J Am Oil Chem Soc* 71: 529–532.
14. **Souza MP, Faria JE, Message D, Cassini ST, Pereira C, Gioso M.** 2001. Efeito de extratos de propolis verde sobre bacterias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. *Braz J Vet Res Anim Sci* 38: 21–27.