ARTÍCULO

Salus

Rev. Salus.UC. 20(1):27-33.2016

Efecto de un extracto etanólico de propóleos sobre *Pseudomonas aeruginosa* en estado planctónico y sésil

Effect of ethanol extract of propolis on *Pseudomonas aeruginosa* in planktonic and sessile

Marielsa Gil[1], Vanessa Colarusso[1], Jessica Ferreira[1], Anna Muñoz[1], Tomás Rojas[2], Greysys Ochoa[1], Esther Perozo[1], Génesis Rojas[1].

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo no fermentador de glucosa comúnmente aislado en infecciones nosocomiales. El incremento de la resistencia a los antibióticos y la participación de este microorganismo en patologías que cursan con formación de biopelículas da como resultado la falla usual de los antimicrobianos, por lo que resulta interesante estudiar el extracto etanólico de propóleos (EEP) como alternativa terapéutica frente a este patógeno oportunista. En este sentido, el objetivo principal del estudio fue evaluar el efecto del EEP sobre *Pseudomonas aeruginosa* en estado planctónico y sésil. El estudio se enmarcó en una investigación de tipo descriptiva, cuasi-experimental. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB) en estado planctónico por el método de macrodilución en tubos y en estado sésil por microdilución sobre biopelículas formadas en placas de poliestireno. Los resultados mostraron que el EEP, posee actividad bacteriostática parcial pero no total a 4% y actividad bactericida a 8% sobre *P. aeruginosa* en estado planctónico. Mientras que en estado sésil no hubo efecto bacteriostático ni bactericida. Se concluye que el EEP del Edo. Táchira Venezuela es efectivo frente a *P. aeruginosa* en estado planctónico pero no tiene actividad antimicrobiana sobre biopelículas formadas por la misma especie.

Palabras Clave: *P. aeruginosa,* extracto etanólico de propóleos, biopelículas, nosocomial, bactericida, bacteriostático.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a glucose non-fermenting Gram-negative bacillus that is commonly isolated in nosocomial infections. The usual antimicrobials failure is the result of the increase in antibiotics resistance and this microorganism's involvement in pathologies with biofilm formation. Therefore, the ethanol extract of propolis becomes an interesting subject of study as a therapeutic alternative against this opportunist pathogen. In this regard, the main objective of this investigation was to evaluate the effect of ethanol extract of propolis (EEP) over *Pseudomonas aeruginosa* in planktonic and sessile state. This research was categorized as a descriptive quasi-experimental type of investigation. It was determined the minimum inhibitory (MIC) and bactericide (MBC) concentration by the macrodilution tubes method in planktonic state, and the microdilution over biofilms formed on polystyrene plates in sessile state. The results showed that whereas there wasn't a bacteriostatic or bactericide effect in sessile state, the EEP possesses 4% of non total but partial bacteriostatic activity and 8% of bactericide activity over *P. aeruginosa* in planktonic state. It concludes that the EEP of the Venezuelan state of Táchira is effective against *P. aeruginosa* in planktonic state but it won't have antimicrobial activity over biofilms formed by the same species.

Key words: *P. aeruginosa,* ethanol extract of propolis, biofilms, nosocomial, bactericide, bacteriostatic.

INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo no fermentador de glucosa, aeróbica, crece en sitios húmedos y con frecuencia se ha asociado a infecciones nosocomiales (1). Este microorganismo es resistente, tanto de manera natural como adquirida, a un gran número de antimicrobianos (2-4). Esto se debe a las características de su membrana celular que le confieren propiedades excepcionales de impermeabilidad a ciertos antibióticos, y a la vez posee trasferencia horizontal de genes que media la resistencia (5). Por ello, se ha evidenciado que en 10,2% de los tratamientos para *P. aeruginosa* emerge una cepa resistente que antes del tratamiento era sensible (2-6).

Las infecciones por *P. aeruginosa* rara vez son adquiridas en la comunidad por pacientes inmunocompetentes; sin embargo, cuando se alteran las barreras normales de la piel y mucosas, frente a estados de inmunodepresión o por disminución de la flora bacteriana intestinal protectora, debido al uso de antimicrobianos de amplio espectro o en pacientes expuestos al ambiente hospitalario, puede actuar como patógeno primario. Bajo estas circunstancias, *P. aeruginosa* puede provocar infecciones graves como:

[1] Departamento de Microbiología. Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas de la Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo. Valencia. Venezuela.

[2] Centro de Investigaciones Microbiológicas Aplicada (CIMA). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de Carabobo.Valencia. Venezuela.

Autor de Correspondencia: Marielsa Gil.

E-mail: marielsagilfd@hotmail.com

Recibido: 03/12/15 **Aprobado:** 18/03/16

bacteriemias, neumonía, infecciones del Sistema Nervioso Central (SNC), infecciones del tracto urinario e infecciones cutáneas (1,4).

Por otra parte, *P. aeruginosa* es considerado un microorganismo con gran capacidad para formar biopelículas (7) y bajo este estado (sésil) se incrementa considerablemente la resistencia antimicrobiana en comparación con el estado planctónico, siendo ésta una característica clínicamente importante; esto explica la falla usual de los antimicrobianos en infecciones que cursan con formación de biopelículas (7,8), aun cuando las pruebas de laboratorio demuestren sensibilidad a los antibióticos utilizados. Esto se debe a que los antibiogramas se desarrollan bajo una condición que tiene escasa relación con los ambientes microbianos verdaderos de algunas patologías infecciosas, esto ha limitado la comprensión respecto a las interacciones entre bacterias y huéspedes. Por ello, se ha propuesto el desarrollo de biopelículas in vitro para usarlas en la determinación de la susceptibilidad a antibióticos (9,10).

La capacidad de formar biopelículas no parece restringirse a ningún grupo específico de microorganismos y en la actualidad, se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas la inmensa mayoría de las bacterias, puede existir dentro de biopelículas adheridos a superficies en una interfase sólido/ líquida (8,11-14).

La formación de biopelículas consta de tres etapas: adsorción reversible, adsorción irreversible y crecimiento (8,11). Esta organización estructural actúa como una barrera física que las hace resistentes a los mecanismos de defensa del huésped, tales como producción de anticuerpos, opsonización, lisis por complemento y fagocitosis, incluso en personas con un excelente estado inmunológico (13-16).

En vista de la problemática de resistencia observada cada vez más con los antibióticos, se están estudiando actualmente otras alternativas para el tratamiento de infecciones microbianas. Entre estas alternativas se encuentran sustancias naturales y de bajo costo como los propóleos que son una mezcla de resinas, ceras, aceites esenciales, polen y microelementos producidas por las abejas Apis mellifera, (Hymenoptera: Apidae) el cual usan para sellar, cubrir y proteger el interior de su colmena de agentes extraños (17).

Entre los principales compuestos químicos con efecto bactericida se encuentran los flavonoides y ácidos fenólicos, entre otros. Sin embargo, la composición de los propóleos varía de acuerdo a varios factores como la situación geográfica, clima, estación del año, por lo que también puede variar la calidad del mismo, por ello los resultados de los estudios que se realicen de los propóleos en determinada región no serán equivalentes a otros (17- 20).

Hasta el momento se han realizado numerosos estudios del efecto del propóleos sobre microorganismos en estado planctónico y escasamente sobre el estado sésil; sobre este último sólo a nivel internacional y debido a que las biopelículas son un importante hallazgo causante de patologías de difícil remoción, esta investigación se orientó a evaluar el estudio del efecto del extracto etanólico de propóleos sobre *P. aeruginosa* en su estado planctónico y sésil, aportando además la metodología para evaluar esta condición in vitro y su posible aplicación como una prueba de rutina de fácil ejecución en pacientes donde se sospecha la participación de películas microbianas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio está enmarcado en una investigación de tipo descriptivo cuasi-experimental (21). Se trabajó con un aislado hospitalario de *Pseudomonas aeruginosa* proveniente de una muestra clínica conservada en el Cepario del Laboratorio de Diagnóstico Bacteriológico del Departamento de Microbiología de la Universidad de Carabobo. Como cepas controles se utilizó *Klebsiella pneumoniae* hospitalaria conservada en el Cepario y *Pseudomonas aeruginosa (ATCC) 27853* para las técnicas relacionadas con formación de biopelículas.

Extracto etanólico de propóleos. Se utilizó un extracto etanólico de propóleos comercial al 60% producido por abejas *A. mellífera* fabricado por el Apiario Terramel del estado Táchira, Venezuela.

Reactivación de las cepas bacterianas. Se reactivaron las cepas cultivándolas en caldo BHI Marca BBL™ y luego se obtuvieron cultivos puros en agar BHI Marca BBL™, de allí se tomaron colonias para realizar pruebas bioquímicas convencionales tales como Kligler, urea, lisina decarboxilasa, OF glucosa, OF xilosa, OF maltosa, OF manitol, gelatina 4%, reducción de nitratos, crecimiento a 42ºC, Polimixina B, prueba de oxidasa, motilidad. (22). Del Agar BHI también se tomó para preparar la suspensión bacteriana ajustada al patrón 0,5 Mac Farland equivalente a 1,5 x 108 UFC/mL

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida del extracto etanólico de propóleos sobre Pseudomonas aeruginosa en estado planctónico. Para las diluciones se utilizó la técnica de macrodilución en tubo sugerida por Gil et al., (2012), modificado cambiando únicamente el uso de diluciones puntuales por seriadas, la cual se describe a continuación: se utilizaron 10 tubos 13 x 100 para las diluciones doble seriada del EEP tal como sigue: Puro, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, Control de Viabilidad de la Cepa o Control Positivo (+), Control de Esterilidad del EEP o Control Negativo (-). Quedando las concentraciones de EEP de la siguiente manera: 60%, 30%, 15%, 8%, 4%, 2%, 1%, 0,5%. Una vez realizadas las diluciones se procedió a inocular cada tubo excepto el tubo 10 (Control Negativo) con 100 µL de la suspensión bacteriana de *P. aeruginosa* hospitalaria al 0,5% de turbidez Mac Farland. Se incubaron por 24 horas a 37ºC. Transcurrido el tiempo de exposición de las bacterias con las distintas concentraciones del EEP,

se procedió a tomar 10 µL de cada tubo para sembrarlo en placas de BHI, utilizando la técnica de siembra en superficie con espátula de Drigalski, así mismo se tomó con asa calibrada 10 µL de cada tubo y se inoculó en caldo BHI. Las placas y los caldos se incubaron durante 24 a 48 horas a 37ºC. Posteriormente, se observó si hubo o no crecimiento del microorganismo tanto en las placas semi-cuantificando las unidades formadoras de colonia (UFC) en cruces, como en los caldos cualitativamente con presencia o ausencia de turbidez, determinando de esta manera las diluciones en la que se consigue la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). Adicionalmente en los tubos y en las placas donde se observó crecimiento bacteriano se realizó tinción de Gram y las pruebas bioquímicas convencionales para su identificación, con la finalidad de confirmar si se trataba de la bacteria utilizada o de una posible contaminación (23).

Cuantificación de la formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa.* Se efectuó mediante la técnica de microplaca en pozos de poliestireno (método colorimétrico) descrita por Al-Shuneigat et al., citado en Rojas et al., (2012). Se ajustó una suspensión bacteriana de P. aeruginosa hospitalaria en Caldo de Soya Tripticasa (CST), comparando visualmente con un patrón de Mac Farland 0,5%. Ajustado el inóculo se procedió a inocular en cada pozo 20 µL de dicha suspensión más 180 µL de CST glucosado al 0,25% (dilución 1:10) y luego se incubo en cámara húmeda por 24 horas a 37°C. Posteriormente, en cada pozo se realizaron 3 lavados con SSF, pH 7,2 estéril para eliminar las células no adheridas. Luego se añadieron 200 µL de solución de cristal violeta al 0,01% manteniéndose a temperatura ambiente por 30 min, para seguidamente realizar 3 nuevos lavados con SSF. A continuación se colocaron 200 µL de etanol al 95% para solubilizar el colorante adherido a las paredes, cuantificándose su densidad óptica como una estimación de la capacidad de formación de biopelículas, para lo cual se leyó a 490 nm utilizando un lector de micro ELISA (Stat Fax 303 Plus). Cada aislado se evaluó por cuadruplicado, incluyendo en cada ensayo ocho pozos controles sin inocular interpretándose estos como negativos y ocho pozos controles con aislados conocidos por sus altas capacidades de formación de biopelículas (cuatro pozos para *K. pneumoniae* y cuatro pozos para *P. aeruginosa* (ATCC) 27853, estos últimos se interpretaron como controles positivos (24,25). La clasificación de cada aislado, en cuanto a su capacidad de formación de biopelículas, fue hecha utilizando el protocolo de Gil et al., 2015 el cual consiste en usar los valores de DO490nm del control positivo (DOc pos) y DO490nm del control negativo (DOc neg) en tres fórmulas diferentes tal como sigue:

VM= DOc pos – (DOc neg)/2

PC1= (VM – DOc neg)/2 + DOc (-)

PC2= (DOc pos –VM)/2 + VM

Donde las siglas significan:

VM: Valor medio

DOc pos: Densidad óptica a 490 nm del control Positivo

DOc neg: Densidad óptica a 490 nm del control Negativo

PC1: primer punto de corte

PC2: segundo punto de corte

Los valores obtenidos sirvieron para establecer los cuartiles de clasificación semicuantitativa de la capacidad de formación de biopelículas en cuatro categorías: Fuerte (F), Moderada (M), Débil (D) y No formadora (N). Interpretado de la siguiente manera:

Serán no formadoras cuando los valores se ubiquen entre la DOc neg hasta cifras ≤ PC1, débilmente formadora cuando los valores se encuentren > PC1 ≤ VM, moderadamente formadoras cuando los valores sean > VM ≤ PC2 y fuertemente formadora con valores > PC2 (26).

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del extracto etanólico de propóleos sobre *Pseudomonas aeruginosa* en estado sésil

Primeramente se diseñó y estandarizó la técnica para la determinación de la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida del extracto etanólico de propóleos sobre *P. aeruginosa* en estado sésil, la misma se basó en la modificación y combinación de 2 técnicas para adaptarla al objetivo perseguido.

Para ello, se consideró el fundamento de formación de biopelículas in vitro en pozos de poliestireno de la técnica de cuantificación de la formación de biopelículas descrita por Al-Shuneigat et al., citado en Rojas et al., (2012) (24), siguiendo todos los pasos sin modificación, hasta la obtención de la formación de biopelículas y los posteriores 3 lavados. De allí en adelante se continúa con el fundamento de la técnica de determinación de la CMI y CMB, referida por Gil et al., (2012) (23), cambiando la modalidad de macrodilución en tubos a microdilución en pozos de poliestireno. Quedando el protocolo de la siguiente manera:

Se ajustó una suspensión bacteriana de *P. aeruginosa* hospitalaria en CST comparando visualmente con un patrón de Mac Farland 0,5%. Ajustada la suspensión bacteriana se inocularon 64 pozos de poliestireno con 20 µL de dicha suspensión más 180 µL de CST glucosado al 0,25% y luego se incubó en cámara húmeda por 24 horas a 37°C y se indujo la formación de biopelículas sobre una superficie lisa por 24 horas. Posteriormente, en cada pozo se realizaron 3 lavados con SSF, pH 7,2 estériles para eliminar las células no adheridas. Se lavaron los excesos para dejar solo la biopelículas. Luego se prepararon diluciones seriadas del EEP colocando 200 µL de EEP puro en el primer pozo, al segundo pozo 200 µL de EEP en una dilución ½ y así sucesivamente hasta llegar a la dilución 1/128 pozo número ocho. Seguidamente, se taparon los pozos con papel parafilm® y se incubaron por 24 horas en cámara húmeda a temperatura ambiente.

Transcurrido el tiempo, se lavaron tres veces cada pozo con SSF para eliminar el exceso de EEP. Por último se colocaron 200 µL de caldo BHI y se mezcló fuertemente para tratar de despegar la biopelícula, se taparon nuevamente los pozos, se incubaron por 24 horas en cámara húmeda a 37°C y se evaluó la viabilidad de la *P. aeruginosa* tomando 10 µL de cada pozo a placas de Agar BHI y a Caldos BHI incubándose por 24 horas a 37°C. Se observó el número de UFC y presencia o ausencia de turbidez respectivamente. La técnica se realizó por cuadruplicado. Se usaron controles positivos (cepas formadoras de biopelículas) y controles negativos (pozos sin inocular).

Análisis de los datos. Se hizo un análisis descriptivo expresando los resultados en tablas para su mejor comprensión, reportándose promedios con la desviación estándar de los datos, realizado en Software Microsoft Office Excel 2010.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se expresa la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de propóleos sobre *P. aeruginosa* en estado planctónico. En la misma se evidencia que hubo efecto bacteriostático parcial (disminución de UFC) pero no total sobre *P. aeruginosa* en estado planctónico a 4%, también se evidenció un efecto bactericida en las 4 concentraciones más altas cuya CMB fue de 8%. En esta tabla también se puede observar que hubo un crecimiento abundante en el control de viabilidad de la cepa sin propóleos (Control +) y un crecimiento nulo en el control negativo o de esterilidad del EEP, lo que valida los resultados obtenidos.

En cuanto a la formación de biopelículas, una vez realizados los cálculos para establecer los cuartiles de clasificación para la cuantificación de la formación de biopelículas, se puede observar en la Tabla 2 que la cepa de *P. aeruginosa* hospitalaria es clasificada como moderadamente formadora de biopelícula.

Por otra parte, la tabla 3 muestra el comportamiento del extracto etanólico de propóleos sobre *P. aeruginosa hospitalaria* en estado sésil observándose crecimiento de > 50 UFC en todas las diluciones.

Tabla 1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria y Concentración mínima bactericida del extracto etanólico de propóleos sobre *Pseudomonas aeruginosa* en estado planctónico.

Placas	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**Control +**	**Control -**
Concentraciones %	60	30	15	8	4	2	1	0,5	(Viabilidad de la cepa)	(Esterilidad del EEP)
P. aeruginosa	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	-
Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	Control +	Control -
Concentraciones %	60	30	15	8	4	2	1	0,5	(Viabilidad de la cepa)	(Esterilidad del EEP)
P. aeruginosa	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-

Placas (+) 1-25 UFC (++) 26-50UFC (+++) >50 UFC (-) Ausencia de desarrollo bacteriano.
Tubos (+) Presencia de desarrollo bacteriano (-) Ausencia de desarrollo bacteriano

Tabla 2. Cuantificación de la formación de biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Bacterias	**Densidad Óptica a 490 nm**
Control Negativo (Pozo Vacío)	0,312
Control Positivo *P. aeruginosa* ATCC	0,809
P. aeruginosa Hospitalaria	0,671
1er Punto corte	0,482
Valor Medio (VM)	0,653
2do Punto de corte	0,731

Valores de Referencia. Entre 0,312 a 0,482: No formador de biopelícula. Entre 0,482 a 0,653: Débilmente formador de biopelícula
> 0,653 a 0,731: Moderadamente formador de biopelícula. > 0,731: Fuertemente formador de biopelícula

Tabla 3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida del extracto etanólico de propóleos sobre *Pseudomonas aeruginosa* en estado sésil.

Placas	1	2	3	4	5	6	7	8	Control +	Control -
Concentraciones %	60	30	15	8	4	2	1	0,5	(Viabilidad de la cepa)	(Esterilidad del EEP)
P. aeruginosa	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	Control +	Control -
Concentraciones %	60	30	15	8	4	2	1	0,5	(Viabilidad de la cepa)	(Esterilidad del EEP)
P. aeruginosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Placas: lectura a las 24h/48h. (+) 1-25 UFC (++) 26-50UFC (+++) >50 UFC (-) Ausencia de desarrollo bacteriano.
Tubos: lectura a las 24h/48h. (+) Presencia de desarrollo bacteriano (-) Ausencia de desarrollo bacteriano

DISCUSIÓN

Para el análisis de los resultados se consideraron los conceptos de CMI y CMB descritos por Gil et al., (2012) tal como sigue: CMI el valor de la menor dilución que inhibió parcial o totalmente el desarrollo de las bacterias sobre el agar BHI, pero no así sobre caldo BHI; y por CMB el valor de la menor dilución en la que no se observa crecimiento de las bacterias en agar BHI y tampoco en caldo BHI (23).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede analizar que el EEP del Edo. Táchira, posee actividad bactericida sobre bacterias Gram negativas. Este hallazgo es importante; ya que diversos trabajos reportan que algunos propóleos en otros países no tienen efecto sobre bacterias Gram negativas, tal es el caso de Gonzales et al., (27) donde investigaron la actividad antibacteriana del propóleos de Goiás, Paraná y São Paulo, Brasil frente a *S. aureus* y *E. coli* y en contraposición con este estudio concluyeron que el EEP inhibe el crecimiento de *S. aureus*, pero no el de *E. coli* (27,28).

Así mismo, se observa que la actividad bactericida ejercida por la tintura de propóleos del Edo. Táchira, Venezuela sobre *P. aeruginosa*, es comparable con los resultados obtenidos por Gil et al., en 2008 (19) los cuales trabajaron con una tintura de propóleos venezolano procedentes del Edo. Cojedes sobre siete bacterias de interés clínico entre las que se encuentra una cepa de *P. aeruginosa* obteniendo una CMB de 15%, resaltando el hecho que el EEP del Edo. Táchira presenta una CMB menor 8%, es decir presenta más poder bactericida que el EEP del estado Cojedes; en este mismo orden de ideas, el trabajo de Ortega et al., (29) demuestra que el EEP de Buenos Aires Argentina inhibió a *P. aeruginosa*. La variabilidad de resultados obtenidos en cada país es debido a una diversidad particular en la flora existente de la región donde las abejas toman la materia prima para producir propóleos, cambiando así la composición química del propóleos producido en cada zona geográfica, de allí la importancia que cada región evalúe las propiedades antimicrobianas de los propóleos autóctonos (17,29).

En este sentido, en Venezuela se ha estudiado la acción bacteriostática y bactericida del EEP autóctonos de diversas regiones del país sobre cepas de: *E. faecalis* CMB 15%, *P. aeruginosa* CMB 15%, *K. pneumoniae* CMB 11%, Complejo *A. baumanii/calcoaceticus* CMB 15%, *E. coli* CMB 11%, *E. meningoséptica* CMB 7,5%, con el EEP de Cojedes y sobre *M. luteus* y *S. aureus* con el EEP de Miranda halos de inhibición hasta 30mm, (17,19) siendo evidentemente excelentes resultados pero en todos los casos en estado planctónico.

No hay reportes nacionales de estudios que evalúen el propóleos sobre bacterias en estado de biopelículas, con el cual se pueda comparar los resultados obtenidos, en el cual no hubo efecto antimicrobiano del propóleos sobre el estado sésil de *P. aeruginosa*. Sin embargo, a nivel internacional existen algunos reportes como el de Griglione 2013, quien evaluó el efecto del propóleos sobre biopelículas de Fusobacterium nucleatum en el que obtuvo un efecto inhibitorio a concentraciones extremadamente altas de propóleos (1562,5 µg/mL) pero no efecto bactericida, mientras que la forma planctónica fue inhibida a 6,250 µg/mL(30). Por otra parte, Kouidhi et al., 2010, Wojtyczka et al., 2013 y Grenier et al., 2015, concuerdan en que el propóleos es capaz de inhibir la formación de biopelículas bloqueando la fase de adherencia en *Streptococcus sp* orales, *Staphylococcus epidermidis* en piel y *Complejo Candida albicans* de canal vaginal respectivamente, por lo que sugieren un uso prometedor en la prevención de enfermedades producidas por la formación de biopelículas (31-33); ahora bien sobre biopelículas ya formada de *P. fluorescens* Dogan et al., 2014 observaron destrucción significativa de este después de la exposición a EEP Turcos por 48 horas pero a concentraciones más altas que las necesarias para inhibir la formación de este (34).

CONCLUSIÓN

En el presente estudio se puede concluir que el EEP utilizado tiene actividad bactericida sobre *P. aeruginosa* a una concentración relativamente baja, lo cual indica que presenta una alta efectividad contra bacterias Gram

negativas, por tanto en estado planctónico, se coincide con algunas investigaciones de otros autores, donde exponen que los EEP puede ser utilizado como un excelente antimicrobiano.

Así mismo, esta investigación demostró que el EEP utilizado no ejerce acción bacteriostática ni bactericida sobre biopelículas formadas por *P. aeruginosa* in vitro. Esto señala que el EEP no fue capaz de penetrar o dañar suficientemente la compleja matriz formada por proteínas de membrana externa, pili tipo IV, exopolisacáridos y ácidos nucleicos característica de *P. aeruginosa* como para eliminar la viabilidad del microorganismo, aun cuando la cepa estudiada fue moderadamente formadora de biopelículas. En este sentido, los resultados obtenidos sugieren que el EEP del Edo Táchira Venezuela no será efectivo en infecciones donde se encuentre *P. aeruginosa* en estado sésil. Sin embargo, años de investigación han demostrado resultados disímiles en el efecto antimicrobiano de EEP de diversas regiones sobre una gran variedad de agentes microbianos en estado planctónico, lo que sugiere que las futuras investigaciones deben apuntar hacia la evaluación de otros EEP sobre diferentes bacterias de interés clínico en estado sésil. Así como también hacia la búsqueda de nuevas sustancias alternas de tratamiento o mezclas de éstas que sean capaces de eliminar o dispersar las biopelículas formadas por este y otros microorganismos.

Agradecimiento. Los autores agradecemos al Apicultor Favio Galaviz por fabricar y proporcionar el EEP para esta investigación.

REFERENCIAS

1. Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa*. En Mandell, Douglas, Bennet eds. Enfermedades Infecciosas: Principios y Prácticas. 5ª Ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana SA 2002; 2802-2834.
2. Van Eldere J. Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections. J Antimicrob Chemother 2003; 51: 347-52
3. Brenner P, Pohlenz M, Otaíza F, Valenzuela M. Informe de vigilancia epidemiológica de las infecciones intrahospitalarias. Ministerio de Salud de Chile 2001.
4. Restrepo A, Robledo J, Leiderman E, Restrepo M, Botero D, Bedoya VI eds. Enfermedades Infecciosas. Medellin: CIB; 2003: 460-462.
5. Conejo M, Garcia I, Martínez L, Picabea L, Pascual A. Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases Oprd expression, causing carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 7: 2313-2315.
6. Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos G, Samore M. Emergence of Antibiotic- Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Comparison of risk associated with different antipseudomonal agent. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1379-1382.
7. Ochoa S, López-Montiel F, Escalona G, Cruz-Córdova A, Dávila L, López-Martínez B, Jiménez-Tapia, et al. Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. Bol Med Hosp Infant Mex 2013; 70(2):138-150
8. Nazar J. Biofilms bacterianos. Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello 2007; 67: 61-72
9. Bryers J. Medical biofilms. Biotechnol Bioeng. 2008; 100:1–18.
10. Florián C, Alvarado D, Coha J. Evaluación in vitro de la resistencia a ciprofloxacina en biopelículas y poblaciones planctónicas de *Pseudomonas aeruginosa* de origen hospitalario. An Fac Med Lima 2006; 67(4): 290-297
11. Stewart P y Costerton J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. The Lancet 2001; 135-138.
12. Singh P, Schaeffer A, Parsek M et al. Quorum sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. Nature 2000; 401:762-4.
13. Post J, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich G. The role of biofilms in otolaryngologic infections. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg 2004; 12: 185-90.
14. Costerton J, Stewart P, Greenberg E. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999; 284:1318-22.
15. Chole R, Faddis B. Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: A possible mechanism to explain chronicity. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2003; 129: 634-6.
16. Sanderson A, Leid J, Hunsaker D. Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. Laryngoscope 2006; 116: 1121-6.
17. Manrique, A. Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado Miranda, Venezuela. Efecto de la variación estacional. Zoot Trop 2006; 24 (1):43-53.
18. Ugur A, Barlas M, Ceyhan N, Turkmen V. Antimicrobial effects of propolis extracts on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains resistant to various antibiotics and some microorganisms. J Med Food 2000; 3(4):173-80.
19. Gil M, Reyes D, Rojas T, Flores M. Actividad bacteriostática y bactericida de una tintura de propóleo proveniente del estado Cojedes sobre bacterias de interés clínico. Bol Venez de Infectol 2008; 19 (2): 124.
20. Berretta A, Nascimento A, Bueno P, Marchetti J. Propolis standardized extract (EPP-AF®), an innovative chemically and biologically reproducible pharmaceutical compound for treating wounds. Int J Biol Sci 2012; 8(4): 512-521.
21. Sierra C. Estrategias para la elaboración de un proyecto de investigación. Venezuela. 2004.
22. Koneman E, Winn W, Allen S, Janda W, Procop G, Schreckenberger P, et al. Diagnóstico microbiológico. 6ta ed. Madrid-España: Editorial Médica Panamericana; 2008.
23. Gil M, Perelli A, Alvarado R, Arias y Blumenthal E. Actividad bacteriostática y bactericida de la tintura de propóleos sobre bacterias enteropatógenas. Rev Salus 2012; 16 (3):29-37

24. Rojas T, Montoya A, Moreno A, Mujica R. Vásquez Y. Formación de biopelículas y susceptibilidad antimicrobiana entre coliformes aislados en agua potable embotellada en Carabobo, Venezuela. Bol. Mal. Salud Amb 2012; 52(1): 87-97.

25. Rojas T, Márquez E, Lugo R, Machado M, Vásquez Y, Fernández Y, Gil M. Bacilos gramnegativos no fermentadores en agua embotellada: susceptibilidad antimicrobiana y formación de biopelículas. Rev Soc. Vzla Micro 2014; 34 (2): 64-69

26. Gil M, Merchán K, Quevedo G, Sánchez A, Nicita G, Sánchez J, Finol M. Formación de Biopelículas en aislados de *S. aureus* según la susceptibilidad antimicrobiana y la procedencia clínica. Rev Vitae 2015; 62 (2):1-8

27. Gonzales G, Orsi R, Fernandes A, Rodrigues P, Funari S. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. J Venom Anim Toxins 2006; 12 (2)

28. Marcucci M, Ferreres F, García-Viguera C, Bankova V, De Castro S, Dantas A. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. J Ethnopharmacol. 2001; 74 (2):105-112.

29. Ortega N, Benitez-Campo N, Cabezas-Fajardo F. Actividad antibacterial y composición cualitativa de propóleos provenientes de zonas climáticas del Departamento del Cauca. Rev Bio Agro 2011; 9(1), 8-16.

30. Griglione, A. Efficacy of propolis against Fusobacterium nucleatum biofilm. Indiana University. 2013; Thesis to obtain the title of Master. Available in: https://scholarworks.iupui.edu/handle/1805/3720

31. Kouidhi B, Zmantar T, Bakhrouf A. Anti-cariogenic and anti-biofilms activity of Tunisian propolis extract and its potential protective effect against cancer cells proliferation. Anaerobe. 2010; 16(6):566-71.

32. Wojtyczka R, Kępa M, Idzik D, Kubina R, KabaBa-Dzik A, Dziedzic A, Wąsik T. In Vitro Antimicrobial activity of ethanolic extract of polish propolis against biofilm forming *Staphylococcus epidermidis* strains. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013; (1): 1-11

33. Grenier I, De Souza P, Arita G, Araújo R, Lopes M, Bruschi M, Negri M, et al. Propolis is an efficient fungicide and inhibitor of biofilm production by vaginal *Candida albicans*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015; (1): 1-9

34. Dogan N, Doganli G, Ülger G, Habesoglu D, Güzel S, Yasar Y, Arar D, Sensoy T, Bozbeyoglu N. Antibiofilm effect of two propolis samples from Turkey. Journal of Applied Biological Sciences 2014. 8 (2): 27-31

Universidad de Carabobo

Salus

Facultad de Ciencias de la Salud

Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud-Universidad de Carabobo

Volumen 20 - N° 1 - Año 2016

Presidente del Consejo Superior
José Corado

Editora
Marisol García de Yegüez

Co-Editor
Germán González

Asesor Técnico
Milagros Espinoza

Miembros
Amarilis Guerra
Harold Guevara
Yalitza Aular
Belén Salinas
Aldo Reigosa

Salus Online
Ricardo Montoreano

Asesores
Mercedes Márquez - Cruz Manuel Aguilar - Wolfan Araque - María Jordán de Pelayo - Gladys Febres - Ricardo Montoreano - Julio González - Juan E. Ludert - Guillermo Wittembury - Michael Parkhouse César Pérez Maldonado - Esmeralda Vizzi

Colaboradores
Jeannette Silva (Dpto. Idiomas UC)
Mayra Rebolledo (webmaster)

Correctores de Redacción y Estilo
Jeannette Silva
Sioly Mora de Orta
Luis Díaz

Árbitros
Miembros del personal docente y de investigación de la Universidad de Carabobo y otras instituciones de educación superior.

http://servicios.cid.uc.edu.ve/fcs/
http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/