

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE MIELES ESPAÑOLAS ACOGIDAS A MARCAS DE CALIDAD

Combarros-Fuertes P. *¹, Tornadizo M.E.¹, Castro J.M.², Fresno J.M.¹ y Estevinho L.M.³

¹Departamento de Higiene y Tecnología de Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. 24071. León. España.

pcomf@unileon.es

²Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales. Universidad de León. 24071. León. España.

³CIMO. Centro de Investigación de Montaña. Escuela Superior Agraria. Instituto Politécnico de Bragança. 5301-855. Bragança. Portugal.

Palabras clave:

Mucositis oral, patógeno, resistencia

RESUMEN

El objetivo del estudio fue valorar la capacidad antimicrobiana frente a diferentes cepas de referencia (*Staphylococcus aureus subsp. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*), de mieles de diferentes orígenes florales y geográficos y valorar las posibles diferencias en dicha capacidad entre mieles similares de diferentes cosechas. Se seleccionaron seis mieles españolas acogidas a marcas de calidad, así como dos mieles ecológicas recogidas durante dos cosechas consecutivas. Los tests antimicrobianos fueron llevados a cabo en microplacas de 96 pocillos utilizando caldo nutritivo o medio BHI para las bacterias y medio YPD para la levadura. El inóculo fue añadido a todas las pocillos y las microplacas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas en el caso de las bacterias y a 25°C durante 48 horas en el caso de las levaduras. La actividad antimicrobiana fue detectada adicionando 20 µl de una solución de TTC (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazoilo) al 1%. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue definida como la concentración de miel más baja capaz de inhibir el crecimiento microbiano. Según los resultados observados podemos concluir que las mieles estudiadas presentan principalmente actividad antibacteriana a unas CMI en torno al 20%.

INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores problemas sin resolver en el ámbito de la salud pública desde comienzos de siglo es la aparición de resistencias microbianas a los agentes antimicrobianos de uso común. La evolución incesante de resistencias unida a la disminución en el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos activos contra patógenos resistentes ha conducido a un aumento en el número de casos en los que el patógeno es resistente a la mayoría o incluso a todos los fármacos disponibles para su tratamiento. Ante esta situación son necesarias alternativas terapéuticas eficaces y a ser posible que no permitan la aparición de cepas resistentes.

La miel es un alimento natural con propiedades bioactivas conocidas desde la antigüedad. Sus propiedades antimicrobianas han sido descritas por muchos autores (Garedew y col., 2004; Estevinho y col., 2008; Truchado y col., 2009; Fidaleo y col., 2010; Gomes y col., 2010; Silici y col., 2010; Deb Mandal y Mandal, 2011; Feas y col., 2011; Melliou y Chinou, 2011; Patel y col., 2011; Voidarou y col., 2011; Ayaad y col., 2012). Además de su alta osmolaridad, su baja actividad de agua y la presencia de ácidos orgánicos, las propiedades antimicrobianas de la miel se relacionan también con otros compuestos minoritarios presentes en la misma. Entre estos compuestos se encuentran el peróxido de hidrógeno, enzimas como, la catalasa (Weston, 2000) o la lisozima así como ácidos fenólicos y flavonoides (Snowdon y Cliver, 1996) o péptidos bioactivos de bajo peso molecular.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad antimicrobiana de mieles españolas de diferentes orígenes florales y geográficos con vistas a una posible utilización de las que presenten una mayor capacidad antimicrobiana en la prevención y tratamiento de la mucositis oral. La mucositis oral es un efecto secundario a los tratamientos de radio y/o quimioterapia que afecta al 80-90% de los pacientes que la reciben. Se trata de un proceso complejo en el que intervienen el daño oxidativo y el daño directo al ADN, la inflamación y la

colonización de la mucosa por microorganismos patógenos. Los tratamientos que existen actualmente no son del todo satisfactorios y en el caso de la terapia antimicrobiana existe desarrollo de resistencias. La miel podría ser una alternativa terapéutica más eficaz y menos costosa, ya que presenta de forma simultánea actividad frente a diferentes mecanismos fisiopatológicos implicados en el desarrollo de la mucositis.

Por otro lado se valoraron también las posibles diferencias que se pueden presentar en la capacidad antimicrobiana de mieles con un mismo origen floral y geográfico pero cosechadas en diferentes años.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras de miel

Se seleccionaron seis mieles españolas de diferentes orígenes florales y geográficos, acogidas a marcas de calidad. Miel de aguacate (*Persea* sp.) y miel de castaño (*Castanea* sp.) de la DOP *Miel de Granada*; miel de espliego (*Lavandula* sp.) y miel de romero (*Rosmarinus officinalis*) de la DOP *Miel de La Alcarria*; miel de silva (*Rubus* sp.) y miel de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) de la IGP *Miel de Galicia*, así como dos mieles ecológicas miel de tomillo (*Thymus* sp.) y miel de brezo (*Erica* sp.), recogidas durante dos cosechas consecutivas, años 2010 y 2011. Además fue utilizada como control una miel de Manuka, considerada de grado médico, con una capacidad o *factor Manuka* MGO 550⁺, destacada en la bibliografía como una de las más activas en relación a su capacidad antimicrobiana.

Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana fue medida frente a cepas de referencia de microorganismos patógenos asociados a la presencia de mucositis oral. En concreto fueron estudiadas cepas de dos bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CECT 86 y *Streptococcus pyogenes* CECT 985), dos bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* CECT 515 y *Pseudomonas aeruginosa* CECT 110) y de una levadura (*Candida albicans* CECT 1002). El inóculo utilizado para los ensayos se preparó como una suspensión de microorganismos en agua destilada ajustada a 0,5 en la escala Mac Farland confirmada por espectrofotometría con lecturas a 580 nm para bacterias o 640 nm para levaduras. Los tests antimicrobianos fueron llevados a cabo según Silva y col., 2012 con algunas modificaciones. Se utilizó caldo nutritivo o medio BHI para las bacterias y medio YPD para la levadura en microplacas de 96 pocillos. Las muestras de miel fueron diluidas en agua estéril y colocadas en la primera línea de pocillos. Posteriormente se llevaron a cabo diluciones seriadas de dichas muestras. El inóculo fue añadido a todas las diluciones y las microplacas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas en el caso de las bacterias y a 25°C durante 48 horas en el caso de las levaduras. En cada experimento se trabajó con un control positivo (medio inoculado) y un control negativo (medio de cultivo sin inocular). La actividad antimicrobiana fue detectada adicionando 20 µl de una solución de TTC (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio) al 1%. La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue definida como la concentración de miel más baja capaz de inhibir el crecimiento microbiano que fue visualizado por la reducción microbiana del TTC y la aparición de una coloración. Todos los test fueron realizados por triplicado y los resultados expresados en mg/ml.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antimicrobiana de las muestras de miel utilizadas en este estudio quedan recogidos en la tabla 1 y se expresaron como las concentraciones mínimas de miel (mg/ml) capaces de inhibir el crecimiento microbiano.

De forma general se observa que las diferentes mieles estudiadas muestran un espectro de acción antimicrobiana muy parecido, estableciéndose diferencias no significativas entre unas muestras y otras. A pesar de estos resultados son varios los autores que describen una gran variabilidad entre el origen floral de la miel y su capacidad antimicrobiana (Baltrusaityte y col., 2007; Mundo y col., 2004; Taormina y col., 2001) y una clara diferenciación entre la sensibilidad de microorganismos gram-positivos y gram-negativos (Socha y col., 2009; Taormina y col., 2001; Basualdo y col., 2007; Estevinho y col., 2008) algo que tampoco se

pone de manifiesto en este estudio ni fue observado por otros autores como Isla y col., 2011. La miel de Manuka mostró una buena actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, *S. pyogenes* y *E. coli* aunque la actividad fue similar o inferior en los demás casos, este resultado es esperable dada la especial sensibilidad de los microorganismos al metilglioxal, compuesto presente en este tipo de miel pero ausente a concentraciones detectables en el resto de mieles ensayadas.

Es bien conocida la capacidad de resistencia osmótica de las levaduras lo que explica su relativa insensibilidad a la miel en comparación con las bacterias estudiadas. Fueron necesarias concentraciones de miel en torno a 0,538-0,605 mg/ml para producir la inhibición en el crecimiento de *C. albicans* si bien algunas muestras como la miel de eucalipto cosechada en el año 2011 y la miel de romero no consiguieron esta inhibición ni a las concentraciones más altas. Esta mayor resistencia de *C. albicans* ha sido descrita por otros autores (Lusby y col., 2005; Moussa y col., 2012)

Tabla 1. Concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) (mg/ml) obtenidas para la actividad antimicrobiana de muestras de miel frente a microorganismos de referencia (valor medio \pm SD)

Muestra	Año	<i>S.aureus</i>	<i>S.pyogenes</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>C.albicans</i>
Aguacate	2010	NI	0,168 \pm 0,07	NI	0,251 \pm 0,00	0,600 \pm 0,00
	2011	0,252 \pm 0,00	0,209 \pm 0,07	0,252 \pm 0,00	0,252 \pm 0,00	0,605 \pm 0,00
Castaño	2010	0,254 \pm 0,00	0,212 \pm 0,07	0,254 \pm 0,00	0,212 \pm 0,07	0,603 \pm 0,00
	2011	0,252 \pm 0,00	0,252 \pm 0,00	0,252 \pm 0,00	0,252 \pm 0,00	0,603 \pm 0,00
Silva	2010	0,212 \pm 0,07	0,212 \pm 0,07	0,254 \pm 0,00	0,169 \pm 0,07	0,556 \pm 0,00
	2011	0,252 \pm 0,00	0,252 \pm 0,00	NI	0,252 \pm 0,00	0,602 \pm 0,00
Eucalipto	2010	0,253 \pm 0,00	0,253 \pm 0,00	0,253 \pm 0,00	0,253 \pm 0,00	0,604 \pm 0,00
	2011	0,250 \pm 0,00	0,250 \pm 0,00	0,250 \pm 0,00	0,250 \pm 0,00	NI
Romero	2010	NI	0,254 \pm 0,00	NI	NI	NI
	2011	NI	NI	0,2543 \pm 0,00	0,2543 \pm 0,00	NI
Espliego	2010	0,252 \pm 0,00	0,252 \pm 0,00	0,252 \pm 0,00	0,252 \pm 0,00	0,600 \pm 0,00
	2011	-	-	-	-	-
Brezo	2010	0,251 \pm 0,00	0,125 \pm 0,00	0,251 \pm 0,00	0,251 \pm 0,00	0,589 \pm 0,00
	2011	0,254 \pm 0,00	0,1691 \pm 0,07	0,254 \pm 0,00	0,254 \pm 0,00	0,538 \pm 0,03
Tomillo	2010	0,253 \pm 0,00	0,1263 \pm 0,00	NI	0,253 \pm 0,00	0,605 \pm 0,00
	2011	NI	0,254 \pm 0,00	NI	0,254 \pm 0,00	0,603 \pm 0,00
Manuka	2010	-	-	-	-	-
	2011	0,063 \pm 0,00	0,127 \pm 0,00	0,127 \pm 0,00	0,211 \pm 0,07	0,604 \pm 0,00

NI las concentraciones de miel utilizadas no inhibieron el crecimiento microbiano

(*)Existen diferencias significativas entre muestras del mismo tipo cosechadas en diferentes años

(-) No existe muestra de la cosecha consecutiva para poder realizar una comparativa entre cosechas

La actividad antimicrobiana no varió ostensiblemente según el año de cosecha aunque se observaron diferencias de actividad reseñables en relación con la sensibilidad relativa de especies concretas según el tipo de miel, en algunos casos se observó correlación entre una disminución de la actividad con respecto al tiempo transcurrido desde la cosecha.

CONCLUSIONES

La actividad antimicrobiana de las mieles estudiadas es esencialmente antibacteriana con valores de CMI cercanas al 20%.

La actividad antifúngica frente a *Candida albicans* fue comparativamente muy inferior requiriendo en todo caso concentraciones por encima del 50% para observar una actividad apreciable.

Son necesarios estudios encaminados a determinar la contribución relativa de diversos mecanismos de acción como el pH, la presencia de peróxido de hidrógeno o la presencia de péptidos activos de pequeño peso molecular, así como estudios que permitan dilucidar a qué niveles actúan los diferentes mecanismos antimicrobianos implicados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento a la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León por la concesión de una ayuda para la contratación de personal investigador

de reciente titulación universitaria cofinanciado por el Fondo Social Europeo a Patricia Combarros Fuertes.

Los autores también desean expresar su agradecimiento a la Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León por la concesión del proyecto de investigación GRS 551/A/10.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Diaz, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., Damiani, E., Astolfi, P., Bompadre, S., Battino, M. (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2490–2499.
- Ayaad, T.H., Shaker, G.H., Almuhnaa, A.M. (2012). Isolation of antimicrobial peptides from *Apis florea* and *Apis carnica* in Saudi Arabia and investigation of the antimicrobial properties of natural honey samples. *Journal of King Saud University Science*, 24, 193–200.
- Baltrusaityte, V., Venskutonis, P. R., Ceksteryte, V. (2007). Antibacterial activity of honey and beebread of different origin against *S. Aureus* and *S. epidermis*. *Food Technology and Biotechnology*, 45, 201–208.
- Basualdo, C., Sgroj, V., Finola, M.S., Marioli, J.M. (2007). Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Veterinary Microbiology*, 124, 375–381.
- Deb Mandal, M., Mandal, S. (2011) Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 154–160.
- Estevinho, L., Pereira, A.P., Moreira, L., Dias, L. G., Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3774–3779.
- Feás, X., Estevinho, L. (2011). A survey of the in vitro antifungal activity of heather (*Erica* sp.) organic honey. *Journal of Medicinal Food*, 14, 1284–1288.
- Fidaleo, M., Zorro, A., Lavecchia, R. (2010) Honey: a natural antimicrobial agent against foodborne pathogens? *Special Abstracts / Journal of Biotechnology*, 150S, S1–S576.
- Garedew, A., Schmolz, E., Lamprecht, I. (2004). Microcalorimetric investigation on the antimicrobial activity of honey of the stingless bee *Trigona* spp. and comparison of some parameters with those obtained with standard methods. *Thermochimica Acta*, 415, 99–106.
- Gomes, S., Dias, L.G., Moreira, L.L., Rodrigues, P., Estevinho, L. (2010). Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 544–548.
- Isla, M.I., Craig, A., Ordoñez, R., Zampini, C., Sayago, J., Bedescarrasbure, E., Alvarez, A., Salomón, V., Maldonado, L. (2011). Physico-chemical and bioactive properties of honeys from Northwestern Argentina. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1922–1930.
- Lusby, P.E., Coombes, A.L., Wilkinson, J.M. (2005). Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Archives of Medical Research*, 36, 464–467.
- Melliou, E., Chinou, I. (2011). Chemical constituents of selected unifloral Greek bee-honeys with antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 129, 284–290.
- Moussa, A., Nouredine, D., Saad, A., Abdelmelek, M., Abdelkader, B. (2012). Antifungal activity of four honeys of different types from Algeria against pathogenic yeast: *Candida albicans* and *Rhodotorula* sp. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 554–557.
- Mundo, M. A., Padilla-Zakour, O. I., Worobo, R. W. (2004). Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 1–8.
- Patel, R.V., Thaker, V.T., Patel, V.K. (2011). Antimicrobial activity of ginger and honey on isolates of extracted carious teeth during orthodontic treatment. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, S58–S61.
- Silici, S., Sagdic, O., Ekici, L. (2010). Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of *Rhododendron* honeys. *Food Chemistry*, 121, 238–243.
- Silva, J.C; Rodrigues, S; Feás, X; Estevinho, L.M. (2012). Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food and Chemical Toxicology* 50: 1790–1795.
- Snowdon, J.A., Cliver, D.O., 1996. Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology* 31, 1–26.

- Socha, R., Juszczak, L., Pietrzyk, S., Fortuna, T. (2009). Antioxidant activity and phenolic composition of herb-honeys. *Food Chemistry*, 113, 568-57.
- Taormina, P. J., Niemira, B. A., Beuchat, L. R. (2001). Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 217-225.
- Truchado, P., López-Gálvez, F., Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., Allende, A. (2009). Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics. *Food Chemistry*, 115, 1337-1344.
- Voidarou, C., Alexopoulos, A., Plessas, S., Karapanou, A., Mantzourani, I., Stavropoulou, E., Fotou, K., Tzora, A., Skoufos, I., Bezirtzoglou, E. (2011). Antibacterial activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Anaerobe*, 17, 375 -379.
- Weston, R.J., 2000. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry* 71, 235-239.