

TITULO: DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DE MIEL DE ABEJAS PROVENIENTES DE PLANTACIONES DE NARANJA (*Citrus sinensis* L. *osbech*).

AUTORES: Gisela Valdés González¹, Nidia M. Rojas Hernández² y Miguel Ruiz Rodríguez.¹

1. Centro de Investigaciones Apícolas, Cuba.

2. Facultad de Biología. Universidad de la Habana, Cuba.

RESUMEN

La miel de abejas es un producto natural de alto valor nutritivo y un reconocido valor medicinal. Por otra parte, Cuba cuenta con un clima favorable que posibilita la obtención de este producto apícola durante casi todo el año.

Este trabajo tuvo como objetivo determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de muestras de miel de abejas recolectadas en plantaciones de *Citrus sinensis* L. *osbech* frente a diferentes cepas bacterianas. Para ello se empleó el método de doble difusión de medio agarizado con cortes cilindricos y se obtuvo como resultado que las cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, y *Proteus mirabilis* fueron más sensibles que las cepas de *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia marcescens*.

INTRODUCCION

A la miel, dulce producto elaborado por las abejas (*Apis mellifera*. L) a partir del néctar de las flores, se le atribuye desde la antigüedad numerosas propiedades medicinales preventivas, curativas y también como alimento ideal por su valor dietético y nutritivo.

Unas de las propiedades de la miel que aun no hemos mencionado y que constituye el objetivo de este trabajo es su actividad antimicrobiana. Salashinski y Shaidetskaia, 1974 determinaron que cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus sp* resultaron ser sensibles a las mieles utilizadas, además plantearon que esta actividad antibacterina es más pronunciada sobre las bacterias grampositivas que sobre las gramnegativas.

Por otra parte han demostrado que no es posible establecer ninguna relación entre la composición química de las mieles y la acción antimicrobiana; al mismo tiempo que los factores activos de las mieles son termolábiles, termoestables y ejercen influencia bactericida y bacteriotáticas en todas las cepas empleadas (Daghie y col, 1971 y Dahie y Ialomiteanu, 1973).

Este producto natural se emplea en algunos países en la industria farmacéutica como producto apiterapéutico, formando parte de preparados de miel, polen y jalea real, para el tratamiento de trastornos de nutrición, afecciones hepáticas y nerviosas, y en la industria cosmética formando parte de preparados con acción emoliente y renegadora de la piel (Velesio y Ciuca, 1973).

En pezquizaje de nuevas fuentes naturales rica en principios activos desde el punto de vista terapéutico, es el objetivo de este trabajo evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* muestras de mieles de naranja (*Citrus sinensis* L *osbech*) a fin de constatar si presentan o no este tipo de acción empleando bacterias, con la finalidad de conocer y aprovechar al máximo nuestros recursos naturales.

Esta estudio sirve de base a distintos preparados que se emplean como suplementos nutricionales, en el tratamiento de afecciones así como en productos de tipo cosméticos que son elaborados para consumo nacional y para la exportación.

MATERIALES Y METODOS.

Las 18 muestras de mieles de abeja de naranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) procedentes de apiarios ubicados en Torrientes, Municipio Jagüey Grande, provincia Matanzas fueron enfrentadas a 11 cepas bacterianas empleando para ello el método de difusión radial en doble capa de medio agarizado con cortés cilíndricos.

Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se prepararon suspensiones bacterianas provenientes de cultivos de 18 horas, a una concentración de 10^8 células por ml que fue añadido a Agar Muller Hilton fundido a 45°C y posteriormente sobre placas Petri con una capa base después de solidificado se abrieron orificios de 8 mm de diámetro a los que se le añadió 0.05 mL (50 µl) de la miel y de las diluciones sucesivas hasta 1/32.

Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 horas y para la lectura de los resultados se tomaron como positivos los orificios en torno a los cuales se observó un halo transparente de inhibición del crecimiento, expresándolo en mm.

La determinación del pH de las muestras de mieles se realizó según NC: 371:04. Y con el propósito de determinar si el pH de las mieles es el responsable de la inhibición del crecimiento bacteriano, se procedió a preparar soluciones bufferadas estériles a los valores de pH encontrados (3.8, 3.9 y 4.0), las cuales se tomaron como control frente a todas las cepas y se utilizó para ello el método mencionado para la determinación de la actividad antibacteriana de las mieles.

A los valores encontrados se les aplicó un análisis de varianza para datos desbalanceados con vista a interpretar estadísticamente los resultados.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los valores de pH encontrados para las diferentes muestras de miel de abejas estudiadas, estuvieron entre los valores 3.8 - 4.2, donde el mayor número de muestras correspondieron a valores entre 3.8 - 4.0, estos valores se corresponden con pH ácidos lo que pudiera ser el factor antibacteriano de estas mieles (Lockhead, citado por Root, 1960 y Jachimowicz, 1980).

Esta posibilidad se descartó por los resultados obtenidos al evaluar la posible acción antibacteriana de los controles preparados con solución bufferada estériles de pH 3.8, 3.9 y 4.0, donde se obtuvo crecimiento en todos los casos, lo cual indica que no es la acidez la responsable de la inhibición del crecimiento encontrada en las mieles y sus diluciones.

En la tabla No 1 se exponen los resultados encontrados de la determinación de la actividad antibacteriana de las mieles probadas, donde se puede observar que las cepas de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* fueron las más sensibles, ya que aportaron los mayores valores de halos de inhibición y fueron sensibles al 94 - 100 % de las mieles.

Resultados similares frente a las cepas *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Staphylococcus aureus* fueron encontrados por Cabrera y colb, 2006, de igual manera frente a esta última cepa concuerda con lo planteado por Molan, 1992 y Cooper y colb, 2002 de ser una cepa sensible a la actividad inhibitoria de la miel de abejas.

La menor actividad inhibitoria de las mieles de naranja, se encontró frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* y *Serratia marcescens*.

Debemos resaltar el comportamiento de las mieles no efectivas frente a estos microorganismos encontrándose en algunos halos de sobrecrecimiento, parece ser que al no actuar los factores antibacterianos, estos microorganismos aprovechan los elementos nutritivos presentes y estimulan su crecimiento.

Los resultados de la baja sensibilidad de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus*

subtilis en este estudio no coinciden con los encontrados por Cabrera y colb, 2006, quienes obtuvieron sensibilidad de estas cepas no debidas al peroxido de hidrogeno de mieles zulianas. Por otro lado (ver tabla 1) se exponen las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) encontradas para cada uno de los microorganismos estudiados, donde se observa que a la concentración del 25 % de miel es capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias mas sensibles de este trabajo, mientras que las demás cepas que resultaron menos sensibles requieren el 50 - 100 % de concentración de miel para ser inhibidas.

Parece ser que en este trabajo la acción antibacteriana no esta asociada a la activación de la enzima glucosidasa que se realiza en las diluciones diluidas y por consiguiente una mayor formación de peroxido de hidrogeno (White y colb, 1963 mencionado por Dustamnn y Gunst, 1982 ya que la acción inhibitoria se pierde a diluciones superiores al 25 % de miel de abejas.

Los resultados del análisis estadístico manifestó una gran variabilidad de la acción antibacteriana entre las muestras de mieles probadas para un nivel de significación del 99 %, esto pudiera deberse a la presencia de otras floraciones existentes en estas plantaciones de naranja produciendo esta variación de actividad en dependencia del origen floral (Molan y Rusell, 1988).

Es posible apreciar a través de los resultados que es evidente que las mieles de naranja (*Citrus sinencis L osbech*) utilizadas en este trabajo muestran actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano.

Por los resultados obtenidos no es posible delimitar el espectro de acción de las mieles de naranja, con respecto a las bacterias grampositivas y gramnegativas, puesto que se encontraron valores altos de inhibición y valores negativos en ambos grupos.

CONCLUSIONES

- 1- Las mieles de naranja (*Citrus sinencis L osbech*) utilizadas presentan actividad inhibitoria del crecimiento bacteriano.
- 2- Las cepas de *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* fueron sensibles a las mieles probadas.
- 3- La CMI para las cepas sensibles fue del 25 % de miel.
- 4- El pH ácido de las mieles no es el factor responsable de la inhibición del crecimiento bacteriano.
- 5- Existen diferencias significativas de la actividad antibacteriana entre las muestras de mieles estudiadas.

BIBLIOGRAFIA

- Cabrera, L, Céspedes. E, Nava. R y Ojeda de Rodríguez. G. Actividad antibacteriana no-peróxido de mieles zulianas. Revista Científica, FC-LUZ/Vol. XVI; No. 5, 556-563, 2006
- Cooper, R.A, Molan, P.C. and Harding, K.G The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. Jurnal of Applied Microbiology. 93, 857-863, 2002
- Daghie, V; Cirnu, I y Cioca, V. Contribución acerca de la acción bactericida y bacteriostática producida por las mieles de *Physokermes* sp en la zona de bosques coníferos. En XXIII Cong. Int. Apicultura.-- Bucarest: Apimondia, 593 – 594, 1971.
- Dustmann, J.H y Gunst, E. Inhibinas y acción bacteriotática del pan de abejas. *Apiacta* (2): 51-53, 1982.
- Grove, D.C y Randall, W.A. Assay methods of antibiotics. En. A Laboratory Manual Medical Encyclopedia Inc. New York, 1955.

- Ialomiteanu, M y Dagie, V. Investigaciones sobre los principios antibióticos de la miel. En. XXIV Cong. Int. Apicultura.-- Bucarest: Apimondia, 1973.-- p430-440.
- Jachimowicz, T. Utilización de los productos apícolas en la alimentación y en la terapéutica. Apiacta (3): 115- 116, 1980.
- Molan, P.C y Rusell, K.M. Non-peroxide antibacterial activity in some new Zealand honeys. Journal of Apicultural Research. 27(1): 62-67, 1988.
- Molan, C.P. The antibacterial activity of honey. The nature of antibacterial activity. Bee World. Vol 73 No.1, 1992.
- NC: 371:04. Miel de abejas. Especificaciones
- Root, A.I. Miel como antiséptico. En. ABC y XYZ de la Apicultura. Enciclopedia de la cría científica y práctica de la abeja. Habana: Ciencia y Técnica, 1960.-- p.407.
- Salashinski, N.A y Shaidetskaia, V.G. La actividad antimicrobiana de la miel. Pchelovodstvo (9): 26, 1981. Tr 83/502. CIDA.
- Spartaru, C.L; Ilie, O; Crainiceanu, E y Padeanu, I. Investigaciones relativas a las características físico-químicas, antimicrobianas y protistocidas de la miel de mielato en comparación con las principales mieles de flores. En. XXV Cong. Int. Apicultura.-- Bucarest: Apimondia, 1975.-- p 532-538.
- Velescu, Gh y Cioca, V. Nuevas investigaciones con respecto a la utilización de los productos apícolas en la cosmética. En. XXIV. Cong. Int. Apicultura.--Bucarest: Apimondia, 1973.-- p 425-427.

Tabla No.1. Resultados encontrados de la determinación de la actividad antibacteriana de las mieles estudiadas.

Microorganismos	X (mm)	% de efectividad	CMI (%)
<i>Escherichia coli</i>	37.6	100	25
<i>Proteus mirabilis</i>	35.2	100	25
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	32.8	94.4	25
<i>Staphylococcus aureus</i>	32.46	100	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10.46	44.4	100
<i>Bacillus megaterium</i>	10.07	38.8	50
<i>Bacillus subtilis</i>	9.37	55.5	100
<i>Serratia marcescens</i>	6.6	11.11	100

Leyenda:

X- media aritmética de los halos de inhibición expresados en mm.

% de efectividad de las mieles frente a los microorganismos.

CMI- Concentración Mínima Inhibitoria.