

---

## PODER ANTIBACTERIAL DE MIELES DE *Tetragonisca angustula*, VALORADA POR CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

### Antibacterial Power Of Honeys From *Tetragonisca angustula* Assessed By Minimum Inhibitory Concentration

M. VIVIANA GAMBOA ABRIL<sup>1</sup>, Estudiante; JUDITH FIGUEROA RAMÍREZ<sup>2</sup>, Profesora titular.

<sup>1</sup> Grupo de investigación en ciencia y tecnología de productos apícolas (AYNI). Zootecnia, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. mvgamboaa@unal.edu.co

<sup>2</sup> Grupo de investigación en ciencia y tecnología de productos apícolas (AYNI). Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. jfigueroaa@unal.edu.co  
Universidad Nacional de Colombia, Cra. 30 N.º 45-03, Bogotá, Colombia. Teléfono: 316 50 00, exts.: 15317-15318. Fax: 316 54 01.

Presentado 1 de noviembre de 2008, aceptado 1 de febrero de 2009, correcciones 7 de julio de 2009.

#### RESUMEN

Mediante pruebas *in vitro* se determinó la capacidad antibacteriana, de 37 mieles de la especie *Tetragonisca angustula* de siete regiones de Colombia, con la técnica de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a tres especies de bacterias Gram positivas y tres Gram negativas. La técnica CMI se evaluó en microdiluciones (v/v) al 90%, 45%, 22,5%, 12,3%, 5,6% de miel, contra las cepas Gram negativas *Salmonella enterica* sp. *enterica* serovar *Typhimurium*, ATCC 14028; *Escherichia coli*, ATCC 31617 y *Klebsiella pneumoniae* sp. *pneumoniae*, ATCC 700603 y Gram positivas *Bacillus subtilis* sp. *spizizenii*, ATCC 6633; *Staphylococcus aureus* sp. *aureus* Rosenbach, ATCC 6538 y *Micrococcus luteus* *Kocuria rhizophila*, ATCC 9341. Las muestras de miel correspondieron a los departamentos de Antioquia, Cauca, Cundinamarca, Magdalena, Santander, Tolima y Valle del Cauca. Las mieles analizadas por prueba binomial presentaron efecto bactericida contra todas las cepas bacterianas del ensayo con mayor efectividad para *E. coli*, *M. luteus* y *S. enterica*, con una probabilidad de  $p(x)=1$  a una dilución de 90%; al ser diluidas el mayor efecto se evidenció frente a *M. luteus* donde aún en dilución 5,6% presentaban probabilidades de  $p(x)=0,62$  de actividad inhibitoria por parte de las mieles. En dilución de miel al 90%, el efecto fue solo cercano a  $p(x)=0,5$  para *K. pneumoniae*, *B. subtilis* y *S. aureus*. La región de Antioquia, la cual hace parte de las mieles con mayor número de muestras dentro del ensayo, exhibe la mayor acción bactericida.

**Palabras clave:** miel, *Tetragonisca angustula*, CMI.

## ABSTRACT

The *in vitro* antibacterial capacity was determined for 37 honeys of *Tetragonisca angustula* from seven regions of Colombia, by minimum inhibitory concentration (CMI) against three positive Gram bacteria and three negative Gram bacteria. The CMI technique was evaluated by microdilutions (v/v) to 90%, 45%, 22.5%, 12.3%, 5.6% of honey against the negative Gram bacteria, *Salmonella enterica* sp. enteric serovar *Typhimurium*, ATCC 1402; *Escherichia coli*, 31617 ATCC and *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, ATCC 700603 and to positive Gram bacteria, *Bacillus subtilis* sp. *spizizenii*, ATCC 6633; *Staphylococcus aureus* sp. *aureus* Rosenbach, 6538 ATCC and *Micrococcus luteus* *Kocuria rhizophila*, ATCC 9341. The honey samples corresponded to Colombia regions: Antioquia, Cauca, Cundinamarca, Magdalena, Santander, Tolima and Valle del Cauca. The honeys analyzed by binomial test showed bactericidal effect against the tested bacteria; the greater effectiveness was detected in *E. coli*, *M. luteus* and *S. enterica*, with probability or  $p(x)=1$  in a 90% dilution; for followed up dilutions, the effect was still demonstrated against *M. luteus* in a 5.6% dilution with an inhibition activity from honeys at  $p(x)=0.62$ . In a 90% dilution, the effect was only closed to  $p(x)=0.5$ , for *K. pneumoniae*, *B. subtilis* and *S. aureus*. The region of Antioquia, exhibits honeys with superior bactericidal action between the sampling areas.

**Key words:** honey, *Tetragonisca angustula*, CMI.

## INTRODUCCIÓN

La especie *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1825), reconocida comúnmente como angelita, posee una de las mieles de abejas sin aguijón con atractivo comercial, en parte por sus propiedades medicinales atribuidas por su uso tradicional y sobre las cuales se han reportado estudios tanto *in vivo* como *in vitro* de su efecto antimicrobial (Gamboa *et al.*, 2008). En Colombia se ha resaltado el poder antimicrobial de la miel de abeja angelita por encima de mieles de abejas de la especie *Apis mellifera* (Apidae) en evaluaciones realizadas para departamento del Huila (Noval *et al.*, 2006). Como es bien conocido, tanto la flora como las condiciones ambientales de una zona o región determinada, afectan la composición de las mieles y así mismo se determina un comportamiento antimicrobial (Garedew *et al.*, 2004; Estrada *et al.*, 2005); debido a esto es de gran interés conocer el poder antimicrobial de estas mieles que son ampliamente utilizadas en el país, para combatir enfermedades oculares. El presente estudio evalúa *in vitro* el poder bactericida para gérmenes Gram positivos y Gram negativos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el 2007 y parte del 2008 se realizó la recolección de 37 muestras de miel de la especie *Tetragonisca angustula* (Latreille, 1825) en siete regiones de Colombia (Tabla 1). Las muestras fueron recolectadas por meliponicultores de colmenas de *Tetragonisca angustula* en frascos estériles con instrumentos para la extracción de miel como jeringas igualmente estériles, suministrados por integrantes de los grupos de estudio e investi-

gación del laboratorio de abejas de la Universidad Nacional de Colombia (LABUN) y de ciencia y tecnología apícola (AINY); grupos financiados por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural en el programa de estrategias para establecer la denominación de origen Colombia. Así mismo los respectivos grupos transportaron las muestras en refrigeración con el fin de no alterar la calidad del producto hasta el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, donde se evaluaron y se almacenaron las muestras en refrigerador a 4 °C.

Número de muestras	Origen (Departamento)
5	Antioquia
3	Cauca
2	Cundinamarca
6	Magdalena
12	Santander
3	Tolima
6	Valle
37	TOTAL

Tabla 1. Regiones de muestreo y número de muestras colectadas por región.

La prueba utilizada para analizar las mieles fue la concentración mínima inhibitoria CMI, para lo cual las muestras se llevaron a diluciones de 90%, 45%, 22,5% y 12,3% y 5,6% de miel en caldo Mueller Hinton; estas diluciones fueron dispensadas en microplacas de 96 pozos a volúmenes de 100 microlitros. Las bacterias en prueba correspondieron a las cepas Gram negativas *Salmonella enterica* sp. *enterica* serovar *Typhimurium*, ATCC 14028; *Escherichia coli*, ATCC 31617 y *Klebsiella pneumoniae*, subsp. *pneumoniae*, ATCC 700603 y Gram positivas *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, ATCC 6633; *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach, ATCC 6538 y *Micrococcus luteus* *Kocuria rhizophila*, ATCC 9341. Las bacterias fueron cultivadas en caldo Mueller Hinton por 24 horas y diluidos en solución salina hasta concentración 0,5 MacFarland. Cada microorganismo se adicionó en pozos correspondientes a la microplaca y se incubó a 37 °C por 24 horas. Como soporte de la prueba, en cada corrida de muestras, se utilizó un control de viabilidad de la cepa bacteriana y un segundo control negativo del medio de dilución, Mueller Hinton. Transcurrida la incubación se realizaron subcultivos de cada pozo en agar Mueller Hinton, que fueron incubados a 37 °C por 24 horas, para determinar de ésta forma el crecimiento o la inhibición de las bacterias. El análisis estadístico de distribución binomial permitió establecer probabilidades de éxito (efecto bactericida) y fracaso (crecimiento de bacterias) para el total de muestras de miel.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las dos concentraciones más altas de miel se encuentra la mayor probabilidad de acción bactericida sobre cuatro de las seis bacterias del estudio, mientras que para las últimas dos concentraciones, las probabilidades de mieles con efecto se reducen notablemente. Estas últimas concentraciones son de 11,23% y 5,6% donde *M. luteus* seguida por *Klebsiella* son las más sensibles (Fig. 1).

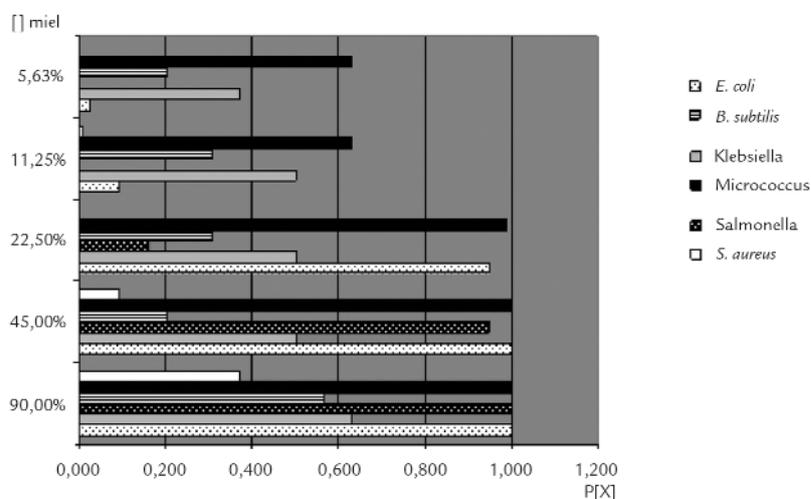


Figura 1. Probabilidades binomiales del efecto bactericida de las mieles de la especie *Tetragonisca angustula*.

Llama la atención el comportamiento de las mieles frente a *K. pneumoniae*, donde a pesar de no mostrar una alta actividad, se mantiene hasta la dilución de 11,25%, mostrando en la dilución más alta una actividad del 37%. Es importante este efecto dada la implicación patológica de *K. pneumoniae* debido a su resistencia natural por presencia de cápsula (Domenico *et al.*, 1994; Rasheed *et al.*, 2000; Sekowska *et al.*, 2002). *M. luteus* mostró ser la cepa más sensible siendo la actividad en ella del 62% de probabilidad a la dilución más alta, vale la pena resaltar que esta cepa ATCC 9341, es un patrón de referencia para la valoración de antibióticos de línea como ampicilina, amoxicilina, eritromicina, lincomicina, penicilina, tilosina, cloranfenicol y tetraciclina (AOAC, 2007; Bajwa, 2007) lo que permite estimar comparativamente el alto poder germicida de las mieles de *T. angustula*. Las mieles del Magdalena con un número de muestras igual a seis tienen un comportamiento bactericida importante contra *Klebsiella*, con la mayor probabilidad para esta bacteria seguida de *B. subtilis* y *M. luteus* y poco significativo para *E. coli* y *S. aureus*. En cuanto a la distribución geográfica, las mieles provenientes del Tolima y Cauca solo presentan actividad importante al 90% y 45% contra *E. coli*, comportándose mejor que las mieles de los demás departamentos. Hay un 100% de efectividad por parte de las mieles para el caso de sitios de origen de Magdalena y Valle hasta diluciones del 22,5% (Fig. 2). El grupo de mieles de Santander con el mayor muestreo (n=12) exhibe su poder antibacterial principalmente sobre *M. luteus* seguida por *Salmonella*, *E. coli* y *Klebsiella*, esta última con probabilidades constantes a lo largo de cada concentración. Para el caso de las mieles del Valle del Cauca, *S. aureus* posee una probabilidad significativamente alta de ser atacada en concentraciones de miel de 90% y 45%; sin embargo las probabilidades de acción bactericida más altas se presentan sobre *M. luteus* y *E. coli* y en menor medida contra *B. subtilis*, *Klebsiella* y *Salmonella* aunque para esta última se encuentra la probabilidad más alta de ser atacada a una concentración del 90% de miel. En el caso de *Klebsiella* se evidencia un efecto sostenido en las diferentes diluciones, con una mayor actividad en mieles de los departamentos de Antioquia, Santander,

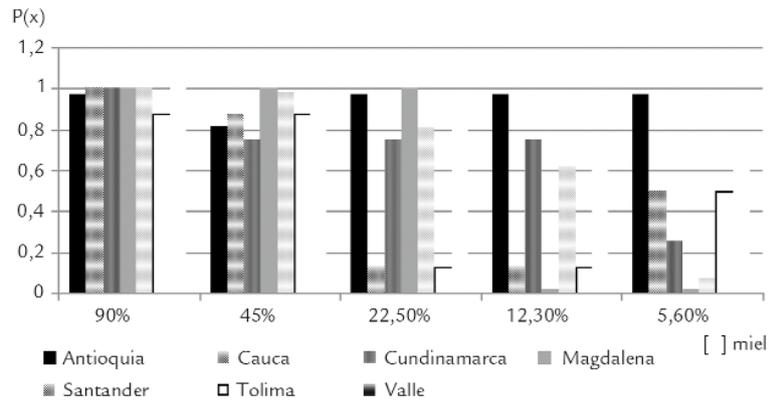


Figura 2. Acción Bactericida de las mieles por departamentos contra *Escherichia coli*.

Magdalena y Cundinamarca respectivamente. Se observan dos extremos gráficos contra *Klebsiella* que diferencian las mieles del Tolima y del Valle de mieles de otros orígenes, que poseen mayores probabilidades de acción bactericida, dentro de las cuales sobresalen las mieles de Antioquia y Magdalena (Fig. 3).

La actividad frente a *S. enterica* decrece al continuar las diluciones para cada miel (Fig. 4). Aunque la tendencia es marcada, las mieles de Antioquia se convierten en excepción al disminuir su efecto a una concentración de 12,3%, que retoma en la siguiente dilución y se pierde para la última concentración. El mejor efecto bactericida lo demostraron las mieles de Antioquia en el momento de evaluar sus muestras en relación a *B. subtilis*, quien es irregularmente atacado por otras mieles (Fig. 5).

Las mieles del Magdalena muestran probabilidades entre  $p(x)=0,6$  y  $0,9$  de acción bactericida al aumentar su concentración. Se presenta una actividad bactericida particular en algunas mieles, como por ejemplo aquellas provenientes del Cauca y Cundinamarca, que al enfrentarlas a *B. subtilis*, exhiben una variación en su forma de

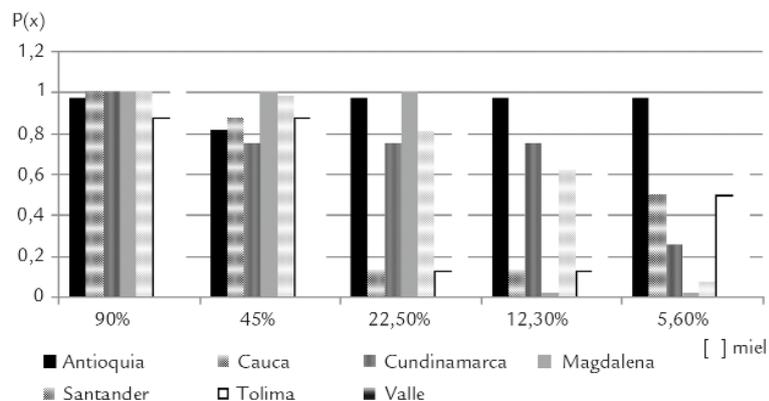


Figura 3. Acción Bactericida de las mieles por departamento contra *Klebsiella pneumoniae*.

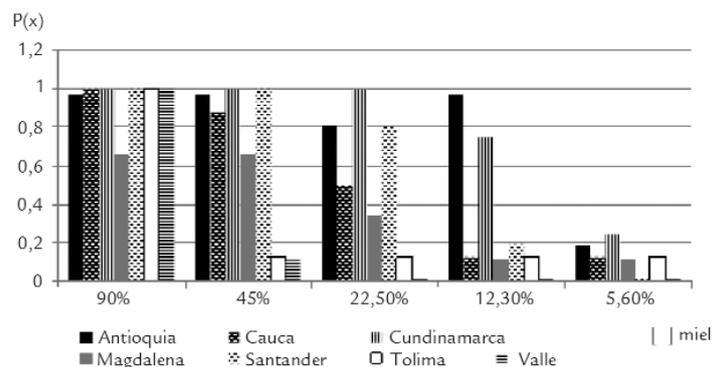


Figura 4. Acción bactericida de las mieles por departamentos contra *Salmonella enterica*.

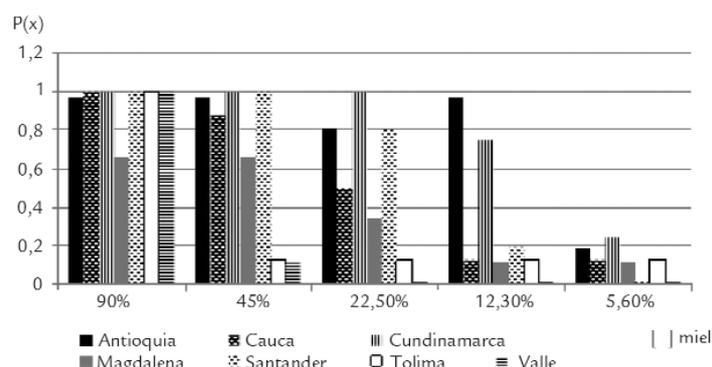


Figura 5. Acción bactericida de las mieles por departamentos contra *Bacillus subtilis*.

activación del poder antimicrobial, ya que para las últimas diluciones se presentan menores probabilidades de acción que en las primeras; lo cual podría indicar que existen componentes dentro de la miel que se activan al diluir su contenido como lo indican estudios de Cruzado *et al.*, 2007 o de Cabrera *et al.*, 2006 para alguno de éstos componentes como peróxido de hidrógeno, señalados para las mieles de *A. mellifera*. Realizando un contraste del caso anterior con la figura 1, donde se tiene el grupo completo de las mieles frente a cada bacteria, es notable la diferencia en la tendencia a la reducción de la actividad bactericida al realizar mayores diluciones, esto va en contra de la posible actividad del peróxido de hidrógeno, el cual tiene mayor actividad en concentraciones más bajas de miel, lo cual puede indicar la actividad de otros componentes que se encuentran más concentrados en las primeras diluciones y pueden ejercer efectos bactericidas.

Las mieles exponen su potencial antibacterial con la bacteria *M. luteus* (Fig. 6) con probabilidades por encima del 80% para la mayoría de mieles en casi todas las concentraciones; aquellas que no se incluirían en este comportamiento serían las mieles del

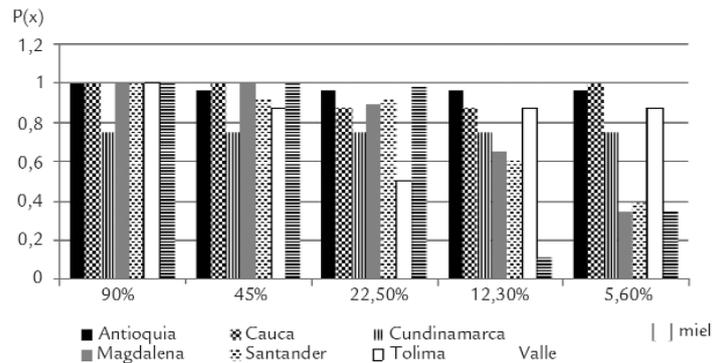


Figura 6. Acción bactericida de las mieles por departamentos contra *Micrococcus luteus*.

Cauca en una concentración del 12,5%; las mieles de Santander, Valle y Magdalena en concentraciones bajas de miel como 5,6% y 12,5%; y las mieles de Cundinamarca con un efecto constante con 0,75 de probabilidad de acción, aunque sus muestras no son representativas con un  $n = 2$ .

La menor actividad de las mieles se observó sobre *S. aureus*, este dato es inverso a lo hallado para mieles de *A. mellifera*, donde el mayor efecto corresponde usualmente a esta bacteria (Cabrera *et al.*, 2006; Noval *et al.*, 2006; Cooper *et al.*, 2002); sin embargo las muestras de miel originarias de Antioquia poseen actividad antimicrobiana con  $p(x)$  de 0,978 en algunas de sus diluciones (Fig. 7). Para mieles del Valle y del Tolima hay un efecto significativo en concentraciones altas, mientras que en mieles de otras regiones no se demuestran estos mismo efectos (Fig. 7).

Dardón y Enriquez, 2008, reportan que la miel de *Tetragonisca angustula* presentó actividad antibacteriana en concentraciones de 5-10%, considerandola como una de las menos efectivas y con menor actividad contra *S. aureus*, dentro del grupo de mieles de abejas sin aguijón analizadas para en el ensayo realizado en Guatemala; lo cual en el presente estudio se asemeja en el hecho de ser la bacteria con menor susceptibilidad a la

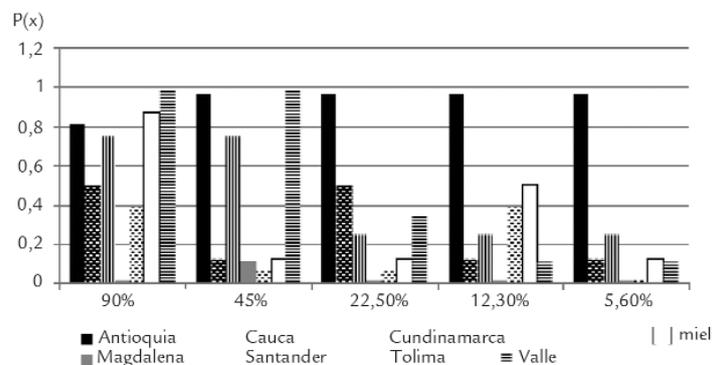


Figura 7. Acción bactericida de las mieles por departamentos contra *Staphylococcus aureus*.

acción bactericida por parte de las mieles de esta especie, sin embargo al revisar los resultados por regiones, sobresale la región de Antioquia en diluciones entre 5,6 y 12,3% con altas probabilidades. En general, las mieles provenientes de la región de Antioquia son eficaces atacando las diferentes bacterias evaluadas y aun cuando su muestreo no es tan representativo como el de Santander, el grupo de cinco muestras de la zona, presenta probabilidades por encima de 0,8 en cualquier concentración frente a todas las cepas bacterianas, exceptuando a *Salmonella* en la concentración más baja, sin embargo su expresión bactericida es distintiva, lo cual puede indicar que la flora y en sí los néctares seleccionados por parte de esta especie de abeja en la zona, además de otras condiciones ambientales, poseen componentes con potencialidad bactericida; entre ellos los azúcares y algunos fitoquímicos. Miorin *et al.*, 2003, al determinar la composición química y la actividad antibacterial de mieles de *T. angustula* y *A. mellifera* de Brasil, indican diferencias de acuerdo a las regiones de origen de las mieles e ilustran los componentes responsables de la separación de las muestras en el análisis estadístico y aún cuando los componentes de la miel de *T. angustula* se encontraron en pocas concentraciones, fue mayor su actividad antibacterial en comparación con mieles de *A. mellifera* y benzoico, así mismo al comparar entre regiones de origen, encontraron diferencias en las concentraciones de componentes como ácido benzoico y vinil-6-acetil-5-hidroxi-cumarano para el grupo de mieles analizadas, encontrando valores de CMI similares de acuerdo a las concentraciones de éstos componentes por región; luego es posible que para las mieles del presente estudio se presenten diferencias en las concentraciones de los componentes de las mieles conforme al lugar de origen, sin embargo estos componentes no han sido determinados aún para las mieles de las respectivas regiones analizadas.

### CONCLUSIONES

Las mieles analizadas por prueba binomial presentaron efecto bactericida contra todas las cepas bacterianas del ensayo, con mayor efectividad para *E. coli*, *M. luteus* y *S. enterica*, con un  $p(x)=1$  a una dilución de 90%; al ser diluidas el mayor efecto se evidenció frente a *M. luteus* donde aún en dilución 5,6% presentaron actividad bactericida con  $p(x)=0,62$ . El efecto fue solo cercano a  $p(x)=0,5$ , para las bacterias *S. aureus*, *B. subtilis* y *K. pneumoniae*. Las bacterias que presentaron la mayor sensibilidad al ser evaluadas contra el conjunto de mieles, fueron *E. coli*, *M. luteus* y *S. enterica*, en tanto *B. subtilis* y *S. aureus* fueron las cepas de mayor resistencia al poder antibacterial de las mieles.

Las mieles del departamento de Antioquia presentan un comportamiento bactericida uniforme con altas probabilidades de acción contra todas las bacterias y bajo cualquier dilución, siendo el muestreo con mejores resultados.

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Nacional de Colombia, al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, a los meliponicultores colombianos. Al Laboratorio de Abejas de la Universidad Nacional de Colombia (LABUN), a sus integrantes y a la dirección. Al laboratorio de microbiología de la facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia y sus integrantes y a la colaboración de Víctor Solarte.

---

## BIBLIOGRAFÍA

AOAC. International Antibiotics in feeds, microbiological methods. Gaithersburg. Official Methods of Analysis 18th Ed Revision 2, 2007. AOAC, Sporicidal Activity of Disinfectants. AOAC Official Method 966.04 Revised 6.3.05, 2002.

BAJWA NS, BANSAL BK, SRIVASTAVA AK, RANJAN R. Pharmacokinetic profile of erythromycin after intramammary administration in lactating dairy cows with specific mastitis. *Vet Res Commun.* 2007;31(5):603-10.

CABRERA L, CÉSPEDES E, NAVA R, OJEDA G. Actividad Antibacteriana No-Peroxido de Mielles Zulianas. *RC Maracaibo.* 2006;16:5.

COOPER RA, MOLAN PC, HARDING KG. The sensitivity to honey of Grampositive cocci of clinical significance isolated from wounds. *J Appl Microbiol.* 2002;93(5):857-863.

CRUZADO R, GUTIÉRREZ C, RUIZ R. Ensayo químico y efecto de antibiosis *in vitro* de la miel de abeja sobre microorganismos Gram positivos y Gram negativos. *Rev Med Vallejana.* 2007;4(2):95-108.

DARDÓN M, ENRÍQUEZ E. Caracterización fisicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (Meliponini) de Guatemala. *INCI.* 2008;33(12):916-922.

DOMENICO P, SALO RJ, CROSS AS, CUNHA BA. Polysaccharide capsulemediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.* 1994;62:4495-4499.

ESTRADA H, GAMBOA M, CHAVES C, ARIAS M. Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*: evaluación de su carga microbiológica. *Alan,* 2005;55(2):167-171.

GAMBOA V, FIGUEROA J, NATES P, CEPEDA M, ROSSO J. Determinación del poder antibacterial de mieles de abejas nativas sin aguijón, a partir de la concentración mínima inhibitoria. *V Congreso Mesoamericano sobre Abejas sin Aguijón.* Mérida, México; 2008.

GAREDEW A, SCHMOLZ E, LAMPRECHT I. 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. *Congrès: Developments in Calorimetry 2003.* Ulm Freiberg Conference No15, Freiberg, ALLEMAGNE (19/03/2003) 2004;415(1-2):157

LATREILLE PA. Familles Naturelles du Règne Animal; exposees succinctement et dans un ordre analytique, avec l'indication de leurs genres. Universidad Complutense de Madrid. J. B. Bailliéere, 1825. Paris. 9 Jul 2008. 570 Pages.

MIORIN PL, LEVY JUNIOR NC, CUSTODIO AR, BRETZ WA, MARCUCCI MC. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol.* 2003;95(5):913-920.

NOVAL D, ORTIZ A, NIVIA M, FIGUEROA J. Determinación del poder antibacteriano de mieles del Huila. *Colegio Mayor de Cundinamarca, Universidad Nacional de Colombia;* 2006.

RASHEED JK, ANDERSON GJ, YIGIT H, QUEENAN AM, DOMÉNECH-SÁNCHEZ A, et al. Characterization of the extended-spectrum beta-lactamase reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:2382-2388.

SEKOWSKA A, JANICKA G, KŁYSZEJKO C, WOJDA M, WRÓBLEWSKI M, SZYMANKIEWICZ M. Resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains producing and not producing ESBL (extended-spectrum beta-lactamase) type enzymes to selected non-beta-lactam antibiotics. Med Sci Monit. 2002;8(3):BR100-4.