



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**MAESTRÍA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

**Efecto de la temperatura en la actividad inhibitoria de  
diferentes mieles multiflorales del estado de Hidalgo  
sobre bacterias patógenas**

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

PRESENTA:

**ING. ULIN ANTOBELLI BASILIO CORTES**

Director:

Dr. Rafael Germán Campos Montiel.

Asesores:

Dra. Diana Jaqueline Pimentel González.

Dra. Alma Delia Hernández Fuentes.

Dra. Ana Cristina Figueira.



**Tulancingo de Bravo, Hidalgo. Septiembre 2013.**

## **AGRADECIMIENTO**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por el apoyo con la beca de la Maestría en Ciencia de los Alimentos en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo incluida en el Padrón de posgrado del CONACYT.



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Agropecuarias

### COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos

#### Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: **"Efecto de la temperatura en la actividad inhibitoria de diferentes mieles multiflorales del estado de Hidalgo sobre bacterias patógenas, que desarrolla el estudiante I.I.A. Ulín Antobelli Basilio Cortes.**

#### Asistentes:

Dr. Rafael Germán Campos Montiel

Dra. Diana Jaqueline Pimentel González

Dra. Alma Delia Hernández Fuentes

#### A. Revisión de Trabajo de Tesis

#### Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por el estudiante, comunicando al I.I.A. Ulín Antobelli Basilio Cortes, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. El estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

#### B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que la estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

#### ATENTAMENTE

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 20 de Septiembre del 2013.

Dr. Rafael Germán Campos Montiel

Dra. Diana Jaqueline Pimentel González

Dra. Alma Delia Hernández Fuentes

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_



## ÍNDICE GENERAL

### RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO DE TEÓRICO .....	3
2.1. Miel ( <i>Apis mellifera L.</i> ).....	3
2.1.1. Composición de la miel .....	3
2.1.2. Calidad de la miel. ....	3
2.1.3. Propiedades medicinales atribuidas a la miel.....	4
2.1.4. La miel como un coloide .....	4
2.1.5. Localización y producción de miel en México.....	5
2.1.5.1. En el estado de Hidalgo .....	6
2.2. Características fisicoquímicas de la miel ( <i>Apis mellifera L.</i> ). ....	6
2.2.1. Sólidos Totales Solubles (°Brix). ....	7
2.2.2. Humedad .....	7
2.2.3. Actividad de agua ( $a_w$ ).....	8
2.2.4. pH. ....	8
2.2.5. Acidez libre. ....	9
2.2.6. Ceniza. ....	9
2.3. Compuestos bioactivos en la miel. ....	10
2.3.1. La miel como fuente de compuestos bioactivos .....	10
2.3.2. Compuestos fenólicos.....	11
2.3.3. Los compuestos fenólicos con actividad antimicrobiana. ....	12
2.3.3.1. Otros factores a los que se atribuye la actividad antimicrobiana en miel .....	13
2.3.4. Comportamiento antibacteriano en miel.....	14
2.3.5. Comportamiento antifúngico en miel. ....	14
2.3.6. Efecto de agentes antimicrobianos sobre el crecimiento de bacterias.....	15
2.3.6.1. Concentración mínima inhibitoria (CMI).....	15
2.3.6.2. Concentración mínima bactericida (CMB). ....	15
2.3.7. Bacterias patógenas. ....	15
2.3.7.1. <i>Escherichia coli O157:H7</i> . ....	16
2.3.7.2. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	16
2.3.7.3. <i>Salmonella sp</i> .....	17
2.3.7.4. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	18
2.3.7.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	19
2.3.7.6. <i>Bacillus subtilis</i> .....	20
2.4. Efecto de la temperatura sobre compuestos bioactivos .....	21
2.4.1. Efecto de la temperatura sobre fenoles.....	21
3. ANTECEDENTES.....	23
4. HIPÓTESIS .....	31
5. OBJETIVOS.....	32
5.1. Objetivo general.....	32
5.2. Objetivos particulares .....	32
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33

6.1. Localización del experimento. ....	33
6.2. Muestra de miel. ....	33
6.2.1. Cepas. ....	33
6.3. Establecimiento del experimento. ....	34
6.4. Obtención de muestras sometidas a diferentes temperaturas de calentamiento. ....	34
6.5. Variables de estudio. ....	34
6.5.1. Determinación sólidos totales solubles (°Brix).....	34
6.5.2. Determinación de humedad .....	35
6.5.3. Determinación de actividad de agua ( $a_w$ ). ....	35
6.5.4. Determinación de pH .....	36
6.5.5. Determinación de acidez libre .....	36
6.5.6. Determinación de ceniza.....	36
6.5.7. Determinación fenoles totales .....	37
6.5.8. Actividad antibacteriana .....	38
6.5.8.1. Método de microdilución en caldo .....	38
6.6. Análisis de resultados . ....	39
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	40
7.1. Caracterización fisicoquímica de las mieles del estado de Hidalgo.....	40
7.2. Efecto de la temperatura en las propiedades fisicoquímicas de las mieles del estado de Hidalgo. ....	42
7.3. Actividad antibacteriana .....	48
7.4. Efecto de la temperatura sobre mieles multiflorales del estado de Hidalgo en su actividad antibacteriana de diferentes cepas patógenas .....	54
8. CONCLUSIONES. ....	66
9. RECOMENDACIONES .....	67
10. BIBLIOGRAFÍA.....	68
11. ANEXOS.....	84
Anexo I .....	84
Anexo II .....	95

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Recopilación de cinco muestras de miel obtenidas de diferentes zonas del estado de Hidalgo, México.....	33
Tabla 2. Caracterización fisicoquímica de las muestras de miel de diferentes zonas del estado de Hidalgo (Promedio±Desviación estándar).....	40
Tabla 3. Efecto de la temperatura (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C) en el contenido total de fenoles en cada muestra de miel .....	48
Tabla 4. Actividad antibacteriana de diferentes muestras de miel a concentraciones de 55 y 70 y 85% sobre bacterias Gram-Positivas (% de Inhibición).....	50
Tabla 5. Actividad antibacteriana de diferentes muestras de miel a concentraciones de 55 y 70 y 85% sobre bacterias Gram-Negativas (% de Inhibición) .....	53
Tabla 6. Comportamiento en el tipo de curva de respuesta (Lineal o Cuadrático) de mieles sometidas a diferentes temperaturas para su actividad antibacteriana.....	61
Tabla 7. Coeficiente de correlación (r) de la actividad antibacteriana con referente a fenoles totales, pH, acidez libre, sólidos solubles totales, humedad, actividad de agua de diferentes mieles sobre bacterias Gram-Positivas .....	63
Tabla 8. Coeficiente de correlación (r) de la actividad antibacteriana con referente a fenoles totales, pH, acidez libre, sólidos solubles totales, humedad, actividad de agua de diferentes mieles sobre bacterias Gram-Negativas .....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fenol.....	11
Figura 2. Comportamiento de sólidos totales solubles (°Brix), de diferentes mieles de distinto origen geográfico a las siguientes temperaturas (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C)....	42
Figura 3. Comportamiento de humedad, de diferentes mieles de distinto origen geográfico a las siguientes temperaturas (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C) .....	43
Figura 4. Comportamiento de actividad de agua, de diferentes mieles de distinto origen geográfico a las siguientes temperaturas (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C).....	44
Figura 5. Comportamiento de pH, de diferentes mieles de distinto origen geográfico a las siguientes temperaturas (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C).....	45
Figura 6. Comportamiento de acidez libre, de diferentes mieles de distinto origen geográfico a las siguientes temperaturas (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C).....	46
Figura 7. Comportamiento de ceniza, de diferentes mieles de distinto origen geográfico a las siguientes temperaturas (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C) .....	47
Figura 8. Inhibición del crecimiento de <i>B. Subtilis</i> por mieles multiflorales del estado de Hidalgo sometidas a diferentes temperaturas (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C)..	55
Figura 9. Inhibición del crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> por mieles multiflorales del estado de Hidalgo sometidas a diferentes temperaturas (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C)...	56
Figura 10. Inhibición del crecimiento de <i>S. aureus</i> por mieles multiflorales del estado de Hidalgo sometidas a diferentes temperaturas (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C). .....	57
Figura 11. Inhibición del crecimiento de <i>Salmonella sp.</i> por mieles multiflorales del estado de Hidalgo sometidas a diferentes temperaturas (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C). .....	58
Figura 12. Inhibición del crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> por mieles multiflorales del estado de Hidalgo sometidas a diferentes temperaturas (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C) .....	59
Figura 13. Inhibición del crecimiento de <i>E. coli</i> por mieles multiflorales del estado de Hidalgo sometidas a diferentes temperaturas (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C) .....	60

## RESUMEN

Se determinó el efecto de la temperatura en la actividad antibacteriana y en las características fisicoquímicas de cinco mieles multiflorales del estado de Hidalgo, la recolecta de las muestras se llevó a cabo en los municipios de Acaxochitlán, Arenal, Huehuetla, Orizatlán y Tasquillo. Todas las mieles fueron sometidas a diferentes temperaturas (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C). Cuantificando los parámetros fisicoquímicos (Sólidos solubles totales, pH, acidez libre, humedad, actividad de agua, ceniza, y contenido total de fenoles) y para la actividad antibacteriana por medio de bioensayos contra bacterias como *Salmonella sp.*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli* por el método de vertido en placa. Se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el comportamiento de las diferentes mieles con respecto a la temperatura en los parámetros fisicoquímicos demostrando tener curvas de respuesta lineal. Mientras en la actividad antibacteriana se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) encontrando diferente comportamiento (lineal o Cuadrático) según la cepa y la miel. En *Salmonella sp.* la curva de respuesta fue lineal en todas las mieles. Para *B. subtilis* y *P. aeruginosa* el comportamiento de las mieles Arenal, Tasquillo y Huehuetla se observó una curva de respuesta lineal, mientras las mieles de Orizatlán y Acaxochitlán su curva de respuesta fue cuadrática. En cuanto a *L. monocytogenes* las mieles de Acaxochitlán, Arenal, Huehuetla y Orizatlán su curva de respuesta fue cuadrática, pero en la miel de Tasquillo fue lineal. En cuestión de *S. aureus* y *E. coli* en todas las mieles se encontró curvas de respuesta cuadráticas. Estos efectos no dependen del Gram de la bacteria. Solo en la bacteria de *Salmonella sp.* se obtuvo una correlación muy buena con respecto a los sólidos solubles totales, pH, acidez libre, humedad, actividad de agua y fenoles totales con la actividad antibacteriana indicando que los compuestos fenólicos presentes en las mieles inhiben el crecimiento de *Salmonella sp.* Estos resultados sugieren que las mieles tienen distintos compuestos antibacterianos que se comportan de forma diferente a la temperatura dependiendo del origen de la miel y la bacteria a inhibir.

## ABSTRACT

Determined the effect of temperature on antibacterial activity and physicochemical characteristics of five multiflorales honeys of the state of Hidalgo, The collection of the samples was carried out in the municipalities of Acaxochitlán, Arenal, Huehuetla and Orizatlán Tasquillo. All honeys were subjected to different temperatures (20, 40, 50, 60, 70 and 80°C). Quantifying physical-chemical parameters (total soluble solids, pH, free acidity, moisture, water activity, ash, and total phenols content) and for the antibacterial activity through bioassays against bacteria such as *Salmonella sp.*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *E. coli* by the method of discharge plate. Significant differences were observed ( $P < 0.05$ ) on the behavior of different honeys with respect to temperature on the physicochemical parameters demonstrating have linear-response curves. While in the antibacterial activity, significant differences were found ( $P < 0.05$ ) finding different behavior (linear or quadratic) depending on the strain and the honey. In *Salmonella sp.* response curve was linear in all honeys. For *B. subtilis* and *P. aeruginosa* honeys behavior Arenal, Tasquillo and Huehuetla was observed a linear response curve, while the honeys of Orizatlán and Acaxochitlán its response curve was quadratic. As for *L. monocytogenes* honeys of Acaxochitlán, Arenal, Huehuetla and Orizatlán its response curve was quadratic, but in Tasquillo honey was linear. Question of *S. aureus* and *E. coli* in all honeys found quadratic response curves. These effects had not relation with the Gram of bacteria. Only in the bacteria *Salmonella sp.* was obtained a very good correlation with respect to total soluble solids, pH, free acidity, humidity, activity of water and total phenols with antibacterial activity indicating that phenolic compounds present in the honeys inhibiting grown of *Salmonella sp.* These results suggest that honey has various antibacterial compounds that behave differently from the temperature depending on the origin of the honey and bacteria to inhibit.

## I. INTRODUCCIÓN

La miel es un alimento natural producido por las abejas (*Apis mellifera L.*) a partir del néctar extraído de una variedad de plantas. Es una solución acuosa de azúcar sobresaturada que también contiene una mezcla compleja de otras sustancias de menores concentraciones (White, 1975). La composición y la calidad de la miel principalmente varían según la zona geográfica y del origen botánico, pero también se ve influida por el procesamiento del medio ambiente, y las condiciones de almacenamiento. Los azúcares son los principales componentes de la miel, que representa alrededor del 95 g/100 g de materia seca. La fructosa y glucosa son los constituyentes principales y disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos están presentes en pequeñas concentraciones en la miel (Kaskoniené, 2010).

El Estado de Hidalgo posee una variedad de ecosistemas enriquecidos con climas y vegetaciones multiflorales propias de cada zona dando mieles con características distintas, por lo que es importante caracterizarlas. La mayoría de las plantas son utilizadas por las abejas para recoger néctar, en consecuencia la miel contiene componentes bioactivos de origen vegetal (Baltrusaityte *et al.*, 2007). La composición, la actividad antioxidante y antimicrobiana de la miel dependen de la fuente floral que utiliza la abeja para recoger el néctar, factores estacionales y climáticos, así como el procesamiento que puede tener un efecto sobre las propiedades de la miel (Al-Mamary *et al.*, 2002).

Un efecto biológico importante de la miel es que tiene actividad antimicrobiana debido a los constituyentes de la miel como ácidos orgánicos, polifenoles, y otras sustancias de menor concentración muestran para contribuir a sus efectos antimicrobianos (Anklam, 1998; Al-Mamary *et al.*, 2002; Azeredo *et al.*, 2003). Los estudios sobre la actividad antimicrobiana de la miel se ha desarrollado por muchos investigadores, en particular contra los patógenos resistentes a los antibióticos (Nzeako y Hamdi, 2000; Kumar *et al.*, 2005) contra las bacterias patógenas involucradas en algunas enfermedades (Mulu *et al.*, 2004; Lusby *et al.*, 2005; Basualdo *et al.*, 2007), contra las bacterias patógenas de los alimentos

(Taormina *et al.*, 2001) y contra bacterias responsables del deterioro de alimentos (World *et al.*, 2004).

Se ha reportado que la miel tiene la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano por las propiedades que esta confiere contra las bacterias patógenas (Taormina *et al.*, 2001), además que las bacterias exhiben sensibilidad a diferentes tipos de miel, tales como *S. aureus* (Estevinho *et al.*, 2008). Por los que se han estudiado algunas bacterias patógenas como *E. coli*, *Salmonella sp.*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, para observar que comportamiento tienen sobre la miel, ya que puede tener la propiedad de inhibir el crecimiento bacteriano en el desarrollo de cada cepa (Taormina *et al.*, 2001; Estevinho *et al.*, 2008).

La miel de abeja (*Apis mellifera L.*), ha sido ampliamente estudiada, en la actualidad con un enfoque más profundizado en lo que es antioxidante y como agente antimicrobiano pero el efecto de la temperatura en estos compuestos bioactivos no se han descrito reportes hasta el momento.

En el presente estudio se investigó el efecto que tiene la temperatura en la actividad antimicrobiana de diferentes mieles recolectadas de distintas zonas del Estado de Hidalgo contra *Salmonella sp.*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

## **2 MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Miel (*Apis mellifera* L.).**

La miel es un sustancia líquida viscosa que es producida por las abejas (*Apis mellifera* L.) a partir del néctar de las flores de una gran variedad de plantas, fisicoquímicamente es un sistema coloidal (Baduí, 2006).

#### **2.1.1 Composición de la miel**

La composición de la miel es variable y depende de la fuente floral utilizada en la recolección del néctar, el clima, las condiciones ambientales, de temporada, manipulación y procesamiento (Anklam, 1998; Al-Mamary *et al.*, 2002; Azevedo *et al.*, 2003).

#### **2.1.2 Calidad de la miel**

La miel es un producto natural que presenta variaciones en su composición y características, las cuales se deben a su origen geográfico (Mateu, 1993), ya que estas varían en gran medida de una región a otra de donde se cosechan.

La calidad de la miel está determinada por sus propiedades sensoriales, físicas y químicas. Sus propiedades físicas y químicas dependen de la fuente de néctar, polen, sabor, y el contenido de humedad (Azeredo *et al.*, 2003). Además en función de la cantidad de glucosa, fructosa y sacarosa que haya dentro del sistema ya que puede ser afectado por adulteración con la agregación de algunos jarabes u otras sustancias (Chen *et al.*, 2008).

La calidad de la miel así como también su composición principalmente varía según la zona geográfica y del origen botánico, pero también se ve influenciada por el procesamiento del medio ambiente, y las condiciones de almacenamiento. Las mieles se definen en función de sus principales características organolépticas, como son color, olor, aroma sabor únicas y su consistencia dependen del lugar donde se cosecha (Mateu, 1993).

### **2.1.3 Propiedades medicinales atribuidas a la miel**

La miel, como casi todos los productos naturales, en función de su origen, tiene una amplia gama de compuestos terapéuticos. En efecto por su el origen floral de la miel que desempeña un papel clave en sus propiedades biológicas (Basualdo *et al.*, 2007). Las características particulares de la miel son debido a la multiplicidad de compuestos que proporcionan del néctar y las propias abejas, que le dan su aroma, sabor y su actividad biológica específica (Tosi *et al.*, 2004). Con estas propiedades de la miel la humanidad la optó como una medicina tradicional, después de haber ganado popularidad entre los egipcios, árabes, griegos y otras civilizaciones. La miel se ha utilizado como medicina desde hace miles de años para el tratamiento de enfermedades respiratorias, infecciones gastrointestinales, quemaduras, heridas infectadas y úlceras (Mulu *et al.*, 2004; Küçük *et al.*, 2007; Basualdo *et al.*, 2007).

### **2.1.4 La miel como un coloide**

Los coloides se caracterizan por estar integrados por dos o más fases: una discontinua o dispersa y otra llamada continua o dispersante. Las partículas de mayor tamaño constituyen la fase dispersa y se encuentran distribuidas entre moléculas de peso molecular bajo en la fase dispersante (Baduí, 2006).

La miel se considera un coloide de tipo Sol ya que este tipo de coloide se caracteriza por tener en la fase dispersa componentes sólidos, mientras que en su fase continua se hallan los componentes líquidos (Baduí, 2006), por lo que las moléculas de mayor peso glucosa 30.3%, fructosa 18.4%, sacarosa 1.3%, otros carbohidratos 12%, minerales 0.169%, proteínas 169mg/100g (White *et al.*, 2005), conformarían la fase Dispersa-Sólida, mientras que el contenido de agua 17.2% (White *et al.*, 2005), representan la fase Continua-Líquida.

### **2.1.5 Localización y producción de miel en México**

En México la producción de miel se considera una de las más importantes exportadoras de este producto por su alta producción y calidad a Europa (SAGARPA, 2010).

En México la miel se produce y consume en gran escala siendo uno de los principales exportadores a nivel mundial, cabe mencionar que el estado de Hidalgo, México es uno de los estados de mayor producción pero con poca información sobre sus propiedades.

Las exportaciones de miel mexicana durante el año 2009 alcanzaron 85.6 millones de dólares, cifra récord en los últimos 10 años, con el que el país se colocó en el tercer lugar en ventas a nivel internacional (SAGARPA, 2010). La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) detalló que en 2010 se exportaron 26,800 toneladas de miel orgánica y convencional a varios países del mundo, como Alemania, Estados Unidos, Reino Unido, Irlanda del Norte, Suiza y Arabia Saudita. Especificó que la producción de miel en 2010 fue de 52,900 toneladas, lo que posicionó a México en el sexto lugar mundial de producción de miel.

Los principales estados productores figuran Yucatán, Campeche, Jalisco, Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Guerrero, Puebla, Quintana Roo y Michoacán. En este sentido, la Coordinación General de Ganadería de la SAGARPA destacó que para 2011 se estima un incremento de entre tres y cinco por ciento en los volúmenes de exportación (SAGARPA, 2010).

En el marco del 18° Congreso Internacional de Actualización Apícola, que se realizó en Mérida, Yucatán, del 25 al 27 de mayo 2010, productores de miel orgánica y convencional reportaron ventas por 76.8 millones de pesos durante una mesa de negocios con comercializadores internacionales. Los productores de ocho estados del país establecieron compromisos comerciales con compradores europeos y estadounidenses; las ventas equivalen a un volumen superior a las

1,460 toneladas de miel. La dependencia federal destacó que el consumo per cápita de miel en México aumentó de 190 gramos, que se tenía en la década de los 90 a 320 gramos en el 2010. Ello, añadió, porque el producto es utilizado como ingrediente para la elaboración de alimentos como cereales, yogur, dulces y panes, así como materia prima para las industrias alimentaria y cosmetológica (SAGARPA, 2010).

#### **2.1.5.1 En el estado de Hidalgo**

El estado de Hidalgo cuenta con 84 municipios se ubica en la región centro-oriental de México. Con las coordenadas: al norte, 21° 24'; al sur, 19° 36' de la latitud norte; al este, 97° 58'; al oeste, 99° 53' de la longitud oeste. Tiene una superficie de 20 846 km<sup>2</sup>, por su tamaño ocupa el lugar 26° en la República Mexicana, representando el 1.1% de la superficie del país. Colinda al norte con los estados de San Luis Potosí y Veracruz, al este con el estado de Puebla, al sur con los estados de Tlaxcala y México y al oeste con el estado de Querétaro. Al estado comúnmente se le divide en 10 regiones geográficas, éstas son, la Huasteca, la Sierra Alta, la Sierra Baja, la Sierra Gorda, la Sierra de Tenango, el Valle de Tulancingo, la Comarca Minera, los Llanos de Apán, la Cuenca de México y el Valle del Mezquital. El estado de Hidalgo es un municipio que en los últimos años ha incrementado su producción de miel figurando la parte norte del estado en la zona de la huasteca hidalguense (SAGARPA, 2010).

#### **2.2 Características fisicoquímicas de la miel (*Apis mellifera L.*)**

La composición de la miel depende de las especies de plantas visitadas por las abejas, el clima del medio ambiente y las condiciones de almacenamiento dando así características físicas y químicas únicas de cada miel (Bertoncelj *et al.*, 2007 y Guler *et al.*, 2007).

### 2.2.1 Sólidos Totales Solubles (°Brix)

Los componentes mayoritarios de la miel, corresponde cerca de la materia seca de 95-99% (Olaitan *et al.*, 2007) la fructosa, esencialmente (38,4%), glucosa (30,3%) y sacarosa (1,3%) (Lurlina *et al.*, 2005). Otros hidratos de carbono constituyen aproximadamente el 12% (Lurlina *et al.*, 2005) e incluyen disacáridos tales como maltosa y isomaltosa, trisacáridos (Anklam, 1998).

Un alto contenido de sacarosa en la miel aparente, puede significar sacarosa que no es completamente dissociado en glucosa y fructosa por la acción de la enzima invertasa, secretada por las abejas (Küçük *et al.*, 2007).

La cantidad de sólidos totales depende del tipo de flora de donde proviene el néctar ya que no todas las especies de plantas no contienen la misma cantidad de azúcares, ya que dependen del suelo y del clima donde éstas se desarrollen. La variación en el contenido de azúcares es por la aportación de las enzimas que segregan las abejas a la hora de transformar el néctar en miel (Gómez, 2004).

### 2.2.2 Humedad

La humedad debe de estar dentro del rango establecido por la norma mexicana de miel (NMX-F-036-1197) la cual expresa un máximo de 20% esto es un indicativo de que la muestra tienen una buena madurez además de que permanecen estables después de su cosecha y almacenamiento (Bogdanov, 1997). En caso contrario si la miel presenta una mayor concentración de humedad mayor a 21% ocasiona daños y no sería de gran utilidad para realizar análisis ya que como consecuencia habría problemas de fermentación, formación de hidroximetilfurfural, (Sancho, 1992), pérdida de la actividad enzimática, cambios organolépticos, oscurecimiento (Gómez, 1996), y crecimiento microbiano en las muestras (Schocken-Iturrino, 1999).

Se han reportado que mieles que se han obtenido en periodos altos de precipitaciones (épocas de lluvias) presentan un mayor contenido de humedad

que las mieles producidas durante épocas de bajas precipitaciones (sequía) (González, 1995).

### **2.2.3 Actividad de Agua ( $a_w$ )**

La actividad de agua regula el crecimiento microbiano, los microorganismos tienen una actividad de agua limitado por debajo de 0.4 en el cual no crecerán (Beuchat *et al.*, 1983).

La actividad de agua de la miel suele ser inferior a 0.6, que es suficiente para inhibir el crecimiento de algunas levaduras osmófilas (Ruegg, 1981). La cristalización de miel, comúnmente llamado granulación, disminuye el soluto (glucosa), la concentración en la fase líquida y por lo tanto aumenta la actividad del agua que puede permitir que las células de levaduras de origen natural se multipliquen, causando la fermentación de la miel (Zamora y Chirifi, 2007).

### **2.2.4 pH**

El promedio del pH de una miel es de 3.5 ácida, está relacionado con el poder amortiguador de las sustancias minerales y el contenido de lactona producido por hidrólisis natural de la glucosa (Chandler *et al.*, 1977 y Harold *et al.*, 1993).

Otra propiedad de los alimentos que determina su susceptibilidad de deterioro es su pH. Aunque pueden existir amplias variaciones entre diferentes microorganismos, la mayoría se clasifica como neutrofilos es decir que pueden crecer a pH entre 5.0-8.0. Sin embargo en los alimentos acidificados los microorganismos pueden crecer por acción de los microorganismos específicamente adaptados deterioradores conocidos como acidófilos, que solo crecen en pH bajo entre 2.0-5.0. Los organismos acidúricos son aquellos que sobreviven a pH bajo de 2.0 (Griffith, 1993). El pH de las mezclas de miel de mielada y la flor se encuentra entre 3.5-4.5. El pH de miel de mielada es entre 4.5-5.5 (Gonnet, 1986). La miel de Suiza, Marruecos provenientes de eucalipto y multiflorales son de 4.4-4.28 y 3.65-3.72 (Bogdanov, 1997; Terrab *et al.*, 2002).

### 2.2.5 Acidez libre

La acidez de la miel es valorada en unidades de reacción química, como cantidad de ácido glucónico por cierta cantidad de la miel que está disponible para reaccionar expresada en meq/Kg de ácido glucónico por kilogramo de miel (Gómez, 1996).

Los ácidos tales como el fórmico, cítrico, láctico, acético, málico y tartárico se encuentran en la miel en la proporción de un 0,3 a un 0,9 % y son los responsables de la acidez de la misma, aunque no todos se hallan en todas las mieles (Gómez, 1986).

Se ha encontrado que el ácido glucónico es el más abundante y procede principalmente de la descomposición de la glucosa, debido a la acción de la enzima glucosa oxidasa presente de manera natural en la miel segregada por las mismas abejas de sus glándulas hipofaríngeas donde la glucosa es catalizada teniendo una oxidación de la  $\beta$ -D-glucosa en D-glucano-1-5-lactona para posteriormente se produzca una hidrolización obteniendo finalmente ácido glucónico como producto final de esta descomposición, esto influye en la concentración de la acidez del sistema (Mato, 1997).

Para cuestión de calidad la acidez demuestra si ha estado en almacenamiento a temperatura no controlada, provocando una fermentación indeseable de la miel cambiando su acidez. La diferencia de valores para la miel de acuerdo con algunos autores, se puede atribuir a la fuente botánica de la miel (Acquarone *et al.*, 2007; Küçük *et al.*, 2007).

### 2.2.6 Ceniza

Los minerales que estén presentes en la miel provienen del suelo donde crece la planta dependiendo de su origen. Se presentan, generalmente, en forma de iones metálicos (cobre, hierro, magnesio, manganeso, selenio, etc.) carbohidratos, fosfatos entre otras. Estos minerales son absorbidos en forma de sus sales disueltas en agua, que pasan de las raíces a la savia de las plantas. De allí son

bombeados a los nectarios, donde se incorporan al néctar. Cada planta tiene una diferente forma de absorber estas sales minerales del suelo y diferente capacidad de transferirlo al néctar (Gómez, 2004).

El contenido de cenizas varia (0,09-0,53%), el límite permitido para mieles florales es de (0,6%) establecido por la norma mexicana de miel (NMX-F-036-1997).

### **2.3 Compuestos bioactivos en la miel**

Se considera compuesto bioactivo de un alimento aquel que aporta un beneficio a la salud más allá de los beneficios nutricionales básicos. Estos compuestos son metabolitos secundarios de las plantas (Gil, 2010). La actividad más conocida y estudiada de los compuestos bioactivos es su capacidad antioxidante y antibacteriana; además, estos compuestos presentan actividad antiinflamatoria y pueden actuar como reguladores de genes implicados en procesos inflamatorios, neurodegenerativos y cancerígenos, entre otros.

Es bien conocido que la biodisponibilidad de los compuestos bioactivos difieren en cuando se ingieren puros y cuando se consumen dentro de su matriz original; en este caso se debe tener en cuenta que un mismo alimento con varios compuestos bioactivos pueden interactuar o ejercer un efecto sinérgico (Gil, 2010).

#### **2.3.1 La miel como fuente de compuestos bioactivos.**

La mayoría de las plantas son utilizadas por las abejas para recoger néctar, en consecuencia los componentes bioactivos de origen vegetal que son transferidos a la miel (Baltrusaityte *et al.*, 2007).

En los últimos años han cobrado especial interés el estudio de la actividad biológica de los polifenoles y en especial la evaluación de la capacidad antioxidante y antibacteriana (Muchuweti *et al.*, 2007).

### 2.3.2 Compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos constituyen una de las familias más numerosas y ampliamente distribuidas en el reino vegetal (Gil, 2010). Las plantas producen una gran variedad de metabolitos secundarios. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo fenol – un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo, Fig. 1 (Taiz *et al.*, 2007), estos han recibido más atención en los últimos años debido a su bioactividad (Naczky y Shahidi, 2004).

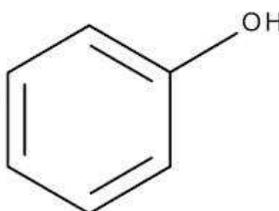


Figura 1. Fenol.

Estas sustancias se clasifican como compuestos fenólicos. Estos compuestos de las plantas forman un grupo químicamente heterogéneo de unos 10,000 compuestos: algunos son solubles sólo en solventes orgánicos, otros son ácidos carboxílicos y glicósidos solubles en agua, mientras que otros son grandes polímeros muy insolubles (Taiz *et al.*, 2007): Muchos tienen papeles en la defensa contra herbívoros o patógenos, otros participan en el soporte mecánico, en la atracción de polinizadores y dispersantes de frutos, en la absorción de la radiación ultravioleta dañina o en la reducción del crecimiento de las plantas competidoras próximas (Taiz *et al.*, 2007). Suelen ser responsables del color, el aroma, y el sabor de los alimentos que los contienen. Entre ellos hay pigmentos que aportan los tonos rojos, azules y violáceos propios de frutas y verduras (Gil, 2010).

La estructura química de los polifenoles es especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante (capturador de radicales libres) y como antimicrobiano (inhibiendo el desarrollo de algunas cepas). Entre ellos podemos mencionar a los flavonoides, isoflavonoides, antocianidinas, ácidos fenólicos y fenoles simples, etc, (Ross *et al.*, 2002).

### **2.3.3 Los compuestos fenólicos con actividad antimicrobiana.**

Varios autores han estudiado la relación entre el contenido de polifenoles y la actividad antimicrobiana, encontrando asociación entre ellos en diferentes extractos de plantas y frutas (Alberto *et al.*, 2006; Albayrak *et al.*, 2010; Sotelo *et al.*, 2010).

El fenol y sus derivados actúan desnaturalizando las proteínas de las células y causando daño a la membrana celular. Estos compuestos pueden ser bactericidas o bacteriostáticos, dependiendo de la concentración a la que se utilicen. Tienen efecto sobre los hongos, las levaduras y las bacterias; las esporas bacterianas y los virus, presentan cierta resistencia a estos compuestos.

El pH del medio afecta la actividad de los compuestos fenólicos y son más efectivos a pH ácido. La presencia de materia orgánica reduce la acción (García, 2005).

Los derivados fenólicos ejercen su actividad antimicrobiana al lesionar las membranas plasmáticas que contienen lípidos, lo que determina la pérdida del contenido celular. Una propiedad útil de los fenólicos como desinfectantes es que permanecen activos en presencia de compuestos inorgánicos, son estables y persisten durante periodos prolongados después de su aplicación (Tiwari *et al.*, 2009).

La miel contiene una variedad de compuestos de ácidos fenólicos y flavonoides que representan una buena fuente de antioxidantes, así como también tiene un efecto antimicrobiano para evitar el desarrollo de algunos microorganismos que estén presentes en la cosecha, manipulación y almacenamiento de la miel que hace que sea un aditivo bueno en la comida y aumenta su uso en la medicina (Al-Mamary *et al.*, 2002; Küçük *et al.*, 2007).

### 2.3.3.1 Otros factores a los que se atribuye la actividad antimicrobiana en miel

La actividad antimicrobiana de la miel se debe principalmente a sus propiedades físicas y químicas. La alta osmolaridad de la miel y la acidez, peróxido de hidrógeno, compuestos volátiles y ácidos orgánicos entre otras, son las sustancias que contribuyen a su actividad antibacteriana (Theunissen *et al.*, 2001; World *et al.*, 2004; Basualdo *et al.*, 2007).

Uno de los factores de importancia como agente antibacteriano de la miel es el peróxido de hidrógeno, que se produce por la oxidación de la glucosa por la enzima glucosa oxidasa que se origina naturalmente de las glándulas hipofaríngeas de las abejas (Olaitan *et al.*, 2007). El pH de una miel es ácida pero si ésta se excede influirá provocando una reacción de la enzima glucosa oxidasa que está presente de forma natural en la miel, segregada por la misma abeja de sus glándulas hipofaríngeas y con la presencia de oxígeno se cataliza ocurriendo una oxidación de  $\beta$ -D-glucosa en peróxido de hidrógeno, esto le da un efecto antimicrobiano en la parte externa del sistema de la miel impidiendo así el desarrollo de algunas esporas que pudiesen estar presentes en la miel a la hora de la cosecha o en su defecto en almacenamiento (Mato *et al.*, 1997).

Sin embargo, la catalasa, también aparece en el polen (Taormina *et al.*, 2001). El nivel de peróxido de hidrógeno en la miel está determinada por los niveles de glucosa oxidasa y catalasa (Weston, 2000). Cuanto más alto sea el nivel de glucosa oxidasa, mayor es el nivel de peróxido y cuanto menor sea el nivel de catalasa, mayor es el nivel de peróxido de hidrógeno. La enzima glucosa oxidasa es virtualmente inactivo en la miel con alta densidad, pero se vuelve activo en miel diluida para producir peróxido de hidrógeno y ácido glucónico a partir de la glucosa, el peróxido de hidrógeno inhibe el crecimiento de algunas bacterias patógenas de alimentos (Al-Mamary *et al.*, 2002; Olaitan *et al.*, 2007; Taormina *et al.*, 2001).

También se encontró que los compuestos fenólicos existentes en la miel tienen la capacidad antioxidante así como también actividad antibacteriana contra cepas patógenas reflejando comportamientos diferentes según la cepa utilizada en el bioensayo. Sin embargo, la producción y el tipo de miel producida por las abejas depende de la flora que existe en cada temporada. Por lo tanto, las flores de donde las abejas recogen el néctar para la producción de miel, pueden contribuir a las diferencias de la actividad antimicrobiana y antioxidante (Nzeako y Hamdi, 2000; Mulu *et al.*, 2004; Basualdo *et al.*, 2007).

#### **2.3.4 Comportamiento antibacteriano en miel**

Las bacterias exhiben sensibilidad a diferentes tipos de miel. Algunos, tales como *Staphylococcus aureus* (Estevinho *et al.*, 2008), *Staphylococcus epidermidis* (Basualdo *et al.*, 2007), *Bacillus stearothermophilus* (World *et al.*, 2004) son extremadamente sensibles, mientras que otros, *Staphylococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (Basualdo *et al.*, 2007), *Bacillus cereus* (Taormina *et al.*, 2001), *Alcaligenes faecalis*, *Lactobacillus acidophilus* (World *et al.*, 2004), *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis* (Küçük *et al.*, 2007) sólo son moderadamente.

En cuanto al crecimiento de *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* (Basualdo *et al.*, 2007) y *Pseudomonas aeruginosa* (Estevinho *et al.*, 2008) parece ser afectada por la miel impidiendo un desarrollo óptimo de estas cepas.

#### **2.3.5 Comportamiento antifúngico en miel**

La información disponible sobre la capacidad de la miel para inhibir el crecimiento de hongos es limitada. Pocos estudios publicados sobre actividad antifúngica por efecto de la miel, frente algunos aislados clínicos de *Candida sp.* (Theunissen *et al.*, 2001; Lusby *et al.*, 2005) y otros (Küçük *et al.*, 2007) en general, se encontró que algunas mieles presentan una actividad significativa contra levaduras de hongos del género *Candida*. Sin embargo, (Lusby *et al.*, 2005) encontraron que *Candida albicans* no fue inhibida por las mieles probadas por Küçük *et al.*, (2007)

señalando que tres mieles estudiadas por Lusby *et al.*, (2005) mostraron una moderada actividad antimicrobiana frente a *Candida albicans* y *Candida tropicalis*.

La capacidad de algunas mieles de efecto antimicrobiano frente a los hongos *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum* y *Penicillium expansum* fue probado por (Weston, 2000) señalando que su crecimiento no fue inhibida por cualquier muestra de miel.

### **2.3.6 Efecto de agentes antimicrobianos sobre el crecimiento de bacterias.**

Pueden diferenciarse dos tipos de efectos al añadir agentes antimicrobianos sobre el cultivo de bacterias que se encuentre en fase exponencial (fase log o de reproducción acelerada).

#### **2.3.6.1 Concentración mínima inhibitoria (CMI).**

El valor utilizado para expresar el resultado de la medición de la actividad antimicrobiana es la concentración mínima inhibitoria. Se define como la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de incubación durante la noche (Andrews, 2001).

#### **2.3.6.2 Concentración mínima bactericida (CMB).**

Su objetivo es determinar la concentración menor de un antimicrobiano, que es capaz de matar una cepa más del 99.9%. Para calcularla se emplean procedimientos en los que bacteria y antimicrobiano se enfrentan en un caldo. Se puede obtener empleando el procedimiento de macrodilución en tubo o microdilución en placa. Lo que se pretende es comprobar qué concentración de antimicrobiano ha matado, no sólo inhibido, el aislado bacteriano estudiado (Amsterdam, 1996).

### **2.3.7 Bacterias patógenas**

La mayoría de las cepas conocidas no son patógenas, pero algunas sin embargo causan infecciones en el hombre que pueden localizarse en el tracto intestinal o

fuera de él (vías urinarias, meninges, sangre, peritoneo, heridas diversas) (Fernández, 2000).

### **2.3.7.1 *Escherichia coli* O157:H7**

*E. coli* O157:H7 es un bacilo Gram negativo es un serotipo del grupo enterohemorrágica forma parte importante de la microbiota intestinal del hombre y de los animales de sangre caliente, sin embargo, algunas cepas han desarrollado capacidad para provocar enfermedad en el hombre, como son las infecciones gastrointestinales. Estas cepas patógenas representan la principal causa de diarrea infantil en el mundo (Caballero, 2008).

Esta bacteria es incapaz de desarrollarse a temperaturas superiores a 42°C, muestra un activo desarrollo entre 37-41°C, con tiempos de generación 0.49 horas a 37°C y 0.64 horas a 42°C en caldo soya tripticasa. Sin embargo, ya resulta muy escaso a 44-45°C (dependiendo en parte del medio de cultivo) y nulo a 10 o a 45.5 °C en 48 horas. El pH mínimo de desarrollo se encuentra entre 4-4.5, el tipo de ácido usado para ajustar el pH influye en la respuesta.

La importancia de esta bacteria a la salud humana sobresale por su baja dosis infectante, su efecto en todos los grupos etareos de la población, la severidad del padecimiento que origina, la tolerancia a condiciones de acidez poco comunes entre los patógenos y su asociación con rumiantes que aportan alimentos de amplio consumo humano (Fernández, 2000).

### **2.3.7.2 *Listeria monocytogenes***

Es un bacilo corto Gram positivo, no esporulado de 1.2 por 0.5 µm, muestra una forma diploformas en V; las células también aparecen aisladas. La apariencia pleomórfica no es excepcional. Es distintivamente móvil en caldos incubado a 30°C; pero a 37°C se atrofian los flagelos, y queda visible uno solo. Las colonias rugosas suelen contener células de 6-20 µm. Es una bacteria omnipresente y común en el medioambiente. El pH óptimo para su desarrollo es de 7, con límites

de 4.5 a 8, con temperaturas de 37°C. Alimentos frecuentes de su desarrollo es la leche cruda, verduras, carnes crudas. (Fernández, 2000).

El desarrollo de *L. monocytogenes* a niveles suficientes para provocar infecciones en personas hipersensibles, no se acompaña de signos de deterioro del alimento implicado. En el almacenamiento de los alimentos perecederos la temperatura es crítica para controlar su actividad. El cambio de 4 a 8°C puede ser decisivo para que se alcance niveles considerados de alto riesgo, por ejemplo, se observó que en un postre lácteo la presencia de una célula sobre gramo puede llegar teóricamente a 100 células sobre gramo después de 5 días a 8°C, pero requiere de dos semanas si la temperatura desciende a 4°C. Esta diferencia en tiempo resulta considerable y altamente significativa en el comercio y servicio de los alimentos (Rosso *et al.*, 1996).

La incidencia de infección es sin embargo baja si la infección resultará solo de un individuo susceptible cuando este es expuesto a una dosis alta suficiente de una cepa virulenta. Los síntomas de la enfermedad, la cual es más probable de desarrollar en mujeres embarazadas, niños o ancianos y los inmunocomprometidos, puede variar desde una enfermedad leve, gripe como enfermedad de la meningitis (Rosso *et al.*, 1996).

### **2.3.7.3 *Salmonella sp.***

Es un bacilo Gram negativo de la familia *Enterobacteriaceae*. Generalmente son móviles, aerobios o facultativos anaerobios con una rica composición antigénica que se emplea como base para la identificación de sus miembros en serotipos, más recientemente designados como serovares. Es una bacteria primariamente parásita del intestino de los animales, incluido el hombre (hábitat natural). Se libera al medioambiente cuando se le expulsa por las heces, su desarrollo óptimo se encuentra a una temperatura de 37°C con un pH de 6.5-7.5. Muestra cierta capacidad de sobrevivencia en los materiales que contacta y bajo condiciones favorables, también para multiplicarse en ellos; los alimentos son su excepción. Así, una diversidad de localidades se convierten en reservorio extra intestinal del

microorganismo y por tanto en una fuente de contaminación a los alimentos (Fernández, 2000).

Los alimentos como vehículo de *Salmonella* tiene importancia especial en los brotes de salmonelosis humana y animal puede jugar un papel meramente pasivo, o constituir un substrato en el cual hay actividad el patógeno previo al consumo. Esta última situación eventualmente conduce a incidentes más serios, en forma de brotes o en individuos aislados. Los alimentos de origen animal encabezan marcadamente los vehículos implicados en los brotes en alimentos crudos y procesados (Fernández, 2000).

Los factores de virulencia o atributos de patogenicidad de *Salmonella* incluyen: la habilidad para invadir células, poseer una cubierta completa de lipolisacárido, capacidad para replicarse intracelularmente y posibilidad de producción de toxinas. Se conocen 3 formas clínicas de salmonelosis en el humano: gastroenteritis (causada por *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, etc.), fiebre entérica (causada por *S. typhi* y *S. paratyphi*) y una enfermedad invasiva sistémica (ocasionada por *S. choleraesuis*). Las complicaciones menos comunes pero más graves pueden ser artritis y pericarditis, puede producir también un cuadro grave, con meningitis, aborto y hasta la muerte (Caballero, 2008).

#### **2.3.7.4 *Staphylococcus aureus***

Es una célula esférica Gram positiva de 0.8 a 1.2  $\mu\text{m}$  de diámetro, no esporulado y no es móvil. Produce catalasa y otras enzimas algunas relacionadas con la patogenicidad; tienen utilidad para su identificación en el laboratorio o sugieren un potencial enterotoxigenico: lipasa, fibrinolisisina, hemolisina, gelatinasa, coagulasa, fosfatasa, etc. La producción de penicilinas se asocia como un mecanismo de resistencia a la penicilina. La síntesis de estas enzimas no es extensiva para todas las cepas de *S. aureus*.

Una revisión de la ecología de esta bacteria pone de manifiesto las amplias oportunidades con las que puede llegar a los alimentos, se aísla con frecuencia en

la piel y algunas mucosas del hombre y animales. La temperatura para el desarrollo de *Staphylococcus aureus* óptima para su desarrollo se encuentra a 37°C, a un pH 6-7. Posee una notable capacidad para proliferar en diversos alimentos. Bajo condiciones propicias la tasa de crecimiento conduce a la concentración de suficiente entero toxina para provocar brotes de gastroenteritis severos. Notable diversidad de alimentos pueden ser vehículo de la intoxicación por este microorganismo. A parte de la exposición a la contaminación (generalmente humana), o el empleo de una materia prima o ingrediente (típica, aunque no exclusivamente de origen animal) contaminado, deben satisfacerse condiciones ecológicas en el alimento que favorezcan un crecimiento franco del germen, incluida una temperatura superior a las 20-25°C, por pocas horas. Los alimentos que se identifican con mayor frecuencia en los brotes de intoxicación, consisten en jamón, pasteles rellenos, alimentos cocinados a base de pollo, pavo, res y diversas ensaladas (Fernández, 2000).

*S. aureus* es un patógeno potencial para el hombre y animales que se manifiesta de diversas formas. Dentro de su ciclo natural existe como parásito intrascendente en diversas localidades del cuerpo humano; o puede dar lugar a procesos patológicos que van desde infecciones muy localizadas del tipo de un forúnculo autolimitado o sinusitis, otitis, y muchos otros, hasta septicemia y endocarditis con letalidad de 40-80% y síndrome de shock tóxico (Caballero, 2008).

#### **2.3.7.5 *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* y es un bacilo Gram negativo aerobio con un flagelo polar. Cuando se cultiva en medios adecuados produce piocianina, un pigmento azulado no fluorescente. Muchas cepas producen también el pigmento verde fluorescente. *Pseudomonas aeruginosa*, al igual que otras *Pseudomonas* fluorescentes, produce catalasa y oxidasa, así como amoníaco a partir de la arginina, y puede utilizar citrato como única fuente de carbono. Su pH debe ser arriba de 4 para su crecimiento y a una temperatura de 36-41°C para su desarrollo, sus requerimientos nutrimentales son

mínimos. Esta bacteria constituye un ejemplo clásico de patógeno oportunista. Se le cita en epidemias severas de diarrea en lactantes y enfermos hospitalizados e inmunocomprometidos, provocando padecimientos serios como endocarditis, neumonía, entre otras. Es muy común su presencia en el medioambiente: agua, tierra, polvo. Con facilidad se recupera de verduras como jitomates, rábanos, apio, pepinos, cebollas y lechuga. Este hecho induce a restringir el consumo de verduras crudas por individuos especialmente hipersensibles (Fernández, 2000).

Esta bacteria es susceptible a la desecación. Sobrevive muchos meses en el agua y puede utilizar CO<sub>2</sub> como fuente de carbono; se multiplica en depósitos con agua destilada. El agua contaminada podría ser una fuente más significativa que los alimentos, especialmente entre los lactantes (Fernández, 2000).

#### **2.3.7.6 *Bacillus subtilis***

Es una bacteria Gram positiva, con forma de varilla que secreta numerosas enzimas para degradar una variedad de sustancias durante su metabolismo es un aerobio facultativo comúnmente encontrado en el suelo. Miembro del género *Bacillus*, *B. subtilis* tiene la habilidad para formar una resistente endospora protectora, permitiendo al organismo tolerar condiciones ambientales extremas.

Proviene de la familia *bacillaceae*, aerobio y anaerobio facultativo esporulado las esporas son centrales, forma elipsoide y al formarse en el interior de la célula dan lugar al hinchamiento de esta, se desarrolla de 10-48°C pero su temperatura óptima se encuentra entre 28-35°C, generalmente son móviles con flagelos peritricos, su pH varia para su crecimiento que va de 4.9-9.3 y puede crecer a partir de una actividad de agua de 0.93-0.95. *B. subtilis* no es considerado patógeno humano; sin embargo puede contaminar los alimentos, pero raramente causa intoxicación alimenticia. Sus esporas pueden sobrevivir la calefacción extrema que a menudo es usada para cocinar el alimento, y es responsable de causar la fibrosidad en el pan estropeado (Lastras, 2009).

## 2.4 Efecto de la temperatura sobre compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos pueden ser susceptibles a ciertas condiciones y factores provocando que estos se lleguen a oxidar. En caso de la temperatura se ha comprobado que algunos de estos compuestos son termolábiles a ciertas temperaturas mientras que otros son muy sensibles provocando la pérdida de éstos. Sin embargo, es difícil predecir las interacciones inducidas por el calor de los compuestos bioactivos (polifenoles) y las vías de su degradación, ya que no sólo depende de las condiciones de temperatura y del tiempo, sino también de la naturaleza del disolvente (Pinelo *et al.*, 2004). Se mostró un modelo de sistemas individuales y mixtos de compuestos como quercetina, catequina y resveratrol la reacción que tuvo al disolverse con etanol o metanol dio lugar a una mayor actividad antioxidante y se produjo en un tiempo más corto (Pinelo *et al.*, 2005).

La polimerización oxidativa y la formación oxidativa de los grupos hidroxilo se encuentran para ser responsable de las mejoras de la actividad antirradical de los fenoles examinados. Es por eso que incluso pequeños cambios en las propiedades físico-químicas de soluciones en el que se disuelven los compuestos bioactivos (polifenoles) influyen significativamente su solubilidad, comportamiento de precipitación que influyen en sus propiedades bioquímicas y de la actividad biológica (Zanchi *et al.*, 2008; Zanchi *et al.*, 2007).

### 2.4.1 Efecto de la temperatura sobre fenoles

Algunos compuestos polifenólicos pueden proteger a otros de la descomposición inducida por el calor, se mostró un modelo de compuestos polifenólicos mixtos que al tener actividad antioxidante está bien conservado durante la cocción y el procesamiento de alguna materia prima (Murakami *et al.*, 2004).

En relación con esto, es interesante observar que la actividad de los radicales libres de algunas verduras aumentó durante la cocción. Se propuso que este aumento podría ser debido a la producción de más fuentes antioxidantes y / o debido a la supresión de la oxidación de los antioxidantes por la inactivación

térmica de las enzimas oxidativas tales como de polifenol oxidasas y ascorbato (Yamaguchi *et al.*, 2001 y Yamaguchi *et al.*, 2003).

### 3. ANTECEDENTES

En los últimos años la investigación sobre la miel ha sido de realce en cuestión de sus componentes bioactivos ya que ha sido comprobado que la miel tiene un comportamiento diferente y único como agente antimicrobiano sobre diferentes bacterias patógenas a inhibir.

En un trabajo realizado en Argelia por Moussa *et al.* (2012) sobre el efecto de la temperatura y la potencia inhibitoria de la miel de eucalipto en *Candida albicans* además de evaluar los parámetros fisicoquímicos a temperaturas de 40, 60 y 80°C encontrando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre los parámetros fisicoquímicos y la temperatura donde el pH disminuyó teniendo inicialmente 4.24 hasta llegar a un pH de 4.10 a la temperatura de 80°C, mientras que para acidez libre se incrementó teniendo inicialmente una acidez de 33.8 meq ác. glucónico/100kg hasta llegar a una acidez de 38.36 meq ác. glucónico/100kg, mientras que para la humedad fue descendiendo teniendo a temperatura ambiente 15.83% hasta finalmente tener a la última temperatura 15.65%.

En un trabajo realizado por Vaikousi *et al.* (2009) observaron la cinética de pardeamiento no enzimático en los sistemas de miel y miel diluida. El efecto de la actividad de agua (en el rango de 0.54-0.99) en la formación de pigmento marrón en la miel y en sus soluciones diluidas, que difieren en la concentración de solutos reactivos se controló tras el calentamiento a cuatro temperaturas (50, 60, 70 y 80°C). En el proceso isotérmico se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre la temperatura y la actividad de agua, en donde a cada temperatura expuesta la muestra durante un tiempo de 0-120hrs, la actividad de agua va incrementándose.

En lo realizado por Sagrin y Chong, (2012) donde determinaron el efecto de secado de la hoja de plátano *Musa acuminata Colla* a diferentes temperaturas 40, 50, y 60°C durante siete horas con un flujo de aire de 2.0 m/s, encontrando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la actividad de agua y pH con respecto a la temperatura de secado encontrando pérdidas que van de temperatura ambiente

de  $0.996 \pm 0.0026$  hasta la temperatura de  $60^\circ\text{C}$  con un valor de  $0.4157 \pm 0.0446$  de actividad de agua y encontrando que al pasar por las temperaturas (40, 50 y  $60^\circ\text{C}$ ) el pH aumenta con un valor inicial de  $6.51 \pm 0.01$  hasta un valor de pH de  $6.56 \pm 0.001$ .

En un trabajo realizado por Turkmen *et al.* (2006) observaron que el tratamiento térmico aumenta la capacidad antioxidante de la miel, lo que resulta en un efecto positivo en la salud humana como consecuencia de la acción de estos productos de Maillard, y un punto negativo sería el pardeamiento de la miel causada por calentamiento que no es deseable por los consumidores.

Con referente a la actividad antimicrobiana se observó en un trabajo realizado por Silici *et al.* (2010), analizaron cincuenta muestras de mieles multiflorales *Rhododendron* de la región del mar negro Turquía para observar la actividad antimicrobiana mediante bioensayos por el método de dilución en agar, se usaron concentraciones (w/v) de 10, 25, 50 y 75% de las cuales solo las concentraciones de 55 y 75% fueron donde se obtuvo actividad antimicrobiana contra 13 microorganismos donde once son bacterias y dos levaduras que se utilizaron para la prueba: *Aeromonas hydrophila* ATCC 7965, *Bacillus cereus* FMC 19, *Bacillus subtilis* ATCC 6630, *Escherichia coli* O157:H7 RS\_932, *Listeria monocytogenes* 1/2B, *Mycobacterium smegmatis* RUT, *P. mirabilis* BC\_3624, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* NRRLE\_4463, *Staphylococcus aureus* ATCC 28213, *Candida albicans* ATCC 1223, *Saccharomyces cerevisiae* BC 5461, y *Yersinia enterocolitica* ATCC 1501, encontrando diferencias significativas ( $P < 0.01$ ) entre las mieles y la bacteria a inhibir, donde la mayor actividad antimicrobiana se dio contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis*, mientras que para *S. aureus*, *A. hydrophila*, *L. monocytogenes*, *B. subtilis*, *M. smegmatis*, y *S. typhimurium* mostraron una moderada sensibilidad a la actividad antimicrobiana, para lo que fue *B. cereus*, *E. coli*, O157:H7 y *Y. enterocolitica* fueron las que obtuvieron mucho más resistencia a la actividad antimicrobiana, existen grandes variaciones en la actividad antimicrobiana dependiendo del origen floral de la muestra de miel.

En otro estudio realizado en Grecia por Voidarou *et al.* (2011) demostraron que las mieles multiflorales (coníferas, cítricos, tomillo o polifloral), mostraron actividad antibacteriana por el método de difusión en agar probando diversas concentraciones (w/v) que van desde 0, 10, 25, 50 y 75%, en dieciséis bacterias, siendo así nueve patógenos y siete cepas de referencia; *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*, resistente a meticilina y a la vancomicina (fuente: la septicemia dental), (2) *S. aureus* subsp. *aureus*, resistente a la meticilina y a la vancomicina (fuente: absceso dental), (3) *S. aureus* subsp. *aureus*, resistente a la meticilina (fuente: mano nosocomial absceso), (4) *S. aureus* subsp. *anaerobius* (fuente: septicémica gingivitis), (5) *Escherichia coli* (fuente: flora fecal de vaca), (6) *Salmonella typhimurium* (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*) (fuente: agua potable), (7) *Streptococcus pyogenes* (fuente: mastitis de las vacas), (8) *Bacillus cereus* (fuente: alimentos), (9) *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (fuente: absceso de mano), (10) *S. aureus* subsp. *aureus* cepa de referencia ATCC 12600, (11) *S. aureus* subsp. *anaerobius* cepa de referencia ATCC 35844, (12) *Escherichia coli* cepa de referencia ATCC 23716, (13) cepa de referencia de *Bacillus cereus* ATCC 14579, (14) de *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* cepa de referencia ATCC 6051, (15), *Streptococcus pyogenes* cepa de referencia ATCC 12344 y (16) *Salmonella typhimurium* (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*) cepa de referencia ATCC 13311, encontrando diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) entre las mieles y las bacterias patógenas junto con las cepas de referencia, siendo la miel de coníferas la de mayor efecto en las bacterias *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. pyogenes*, *B. cereus*, *B. subtilis* y la menor actividad antibacteriana fue con la miel multifloral.

En Galicia España, Escuredo *et al.* (2012) analizaron 23 muestras de miel para ver su actividad antibacteriana por el método de dilución en agar, las muestras de miel fueron diluidas en agua /metanol al 2% (v/v) probándose contra nueve bacterias para los experimentos, cinco Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 20231), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 20044), *Micrococcus luteus* (ATCC 20030), *Enterococcus faecalis* (ATCC 20477), *Bacillus cereus* (ATCC 31) y cuatro

Gram negativas; *Salmonella typhimurium* (ATCC 43971), *Proteus mirabilis* (ATCC 4479), *Escherichia coli* (ATCC 30083), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 50071), encontrando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), en todas las muestras de miel exhibieron capacidad antibacteriana contra los microorganismos ensayados, siendo *P. mirabilis* y *B. cereus* las especies más susceptibles, las bacterias Gram positivas, especialmente *S. aureus* y *S. epidermidis*, fueron los microorganismos más resistentes. Por el origen floral de las mieles y su efecto antibacteriano es tanto para bacterias Gram positivas como negativas.

En un trabajo realizado en siete regiones de Colombia por Gamboa *et al.* (2009) analizaron 37 mieles de una especie de abeja sin aguijón conocida como *Tetragonisca angustula* que produce una miel con altos porcentajes de efecto antimicrobiano. Para ello se realizaron pruebas por el método dilución en agar, frente a seis bacterias. La técnica se evaluó por medio de diluciones (v/v) que van de 5.6, 12.3, 22.5, 45 y 90%, contra seis bacterias, 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, fueron analizadas por una prueba binomial presentando efecto bactericida mayor del 99.9% de inhibición. En el bioensayo con mayor efectividad fue para *E. coli*, *M. Luteus* y *S. entérica* se evidenció esto en la dilución de miel al 90%.

La actividad antimicrobiana de la miel se ha atribuido principalmente a la osmolaridad, acidez, peróxido de hidrógeno, compuestos fenólicos y los compuestos volátiles (Molan, 1992a,b; Weston *et al.*, 2000).

Estos resultados concuerdan con Weston *et al.* (2000) en los cuales atribuye el potencial biológico a la composición fitoquímica de las mieles, en donde las mieles de manuka de Nueva Zelanda se le atribuyó principalmente al ácido cafeico, pinocebrina, crisina y galangina, que se deriven directamente de las fuentes de

miel. El ácido cafeico también se ha indicado como una sustancia antibacteriana de mieles provenientes de coco y gelam de Malasia (Aljadi y Yusoff, 2003). De hecho, los productos naturales se están convirtiendo en el tema de investigación antiinfecciosos y muchos grupos se han aislado e identificado sus estructuras de flavonoides que poseen actividad antifúngica, antiviral y antibacteriana, este es el caso de galangina, pinocembrina y kaempferol (Cushnie y Lamb, 2005). El efecto antimicrobiano de compuestos fenólicos puede ser debido a su capacidad para alterar la permeabilidad de la célula, permitiendo de ese modo la pérdida de macromoléculas desde el interior de la misma (Tiwari *et al.*, 2009).

En cuanto a escritos sobre miel tratada térmicamente para observar su efecto antibacteriano y su contenido de fenoles totales no se han registrado investigaciones de este índole por el momento, pero podemos citar algunos trabajos que van acorde.

En un estudio echo en Malasia por Sagrin y Chong (2013), en donde determinaron el efecto de secado a diferentes temperaturas 40, 50, y 60°C durante siete horas con un flujo de aire de 2.0 m/s de la hoja de plátano *Musa acuminata Colla* encontrando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el total de fenoles con respecto a la temperatura de secado encontrando pérdida de fenoles totales de un 6.656mg ác. gálico/100g $\pm$ 0.338% a 40°C, 3.892 ác. gálico/100g  $\pm$ 0.786% a 50°C y 11.949 ác. gálico/100g  $\pm$ 0.847% a 60°C de una concentración inicial de fenoles totales de 2731.49 ác. gálico/100g  $\pm$ 14.41, la pérdida podría ser el resultado de la unión de compuestos fenólicos a otra componentes de la hoja, como las proteínas, o debido a una alteración química estructural causada por el secado (Qu *et al.*, 2010). Otra razón podría ser que a mayor temperatura de secado, hay un momento en que las enzimas oxidativas tales como polifenol oxidasas ha sido completamente inactivada (Prathapan *et al.*, 2009). En contraste, se observó una reducción a 60°C. Este hallazgo puede ser debido al hecho de que 60°C es una temperatura de secado intolerable para los compuestos fenólicos presentes en la hoja de plátano.

En el trabajo realizado en Chile por Vega-Gálvez *et al.* (2012), se estudió el efecto de la temperatura y la cinética en la velocidad del aire de secado de trozos de manzana (*var. Granny Smith*). Los experimentos se llevaron a cabo a los siguientes tratamientos térmicos 40, 60 y 80°C, a velocidades de aire de 0.5, 1.0 y 1.5 m/s. Los fenoles totales presentes en los trozos de manzana fresca se vieron afectados disminuyendo con la temperatura, encontrando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el contenido de fenoles totales y los tratamientos térmicos, según lo determinado por la deshidratación de manzana de los nueve tratamientos, inicialmente la muestra fresca tenía  $158.28 \pm 0.65$  mg ác. gálico/100 g. Se observó que al aumento en la temperatura de secado causa una degradación de fenoles totales, disminuyó con el aumento temperatura de secado a velocidades de 0.5, 1.0 y 1.5 m/s. Esto es probablemente debido a la alta convección de fuerzas que actúan en la difusión del calor retardante en la interface aire-sólido en las manzanas, los glucósidos de compuestos fenólicos, que se localizan en regiones hidrófilas de células tales como vacuolas y apoplástico, o como otros fenoles solubles en el citoplasma y en el núcleo de la célula (Sakihama *et al.*, 2002), parecen tener una protección escudo de calor por el material de las paredes celulares. La resistencia interna de calor en la difusión es un parámetro importante a considerar cuando la calidad está en juego durante el tratamiento térmico en el proceso de secado de manzanas.

El trabajo realizado en Croacia por Boban *et al.* (2010), observaron la actividad antibacteriana *en vitro* de vino que fue calentado a temperaturas de 75 y 125°C por 45 min contra *Salmonella entérica* serotipo *Enteritidis* y *Escherichia coli* sus efectos se compararon con un vino tinto intacto. Las muestras también se analizaron para determinar su contenido de compuestos fenólicos. Su actividad antibacteriana de las muestras no podría estar relacionada con su contenido de resveratrol un tipo de compuesto fenólico sino que se debe a la presencia de otros compuestos fenólicos presentes en el vino que actúan en la inhibición de bacterias además de la capacidad antioxidante.

Al calentar el vino se incrementó su concentración de compuestos fenólicos, encontrando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las concentraciones de compuestos fenólicos y los tratamientos térmicos, donde inicialmente era una concentración de  $3200 \pm 38.2$  mg ác. gálico/L, pero al pasar por  $75^\circ\text{C}$  se incrementó a  $3390 \pm 42.4$  mg ác gálico/L, mientras que para  $125^\circ\text{C}$  resultó obtener  $5530 \pm 60.6$  mg ác. gálico/L.

En cuestión del efecto antibacteriano se utilizó la técnica dilución en agar para después hacer el conteo por vertido en placa y se reportó por medio del número de colonias que subsistieron, encontrando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre el número de colonias y el vino, a diferentes tiempos de incubación, mostrando actividad bactericida del vino intacto (sin tratamiento térmico) donde la prueba fue bastante fuerte y se produjo en menos de 5 min de incubación, mientras que constituyentes de vinos térmicamente estresado retienen considerable efectividad antibacterial, lo que ocurrió después de 15 min de incubación para ambas bacterias. Es muy difícil, sin embargo, para predecir las interacciones inducidas por el calor en polifenoles y las vías de su degradación, ya que depende no sólo de condiciones de temperatura / tiempo, sino también la naturaleza del solvente. Los compuestos fenólicos del vino se muestran como antibióticos eficaces bajo diferentes condiciones experimentales (Papadopoulou *et al.*, 2005; Radovanovic *et al.*, 2009; Vaquero *et al.*, 2007).

Se propuso que la actividad antibacteriana de los polifenoles puede implicar varios mecanismos de acción tales como inhibición del DNA girasa, la inhibición de la función de la membrana citoplasmática y el metabolismo de energía (Cushnie & Lamb, 2005).

Esto está de acuerdo con el estudio realizado por Murakami *et al.* (2004), que mostraron en el modelo de polifenólico mixto compuestos que la actividad antioxidante está bien conservado durante el cocinado y procesado. También mostraron que algunos compuestos polifenólicos pueden proteger a los demás de la descomposición inducida por el calor.

En un estudio realizado en Brasil por Fujita *et al.* (2013), de la pulpa Camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh) mezclada con maltodextrina a concentraciones de 0, 3 y 6% fueron llevadas a liofilización a temperaturas de 60, 80, 90 y 110°C además de temperatura ambiente, en su contenido de fenoles totales se hallaron diferencias significativas estadísticas ( $P < 0.05$ ) entre las concentraciones de maltodextrina con los fenoles totales teniendo pérdidas significativas del 18% de fenoles por el aumento de la temperatura en el secado, probablemente debido a la disminución proporcional en el tiempo de secado.

Para ver su actividad antimicrobiana por medio de la técnica de difusión en agar contra bacterias se realizaron extractos y se ensayaron frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 y *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, de acuerdo con CLSI (CLSI, 2009). En donde sólo *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 presentó actividad antimicrobiana encontrando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las concentraciones y los diferentes tratamientos térmicos, presentando mayores halos de inhibición a la concentración de 0% de maltodextrina en donde no ha recibido tratamiento térmico, mientras que a la concentración de 3 y 6% en todas las temperaturas se hallaron los menores halos de inhibición. La reducción de la concentración de compuestos fenólicos causada por el secado de la pulpa de camu-camu pudo haber sido el responsable de la pérdida parcial de la actividad inhibitoria. Kil *et al.* (2009), sugirieron que la actividad antimicrobiana del sorgo puede ser debido a la presencia de ácido tánico. Saraiva *et al.* (2012), observó que el extracto de *Caesalpinia pyramidalis* Tull contiene quercetina, catequina, ácido elálgico, flavonoides, proantocianidinas y ácido gálico, también presentó actividad antiestafilocócica. Además, otros compuestos tales como flavona, quercetina, naringenina, y morin kaempferol se muestra para inhibir *S. aureus* (Rauha *et al.*, 2000).

#### **4 HIPÓTESIS**

Las mieles dependen de la zona geográfica, del clima y del origen botánico de donde se extrae el néctar para su producción, mostrando diferencias fisicoquímicas así como también en sus compuestos bioactivos característicos de cada zona, lo que le confieren propiedades únicas a cada miel, por lo que su comportamiento antibacteriano a distintas temperaturas (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C) será diferente en cada miel.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de la temperatura en la actividad antibacteriana de diferentes mieles del Estado de Hidalgo.

### **5.2 Objetivos particulares**

- ❖ Evaluar el efecto de la temperatura en las características fisicoquímicas de las diferentes mieles.
- ❖ Observar el efecto de la temperatura en los compuestos fenólicos de diferentes mieles.
- ❖ Determinar el comportamiento de la actividad de antibacteriana de diferentes mieles tratadas térmicamente.

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Localización del experimento.

El desarrollo experimental de este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Aprovechamiento Agroalimentario Integral del Instituto de Ciencias Agropecuarias (ICAp) y en los Laboratorios de Microbiología y de Postcosecha del Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CICyTA), de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

### 6.2. Muestra de miel

La materia prima se recolectó personalmente para cerciorarse que sea pura para los correspondientes análisis. La miel que se utilizó para los experimentos es de la especie (*Apis mellifera L.*). Para la recolección de las muestras de miel se tomó en cuenta que el estado de Hidalgo posee una gran variedad de ecosistemas (climas y vegetaciones) por lo que nos brinda una gran variedad de mieles con distintas propiedades únicas de cada región de donde se recolecte. Se recolectaron cinco mieles multiflorales del estado de Hidalgo, en Acaxochitlán (AC), Arenal (AR), Huehuetla (HU), Orizatlán (OR) y Tasquillo (TA), como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Recopilación de cinco muestras de miel obtenidas de diferentes zonas del estado de Hidalgo, México.

Muestra	Fecha de Cosecha	Fecha de Recolección	Origen Geográfico Hgo, Méx.	Fuente Floral
OR	Marzo-Abril	30/08/2012	Orizatlán	Cítricos
AC	Abril-Mayo	01/08/2012	Acaxochitlán	Pino y Frutal
AR	Abril-Mayo	31/07/2012	Arenal	Agave, Orquidea, Flores Silvestres
TA	Abril-Mayo	31/07/2012	Tasquillo	Garambullo, Mesquite, Pin, Nogal
HU	Abril-Mayo	04/09/2012	Huehuetla	Cafetal, Cítricos, Frutal

#### 6.2.1. Cepas

Las cepas que se utilizaron para observar la actividad antimicrobiana en los bioensayos fueron: *Salmonella sp.*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. coli*, obtenidas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

campus ICAp Tulancingo de Bravo Hidalgo y de la Universidad Autónoma de Querétaro.

### **6.3. Establecimiento del experimento**

El trabajo experimental consistió en tres etapas: 1. caracterización de cada muestra de miel. 2. Cuantificación de compuestos fenólicos y 3. Realizar bioensayos para ver la capacidad antimicrobiana de estas muestras de miel contra cepas patógenas, en todas estas etapas las mieles fueron sometidas a distintos calentamientos para después estando a temperatura ambiente proceder a realizar los respectivos análisis con excepción de la primer etapa.

### **6.4. Obtención de muestras sometidas a diferentes temperaturas de calentamiento**

Cada muestra de miel fue sometida a diferentes temperaturas de calentamiento (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C) a baño maría. Se colocó muestra de miel en frascos de vidrio con tapa de 250 gr llevados a baño maría con agitación constante por un lapso de tiempo de 10 min con temperatura ya programada previamente, después de pasar el lapso de tiempo se llevaron a temperatura ambiente evitando la luz.

### **6.5 Variables de estudio**

A continuación se detallan las variables de estudio que se realizaron

#### **6.5.1. Determinación sólidos totales solubles (°Brix)**

Los sólidos totales de las muestras de miel se midieron por refractometría con un refractómetro manual Daigger y los resultados se expresaron en °Brix (AOAC, 2000). Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente después de haber pasado por los diferentes tratamientos térmicos (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C) las lecturas se hicieron por triplicado.

### 6.5.2 Determinación de humedad

El porcentaje de humedad de las muestras de miel se determinó siguiendo el método descrito por la (AOAC 925.09, 2005). En un crisol llevado a peso constante se colocaron 5 g de muestra de miel, después se colocó en una estufa hasta llevarlo a peso constante a una temperatura de  $100 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 5.5 h una vez pasado este tiempo se colocó dentro de un desecador para finalmente pesar en una balanza analítica.

Los resultados se expresaron en porcentaje de Humedad todas las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente después de haber pasado por los diferentes tratamientos térmicos (20, 40, 50, 60, 70 y  $80^\circ\text{C}$ ) las determinaciones se hicieron por triplicado. El contenido de humedad se determinó con el siguiente formula.

$$\% \text{ Humedad} = ((A-B) * 100) / C$$

Dónde:

A = Peso del recipiente con la muestra húmeda (g)

B = Peso del recipiente con la muestra seca (g)

C = Peso de la muestra húmeda (g)

### 6.5.3 Determinación de actividad de agua ( $a_w$ )

La actividad de agua de las muestras de miel se midieron con el equipo Aqua Lab Series 3 / 3TE con control de temperatura con una precisión de  $\pm 0.003 a_w$  (AOAC 978.18, 2005). Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente después de haber pasado por los diferentes tratamientos térmicos (20, 40, 50, 60, 70 y  $80^\circ\text{C}$ ) las lecturas se hicieron por triplicado.

#### 6.5.4 Determinación de pH

El pH de las muestras de miel se midió con un potenciómetro digital HANNA, (AOAC 981.12, 2005). Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente después de haber pasado por los diferentes tratamientos térmicos (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C) las lecturas se hicieron por triplicado.

#### 6.5.5 Determinación de acidez libre

La Acidez libre se determinó mediante la (AOAC 942.15, 1990). Diez gramos de miel se disolvieron en 75 ml de agua destilada, después se agregó una solución alcohólica de fenolftaleína (5 gotas) posteriormente una solución se valora con 0,1N de NaOH llevando a titular. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente después de haber pasado por los diferentes tratamientos térmicos (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C) las lecturas se hicieron por triplicado.

Los resultados se expresaron Acidez de miel (miliequivalentes de ácido glucónico por kg de miel).

m: Masa o gramos iniciales de muestra.

v: Volumen en cm<sup>3</sup> de solución estandarizada de NAOH a 0.1 N gastada en titulación.

Acidez Libre= (meq Ác Glucónico/Kg)=  $m \cdot v$

#### 6.5.6 Determinación de ceniza

Para determinar ceniza se siguió el método descrito por la (AOAC 920.26, 2005). Donde se colocaron 5g de la muestra de miel homogenizada en un crisol manteniendo en una estufa hasta un peso constante previamente pesado. Luego se colocó en una mufla a una temperatura de 180°C durante una hora y media una vez pasado este lapso de tiempo se incrementó la temperatura a 280°C dejándola por una hora, una vez logrado esta temperatura se incrementó una vez más llevándola a 380°C dejándola por una hora y finalmente se subió a 520°C

manteniéndola así por tres horas para posteriormente apagar y dejar enfriar a temperatura ambiente para poder pesar. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente después de haber pasado por los diferentes tratamientos térmicos (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C). Se determinó el porcentaje de ceniza de las muestras con la siguiente fórmula. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

$$\% \text{Cenizas} = ((B-A) * 100) / C$$

Dónde:

A = Peso del crisol vacío (g)

B = Peso del crisol con cenizas (g)

C = Peso de la muestra (g)

#### **6.5.7 Determinación de fenoles totales**

El método de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999) se utilizó para determinar el contenido total de fenoles. Cada muestra de miel se pesó (5 g) se diluyó a 50 ml con agua destilada y se filtra a través de Whatman No. 1 de papel. Esta solución (0,5 ml) fue entonces mezclado con 2,5 mL de 0,2 N de Folin-Ciocalteu (Sigma) durante 5 min y 2.75 mL de carbonato de sodio g / L ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) se añadió a continuación. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 2 horas, la absorbancia de la mezcla de reacción medido estaba a 760 nm frente al blanco de metanol (Espectrofotómetro CECIL 2000). El ácido gálico (Sigma) (0-200 mg / L) se utilizó para producir el patrón de calibración la curva. La media de tres lecturas se utilizó y la cantidad total contenido fenólico se expresó en mg de ácido gálico equivalentes / 100 g de miel. Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente después de haber pasado por los diferentes tratamientos térmicos (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C) las lecturas se hicieron por triplicado.

## 6.5.8 Actividad antibacteriana

Para el estudio de la actividad antibacteriana a diferentes temperaturas, primero se halló una concentración que tuviera mayor actividad antibacteriana sobre las cepas, una vez definida se procedió a trabajar con esa concentración en los bioensayos referentes al efecto de la temperatura sobre las muestras de miel.

### 6.5.8.1 Método de microdilución en caldo

La metodología que se siguió fue de acuerdo a Klancnik *et al.* (2010) con algunas modificaciones como se describe a continuación:

La actividad antibacteriana de las diferentes muestras de miel se ensayaron mediante microdiluciones con solución salina fisiológica a concentraciones de 55, 70 y 85% contra seis microorganismos patógenos: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* y *L. monocytogenes* por el método de vertido en placa.

Para la activación de cada microorganismo se utilizó caldo nutritivo y se llevó a incubar a 37°C, para lo que fue *Escherichia coli* se dejó incubar por 5 hrs. En cuanto a *Staphylococcus aureus* se incubó por 9 hrs. en *Salmonella sp* en un tiempo de incubación de 22.5 hrs. mientras que para *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *L. monocytogenes* se dejó en un lapso de tiempo de 24-37hrs. hasta obtener una concentración de  $10^6$ - $10^7$  ufc/mL final. Se prepararon los medios de cultivo específicos con agar eosina y azul de metileno para *Escherichia coli*, para *Staphylococcus aureus* se usó un agar *Staphylococcus aureus*, en cuanto a *Salmonella typhimurium* se ocupó un agar *salmonella* y *shigella*, mientras que *B. subtilis*, *L. monocytogenes* y *P. aeruginosa* se utilizó agar nutritivo todos los agares usados fueron de la marca Bioxon llevándose a cajas petri (6 cm de diámetro), las cajas se dejan solidificar a temperatura ambiente (20°C). Las diluciones se prepararon con una solución salina (0.85%) estéril (control), a concentraciones de 55, 70 y 85% esterilizadas con solución salina después se realizaron las diluciones y se sembró (25µL) para llevar a incubación

por un periodo de 18-24h en posición invertida, para finalmente realizar conteo en placa.

Un vez que se activó cada bacteria hasta obtener una densidad microbiana de aproximadamente,  $10^6$ - $10^7$  ufc/mL en caldo nutritivo, se realizó una dilución 1:10 agregando en un frasco estéril un mililitro de bacteria más nueve mililitros de solución de miel y se agitó durante diez minutos. Después de ese tiempo se hicieron las diluciones microbiológicas necesarias y se inoculó en los respectivos agares para cada bacteria. La incubación se llevó a cabo en una estufa a 37°C en un lapso de tiempo de 18-24 horas. Se probaron concentraciones de solución de miel a 55, 70 y 85%. El control positivo fue una solución salina y como control negativo agua. Las pruebas se realizaron por triplicado.

Al determinar la concentración con la que se obtuvieron los mejores resultados se realizaron los siguientes bioensayos mediante el uso de una dilución de miel con solución salina fisiológica a la concentración del 85%, contra las mismas bacterias patógenas para ver su actividad antibacteriana con las muestras de miel (Silici *et al.*, 2010), pero que esta vez han sido sometidas a diferentes temperaturas de calentamiento (40, 50, 60, 70 y 80°C) a baño maría de forma independiente para su respectivo análisis.

## **6.6 Análisis de resultados**

Se utilizó un diseño factorial, donde los factores son el tipo de miel y la temperatura. Los resultados obtenidos se analizaron por un análisis de varianza (ANOVA). Si se encuentran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) se utilizó la técnica de comparación de medias de Tukey's o las curvas de respuesta por contrastes ortogonales.

## 7 RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 7.1 Caracterización fisicoquímica de las mieles del estado de Hidalgo

Tabla 2  
Caracterización fisicoquímica de las muestras de miel de diferentes zonas del estado de Hidalgo (Promedio  $\pm$  Desviación estándar)

Parámetros	Origen de Muestra				
	OR	AC	AR	TA	HU
°Brix (%)	79.46 $\pm$ 0.1d	80.43 $\pm$ 0.2b	80.03 $\pm$ 0.05c	81.13 $\pm$ 0.05a	79.03 $\pm$ 0.05e
pH	4.25 $\pm$ 0.01b	4.30 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>	4.32 $\pm$ 0.1a	4.26 $\pm$ 0.1b	3.99 $\pm$ 0.1c
aW	0.603 $\pm$ 0.002a	0.562 $\pm$ 0.001c	0.579 $\pm$ 0.1b	0.561 $\pm$ 0.1c	0.564 $\pm$ 0.002c
Humedad (%)	15.99 $\pm$ 0.4a	15.47 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	12.83 $\pm$ 0.8b	12.77 $\pm$ 0.7b	13.48 $\pm$ 0.5b
Ceniza (%)	0.10 $\pm$ 0.01d	0.42 $\pm$ 0.01b	0.11 $\pm$ 0.03d	0.58 $\pm$ 0.02a	0.21 $\pm$ 0.01c
Acidez Libre (meq Ác Glucónico/Kg)	20.0 $\pm$ 1b	29.66 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	18 $\pm$ 1b	20.0 $\pm$ 1b	20.33 $\pm$ 0.5b
Fenoles Totales mg ác gálico/100g miel	43.06 $\pm$ 0.39d	91.74 $\pm$ 0.73b	42.08 $\pm$ 0.17d	154.54 $\pm$ 1.25a	53.86 $\pm$ 0.71c

o OR-Orizatlán, AC-Acaxochitlán, AR-Arenal, TA-Tasquillo, HU-Huehuetla.

o Los tratamientos con diferente letra minúscula tienen diferencias significativas en fila ( $P < 0.05$ ) utilizando la prueba de comparación de medias de Tukey.

En °Brix se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en cuanto a su origen, donde la muestra de Tasquillo, que es proveniente de un clima seco y semiseco con vegetación de cactáceas, nogales y mezquites es la de mayor concentración seguido de la muestra de Acaxochitlán (Tabla 2). Estos resultados son similares a los reportados por Saxena *et al.* (2010) con concentraciones de 76.2-80.4% de sólidos solubles totales.

En humedad se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en cuanto a su origen, en donde la muestra Orizatlán y Acaxochitlán fueron las de mayor porcentaje de humedad (Tabla 2). Estos resultados son similares a los reportados por Gomes *et al.* (2010), con porcentajes de humedad que oscilan desde 15.9-17.2% de diferentes mieles provenientes de clima mediterráneo en Portugal con una vegetación de eucalipto, pinos, echium y cítricos.

En actividad de agua se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en cuanto a su origen, en donde la muestra de Tasquillo, Huehuetla y Acaxochitlán son las de menor actividad de agua (Tabla 2). Estos resultados son similares a los reportados por Gomes *et al.* (2010) y Saxena *et al.* (2010) donde las muestras

proviene de cítricos, pinos, flores silvestres y mieles (comerciales) presentando una actividad de agua que va de  $0.47 \pm 0.001$  hasta  $0.70 \pm 0.004$ .

En pH se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en cuanto a su origen, en donde la muestra Huehuetla es la más ácida, mientras que las menos ácidas fueron de Acaxochitlán y Arenal (Tabla 2). Estos resultados son similares a los reportados Kirsá *et al.* (2011) con pH que oscilan de 3.48-5.12 provenientes de una vegetación de crucíferas (*Cruciferae*), rosacea (*Rosaceae*), trébol blanco y dulce (*Trifolium repens*, *Melilotus officinalis*) y el sauce (*Salix*).

En la acidez libre se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en cuanto a su origen, en donde la muestra de Acaxochitlán es la de mayor concentración (Tabla 2). Estos resultados son similares a los reportados por (Lazarevic' *et al.* (2011) que van desde 11.6-27.2 meq ác glucónico/Kg donde difieren ampliamente por su origen geográfico y botánico monofloral en Serbia.

En ceniza se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en cuanto a su origen, en donde la muestra de Tasquillo es la que contiene mayor porcentaje de ceniza (Tabla 2). El contenido mineral se relaciona con el color de la miel, ya sea oscura o clara (Frías *et al.*, 1994). Miel más oscuras poseen un mayor contenido de minerales y viceversa (NMX-F-036-1997). Estos resultados son similares a los reportados por Ouchemoukh *et al.* (2007) con porcentajes de 0.06-0.54% de cenizas. Las mieles con alta acidez y elevados valores de pH; pueden presentar un elevado contenido de minerales (Lothrop, 1936).

En fenoles totales se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en cuanto a su origen, donde la muestra de Tasquillo es la de mayor concentración de fenoles totales siendo el triple que Orizatlán, Huehuetla y Arenal (Tabla 2). Estos resultados se asimilan a los reportados por Meda *et al.* (2005) donde reportan contenido de fenoles totales de 32.59-113.05 mg ác. gálico/100g., esto a temperatura ambiente de una floración multifloral de Burkina Faso, África.

## 7.2 Efecto de la temperatura en las propiedades fisicoquímicas de las mieles del estado de Hidalgo

Con respecto en mieles tratadas térmicamente (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C) se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en sólidos totales solubles, humedad y actividad de agua entre la muestra de miel y a la temperatura a la que fue sometida. En los sólidos totales solubles (Figura 2) se incrementaron con la temperatura debido a la pérdida de humedad y actividad de agua en todas las muestras de miel.

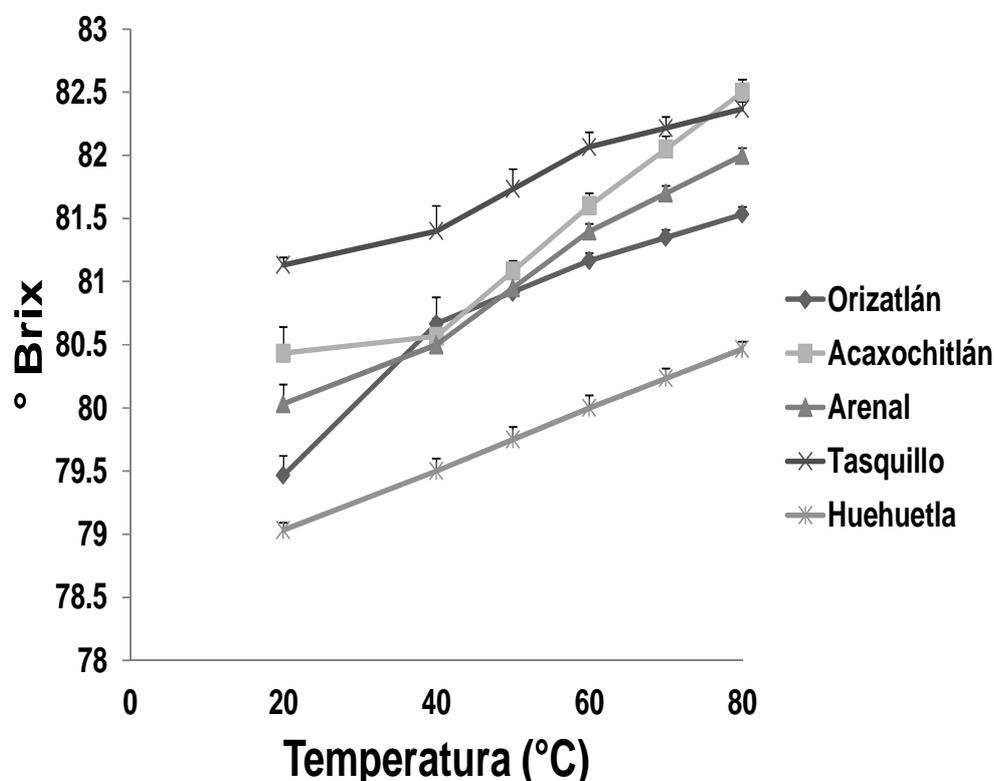


Fig. 2. Comportamiento de Sólidos Totales Solubles (°Brix), de diferentes mieles de distinto origen geográfico a las siguientes temperaturas (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C).

Para humedad (Figura 3) disminuye conforme las mieles fueron tratadas a mayores temperaturas va perdiendo cantidad de agua presente en el sistema, estos resultados son similares a lo reportado por Moussa *et al.* (2012) donde se observa que al incrementar la temperatura va disminuyendo la humedad.

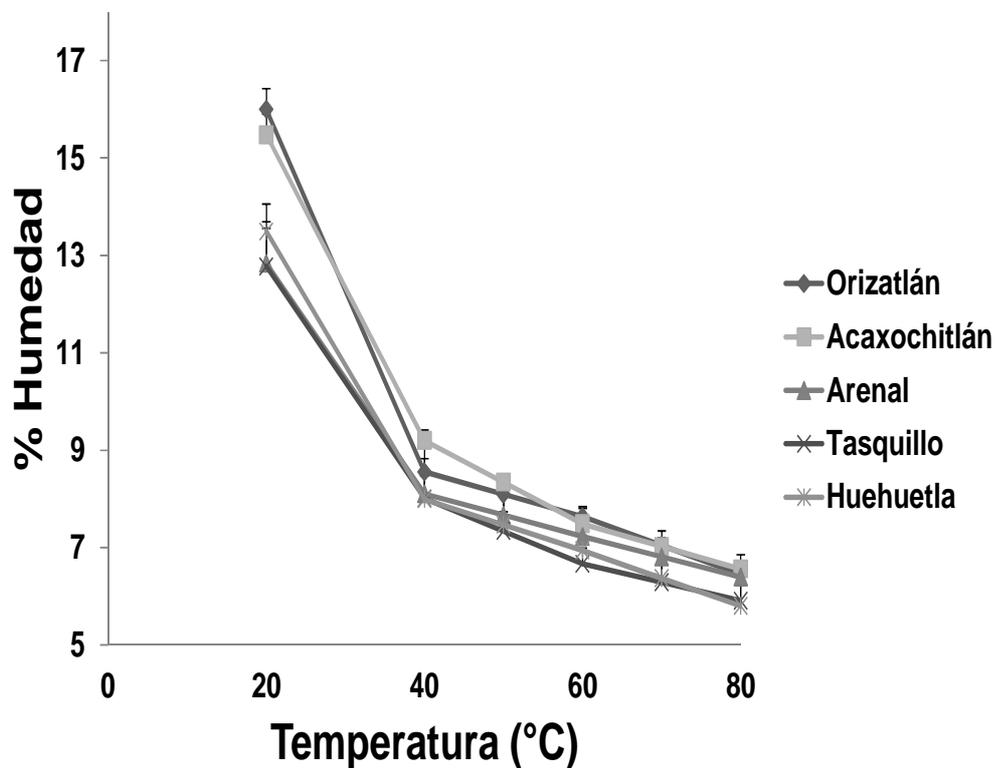


Fig. 3. Comportamiento del % de Humedad, de diferentes mieles de distinto origen geográfico a las siguientes temperaturas (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C).

En cuanto a la actividad de agua (Figura 4) se aprecia cómo va disminuyendo su actividad conforme va incrementándose la temperatura. Los resultados son contrarios con lo reportado por Vaikousi *et al.* (2009) donde ellos observan como la actividad de agua aumenta al ser pasada la muestra por diferentes calentamientos isotérmicos y dinámicos a tiempos prolongados de exposición esto debido al tipo de calentamiento.

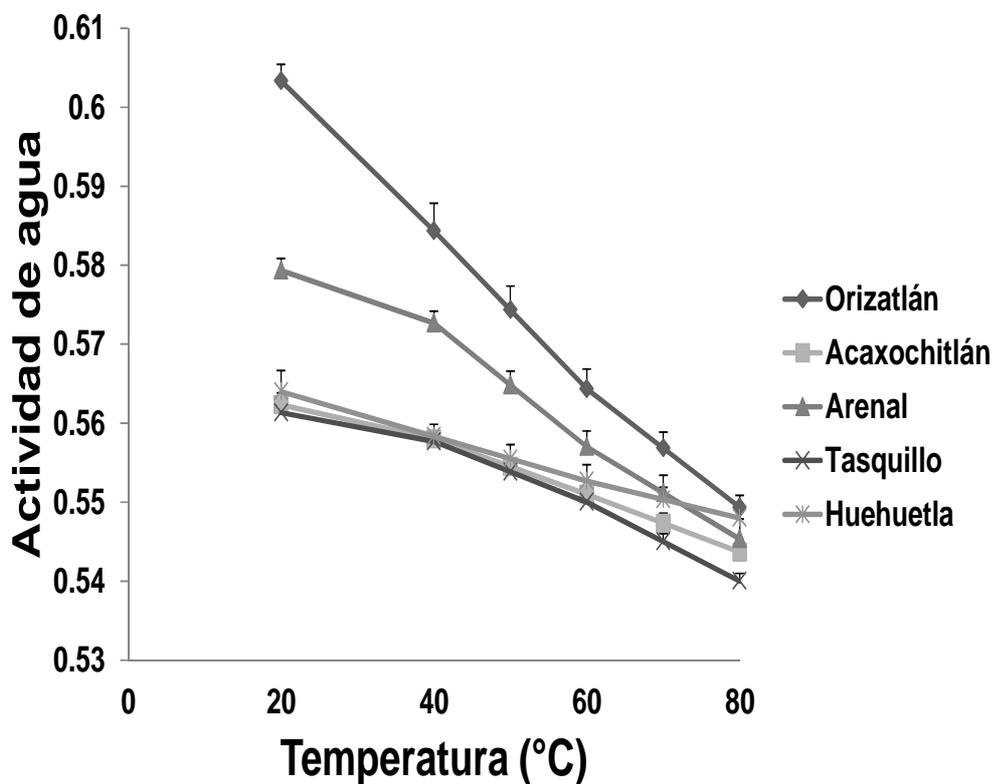


Fig. 4. Comportamiento de la actividad de agua de diferentes mieles de distinto origen geográfico a las siguientes temperaturas (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C).

En los tratamientos térmicos (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C) para pH y acidez libre se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las muestras de miel tratadas térmicamente, como se muestra en la figura 5, donde se observa cómo el pH va disminuyendo conforme pasa cada temperatura debido a que la acidez de la miel va incrementado como se observa en la figura 6 debido a la presencia de materia de ácidos orgánicos, especialmente del ácido glucónico y iones inorgánicos tales como fosfato y cloruro (Nanda *et al.*, 2003).

La alta acidez puede ser indicativa de la fermentación de los azúcares en ácidos orgánicos (Gomes *et al.*, 2010). Los resultados son parecidos a los reportados por

Moussa *et al.* (2012) en donde el pH desciende conforme la temperatura, mientras que para la acidez libre aumenta.

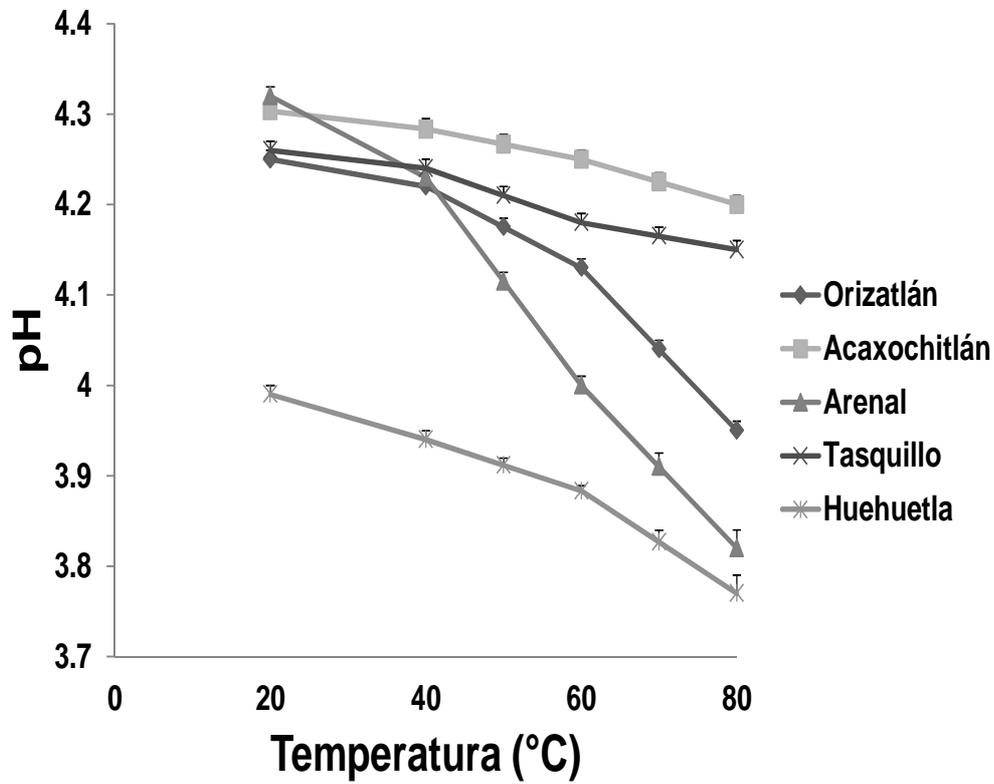


Fig. 5. Comportamiento del pH, de diferentes mieles de distinto origen geográfico a las siguientes temperaturas (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C).

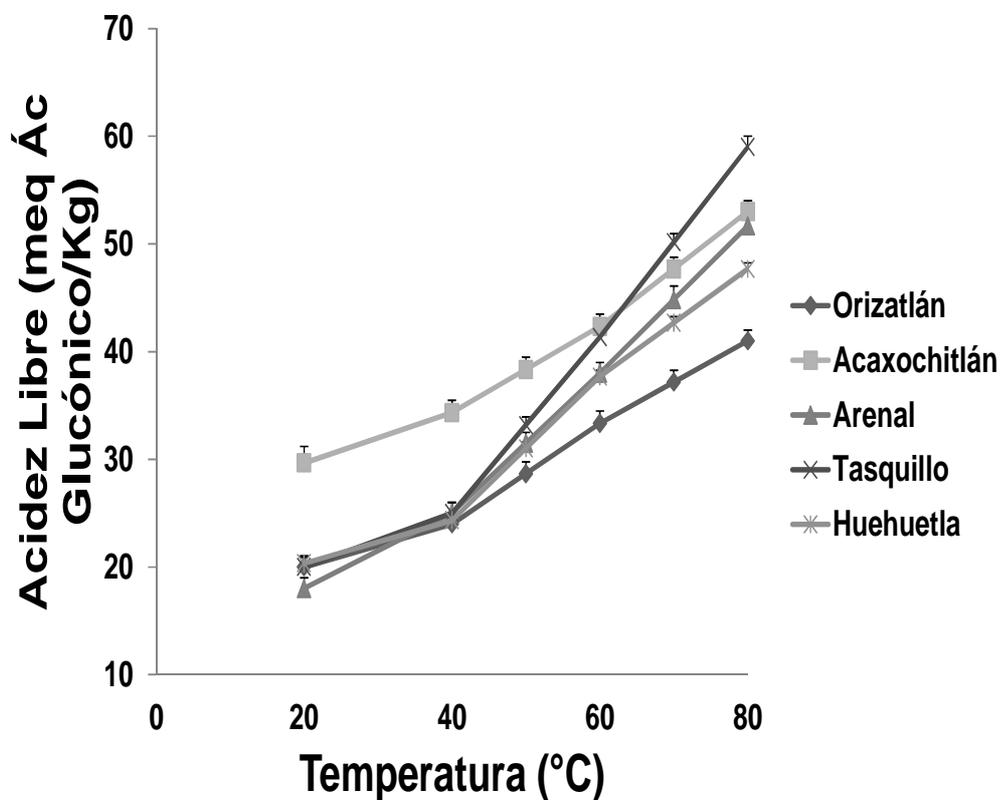


Fig. 6. Comportamiento de acidez libre, de diferentes mieles de distinto origen geográfico a las siguientes temperaturas (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C).

Con referente a los tratamientos térmicos (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C) para ceniza no se hallaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre las muestras de miel tratadas térmicamente como se muestra en la figura 7, no hay efecto a la temperatura a la que se sometieron las muestras.

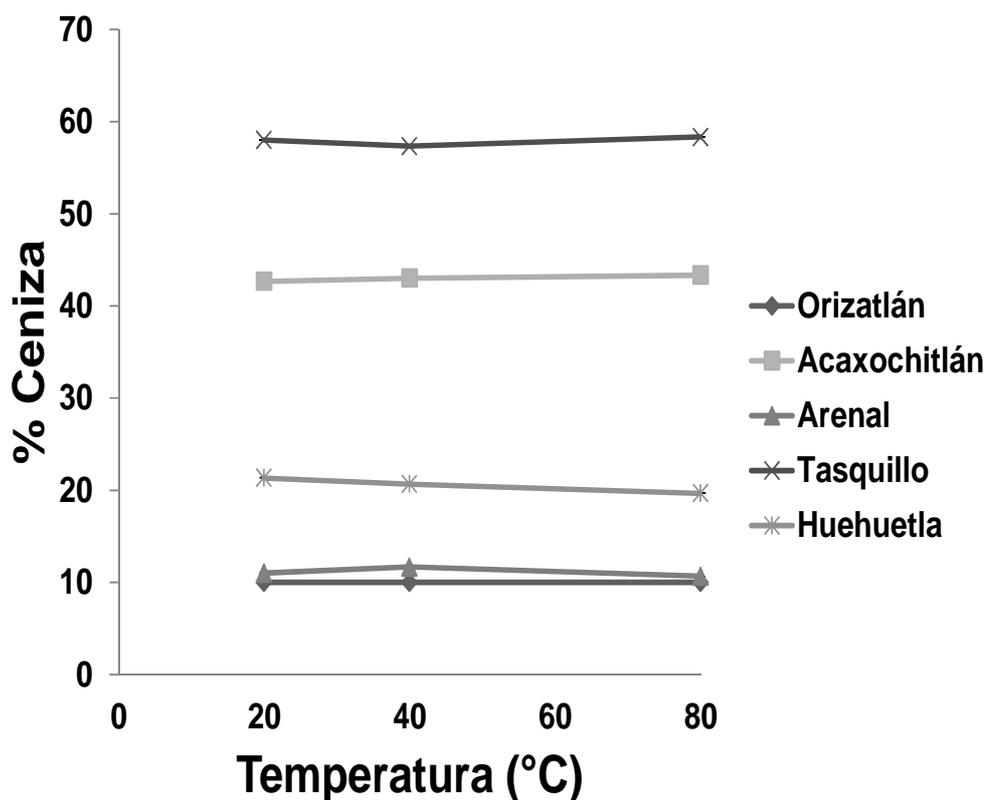


Fig. 7. Comportamiento de cenizas, de diferentes mieles de distinto origen geográfico a las siguientes temperaturas (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C).

En la Tabla 3 se muestra la concentración de fenoles totales encontrado diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre la muestra de miel a 20°C y las temperaturas a las que fueron sometidas, observando que las mieles de Orizatlán, Acaxochitlán, Arenal presentaron una curva de respuesta lineal donde va en incremento su concentración de fenoles al ir yendo incrementado la temperatura, mientras que para las muestras de Tasquillo y Huehuetla su comportamiento en su curva de respuesta fue cuadrática, donde la mayor concentración de fenoles totales se obtuvo a la temperatura de 60°C. Estos resultados son comparados con los que realizados por Boban *et al.* (2010) donde obtuvieron un incremento de compuestos fenólicos al someter el vino a un determinado calentamiento, en cuanto a los resultados publicados por Vega-Gálvez *et al.* (2012) con trozos de manzana el contenido de fenoles totales fue disminuyendo conforme se incrementaba la temperatura.

Tabla 3  
Efecto de la temperatura (20, 40, 50, 60, 70 y 80°C) en el contenido total de fenoles en cada muestra de miel

Muestra	Fenoles Totales mg ác. gálico/100g a diferentes temperaturas					
	20°C	40°C	50°C	60°C	70°C	80°C
OR	43.06±0.4d	44.44±0.46c	44.92±0.26c	45.39±0.06c	48.01±0.28b	50.62±0.57a
AC	91.74±0.74c	92.73±0.50c	93.05±0.61c	93.36±0.72c	95.66±0.22b	97.95±0.72a
AR	42.08±0.17e	42.92±1.80d	44.71±1.17c	46.49±0.57b	47.31±0.25a	48.12±0.29a
TA	154.54±1.26d	154.95±0.44d	161.33±0.28c	167.71±0.23a	164.58±0.61b	161.44±1.12c
HU	53.86±0.72b	53.74±0.50b	55.45±0.71ab	57.17±0.99a	56.29±0.46a	55.41±0.67ab

- OR-Orizatlán, AC-Acaxochitlán, AR-Arenal, TA-Tasquillo, HU- Huehuetla.
- Los tratamientos con diferente sobre índice con letra minúsculas tienen diferencias significativas en fila ( $P < 0.05$ ) utilizando la prueba de comparación de medias de Tukey.

En todos los parámetros fisicoquímicos se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el comportamiento de las diferentes mieles con respecto a la temperatura demostrando tener curvas de respuesta lineal en los parámetros (sólidos solubles totales, acidez libre) donde fueron en aumento, mientras que los parámetros (humedad, actividad de agua, pH) van descendiendo conforme la temperatura se incrementa.

### 7.3 Actividad antibacteriana

Los resultados de la actividad antibacteriana de mieles a diferentes concentraciones (55, 70 y 85%) para bacterias Gram-Positivas se muestran en la Tabla 4. Para *Bacillus subtilis* en todas las mieles existió una actividad antibacteriana desde la concentración del 55%, encontrando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las mieles con respecto a las concentraciones siendo la miel de Orizatlán la de mayor porcentaje de inhibición de 99.94% a la concentración del 85%. Estos resultados son similares a los ya reportados por Silici *et al.* (2010) donde se muestra que la bacteria *B. subtilis* es inhibida por mieles que fueron recolectadas en distintos sitios de Turquía, a concentraciones de 50 y 75%. Para *Listeria monocytogenes* se obtuvo una actividad antibacteriana debajo de un 90% de inhibición en todas las mieles a la concentración del 85%. Encontrándose diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tipos de miel y las concentraciones, en donde la concentración de 85% las mieles de Orizatlán y

Arenal tuvieron las mejores actividades antibacterianas con respecto a las demás mieles. Estos resultados son similares a los ya reportados por Silici *et al.* (2010) donde la bacteria *L. monocytogenes* presentó una inhibición antibacteriana con concentraciones de miel a 75%. En *Staphylococcus aureus* a la concentración del 85% se observó la mayor actividad antibacteriana con un porcentaje de inhibición de 70.45% en la miel de Acaxochitlán, encontrando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las diferentes muestras de miel. Esto resultados son apoyados por Gamboa *et al.* (2009) y Silici *et al.* (2010) de distintas mieles recolectadas de diferentes regiones de Colombia y Turquía que tienen actividad antibacteriana menor con *Staphylococcus aureus*.

Tabla 4  
Actividad antibacteriana de diferentes muestras de miel a concentraciones de 55, 70 y 85% sobre bacterias Gram-Positivas (% de Inhibición).

Muestra Miel	Gram +											
	<i>B. subtilis</i>				<i>L. monocytogenes</i>				<i>S. aureus</i>			
	55%	70%	85%	Error Est.	55%	70%	85%	Error Est.	55%	70%	85%	Error Est.
OR	99.8193Bb	99.8806Ab	99.9419Aa	1.63E-02	84.4444Ba	86.8055ABa	89.1666Aa	0.7036	9.375Ac	17.8977Ac	26.4204Ad	3.2721
AC	99.8322Ba	99.8854Aa	99.9387Aa	1.31E-02	70.8333Ac	73.3333Ab	75.8333Ab	1.134	58.5227Aa	64.4886Aa	70.4545Aa	2.2727
AR	99.8Ab	99.8629Ab	99.9258Aa	0.0246	83.3333Aa	85.2777Aa	87.2222Aa	0.8636	24.7159Cb	34.0909Bb	43.4659Abc	1.4942
TA	98.4193Ab	99.1741Ab	99.9290Aa	0.1443	67.7777Cc	72.6388Bb	77.5Ab	0.7036	1.9886Cc	20.7386Bc	40.625Abc	3.1206
HU	99.7387Cb	99.8209Bb	99.9032Aa	6.78E-03	74.1666Bb	76.1111ABb	78.0555Ab	0.6	40.3409Ab	47.3011Ab	54.2613Ab	3.0914
Error Est.	0.1032	4.90E-02	8.89E-03		0.6804	0.80027	0.9622		3.3781	2.6137	2.0486	

- OR-Orizatlán, AC-Acaxochitlán, AR-Arenal, TA-Tasquillo, HU-Huehuetla, Error Est.-Error Estándar.
- Los tratamientos con diferente letra mayúscula tienen diferencias significativas en fila (P<0.05) entre las concentraciones utilizando la prueba de comparación de medias de Tukey.
- Los tratamientos con diferente letra minúscula tienen diferencias significativas en columna (P<0.05) entre el tipo de miel utilizando la prueba de comparación de medias de Tukey.

Los resultados de la actividad antibacteriana de mieles a diferentes concentraciones (55, 70 y 85%) para bacterias Gram-Negativas se muestran en la Tabla 5. En *Salmonella sp.* todas las mieles tuvieron actividad bactericida desde la concentración de 55%. Encontrando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las mieles en todas las concentraciones siendo la miel de Orizatlán con menor actividad del 99.9968%. Estos resultados son similares a los reportados por Gamboa *et al.* (2009) donde mieles de Colombia también tuvieron un efecto bactericida. Con *Pseudomonas aeruginosa* se observa que esta bacteria fue más resistente ya que su actividad antibacteriana en la concentración del 85% es donde se obtuvieron mayores porcentajes de inhibición en su actividad, encontrando en esta concentración diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las mieles siendo Orizatlán y Acaxochitlán las de mayor actividad antibacteriana mayor del 99.84%, mientras que a las concentraciones de 55 y 75% se obtuvieron las menores inhibiciones por debajo del 61.21%. Estos resultados son similares a los reportados por Alvarez-Suarez *et al.* (2010) donde se muestra que la bacteria *P. aeruginosa* tuvo mayor resistencia a la actividad antibacteriana de diferentes mieles monoflorales de Cuba presentando diferentes actividades mínimas de dilución por cada tipo de miel. En *Escherichia coli* se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las distintas mieles en todas las concentraciones 55, 75 y 85%. Observando que la muestra de miel de Tasquillo tuvo la mayor actividad antibacteriana con un porcentaje de inhibición de un 93.63% en la concentración de 85% con respecto a las demás muestras. Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Voidarou *et al.* (2011) donde reportaron diferencias entre las mieles provenientes de Grecia en la inhibición de *Escherichia coli*. Esta bacteria demostró mayor resistencia que *Staphylococcus aerues* (Silici *et al.*, 2010).

En los resultados de este trabajo no se apreciaron diferencias entre las bacterias Gram-Positivas y Gram-Negativas (Tabla 4 y 5) que concuerdan con lo reportado por Escuredo *et al.* (2012) donde la actividad antibacteriana no fue diferente por el Gram. Pero estos resultados no concuerdan con Alvarez-Suarez *et al.* (2010)

donde reporta que las bacterias Gram positivas son más sensibles que las Gram negativas. Esto podría ser debido a que la fuente floral es diferente (Silici *et al.*, 2010).

Todas las muestras de miel que se probaron en los bioensayos con las distintas cepas probadas mostraron susceptibilidad en las diferentes concentraciones. Las muestras de miel frente a *Salmonella sp* mostraron una actividad bactericida, mientras que ante las demás cepas se observó un comportamiento de actividad inhibitoria donde *Bacillus subtilis* obtuvo la mayor inhibición mientras que en *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* O157: H7, tuvieron una menor inhibición ante las muestras de miel. Después de haber realizado los bioensayos con las diferentes muestras de miel a diferentes concentraciones (55, 70 y 85%) contra las bacterias patógenas se eligió la mejor concentración que fue de 85%, ya que fue con la que se obtuvieron los mejores resultados de actividad antibacteriana con los porcentajes más altos de inhibición.

Tabla 5

Actividad antibacteriana de diferentes muestras de miel a concentraciones de 55, 70 y 85% sobre bacterias Gram-Negativas (% de Inhibición).

Muestra Miel	Gram -											
	<i>Salmonella sp.</i>				<i>P. aeruginosa</i>				<i>E. coli</i>			
	55%	70%	85%	Error Est.	55%	70%	85%	Error Est.	55%	70%	85%	Error Est.
OR	99.9968Bb	99.9979ABb	99.9990Aa	2.44E-04	9.6774Ca	53.9927Ba	99.9209Aa	6.47	85.5555Bb	87.6767Aba	89.7979Ab	0.4123
AC	99.9987Ab	99.9990Ab	99.9993Aa	2.34E-04	22.5806Ca	61.2137Ba	99.8467Aa	6.2444	86.1616Bb	88.4343Aba	90.7070Aab	0.6578
AR	99.9987Bb	99.9993ABa	99.9996Aa	1.77E-04	0Ba	9.61854Bb	99.7403Aab	5.5532	75.5555Cc	78.6868Bc	81.8181Ad	0.5117
TA	99.9989Aa	99.9993Ab	99.9999Aa	1.22E-04	0Ba	9.61612Bb	99.7467Aab	5.5518	86.7676Ca	90.202Ba	93.6363Aa	0.5313
HU	99.9984Bb	99.9991ABb	99.9999Aa	1.77E-04	0Ba	0Bb	99.7774Aa	1.86E-03	83.7373Cb	84.4949Bb	85.2525Ac	0.471
Error Est.	2.58E-04	9.71E-05	1.99E-04		6.1205	6.9317	1.49E-02		0.511	0.512	0.5458	

- OR-Orizatlán, AC-Acaxochitlán, AR-Arenal, TA-Tasquillo, HU-Huehuetla, Error Est.-Error Estándar.
- Los tratamientos con diferente letra mayúscula tienen diferencias significativas en fila (P<0.05) entre las concentraciones utilizando la prueba de comparación de medias de Tukey.
- Los tratamientos con diferente letra minúscula tienen diferencias significativas en columna (P<0.05) entre el tipo de miel utilizando la prueba de comparación de medias de Tukey.

#### **7.4 Efecto de la temperatura sobre mieles multiflorales del estado de Hidalgo en su actividad antibacteriana de diferentes cepas patógenas**

Los resultados del efecto de la temperatura sobre las muestras de miel en la actividad antibacteriana sobre bacterias Gram-Positivas y Negativas presentaron curvas de respuestas lineales donde al pasar por cada tratamiento térmico la actividad antibacteriana va descendiendo, mientras que en las curvas de respuesta cuadráticas la mayor actividad antibacteriana se presentó a los 60°C estos tipos de curvas de respuesta se presentaron conforme a la bacteria a inhibir.

En *B. subtilis* (Figura 8) se encontró una curva de respuesta lineal en las muestras de miel de Arenal, Huehuetla y Tasquillo con respecto a la temperatura, mientras a las mieles de Orizatlán y Acaxochitlán la curva de respuesta fue cuadrática donde se observa un incremento en la actividad antibacteriana, encontrando su máxima actividad a los 60°C. Los resultados nos indican que los componentes antibacterianos que afectan a *B. subtilis* son diferentes dependiendo del tipo de miel.

La miel con mayor actividad antibacteriana en *B. subtilis* fue Orizatlán que tuvo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto a las mieles de Tasquillo y Huehuetla siendo así que todas las mieles demostraron un comportamiento distinto.

Con respecto a la interacción entre miel y temperatura se observa que si hay diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el diseño factorial.

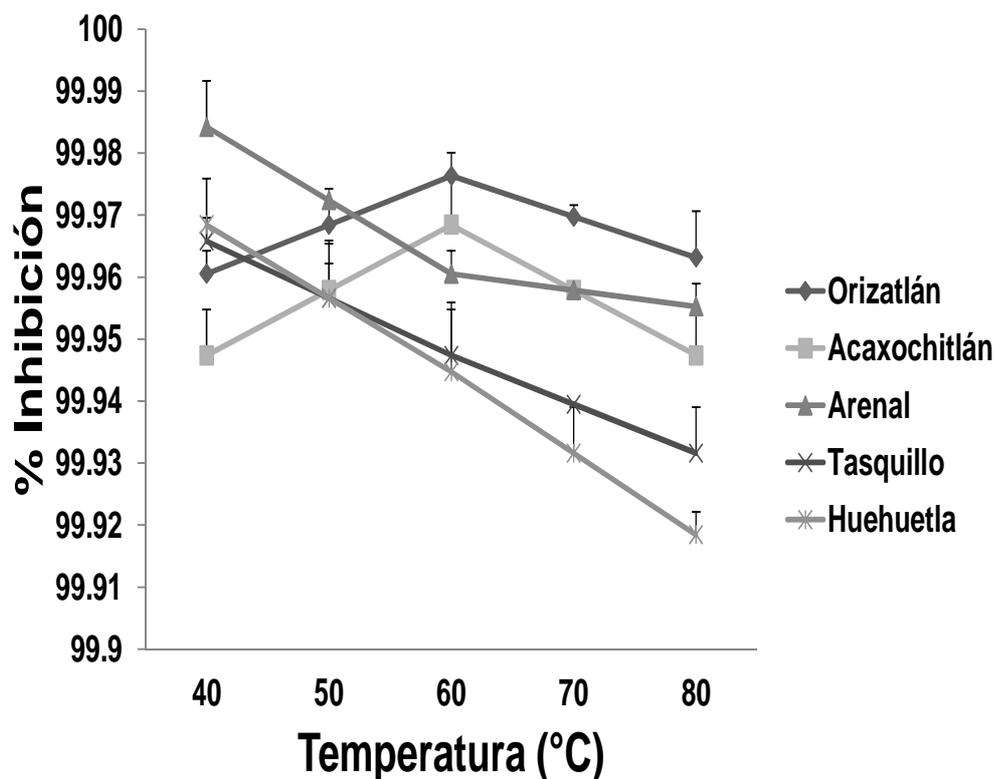


Fig. 8. Inhibición del crecimiento de *B. Subtilis* por mieles multiflorales del estado de Hidalgo sometidas a diferentes temperaturas.

En cuanto al bioensayo para *L. monocytogenes* (Figura 9) se encontró una curva de respuesta cuadrática en las muestras de miel de Orizatlán, Acaxochitlán, Arenal, y Huehuetla, mientras que la miel de Tasquillo se observó una curva de respuesta lineal. Los resultados nos indican que los componentes antibacterianos que afectan a *L. monocytogenes* en las muestras de miel de Orizatlán, Acaxochitlán, Arenal y Huehuetla son diferentes a los de Tasquillo.

La miel con mayor actividad antibacteriana en *L. monocytogenes* fue Orizatlán que tuvo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto a las mieles de Acaxochitlán, Tasquillo y Huehuetla siendo así que todas las mieles demostraron un comportamiento distinto.

Con respecto a la interacción entre miel y temperatura se observa que si hay diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el diseño factorial.

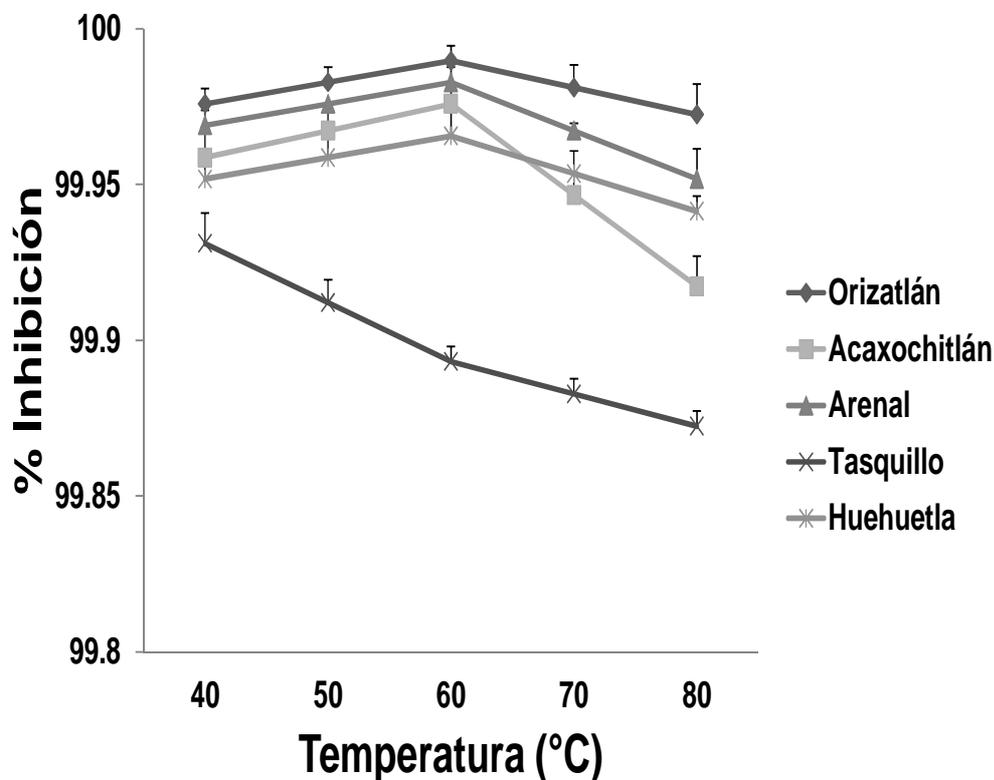


Fig. 9. Inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes* por mieles multiflorales del estado de Hidalgo sometidas a diferentes temperaturas.

En el bioensayo para *S. aureus* (Figura 10) se encontró una curva de respuesta cuadrática en todas las mieles. Lo que sugiere que los componentes con actividad antibacteriana que afectan a *S. aureus* podrían ser similares.

La miel con mayor actividad antibacteriana en *S. aureus* fue Huehuetla que tuvo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto a las demás mieles de Orizatlán, Acaxochitlán, Arenal y Tasquillo siendo así que todas las mieles demostraron un comportamiento distinto.

Con respecto a la interacción entre miel y temperatura se observa que si hay diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el diseño factorial.

En un estudio realizado por Fujita *et al.* (2013) en extractos de pulpa con maltodextrina sometida a diferentes temperaturas de secado se observó actividad antimicrobiana contra *S. aureus* en los diferentes tratamientos. Taormina *et al.* (2001) en su trabajo realizado encontraron que hay diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto a miel que fue calentada a  $37^{\circ}\text{C}$  con respecto a una miel que no fue calentada encontrando actividad antibacteriana contra *L. monocytogenes* y *S. aureus* entre las mieles.

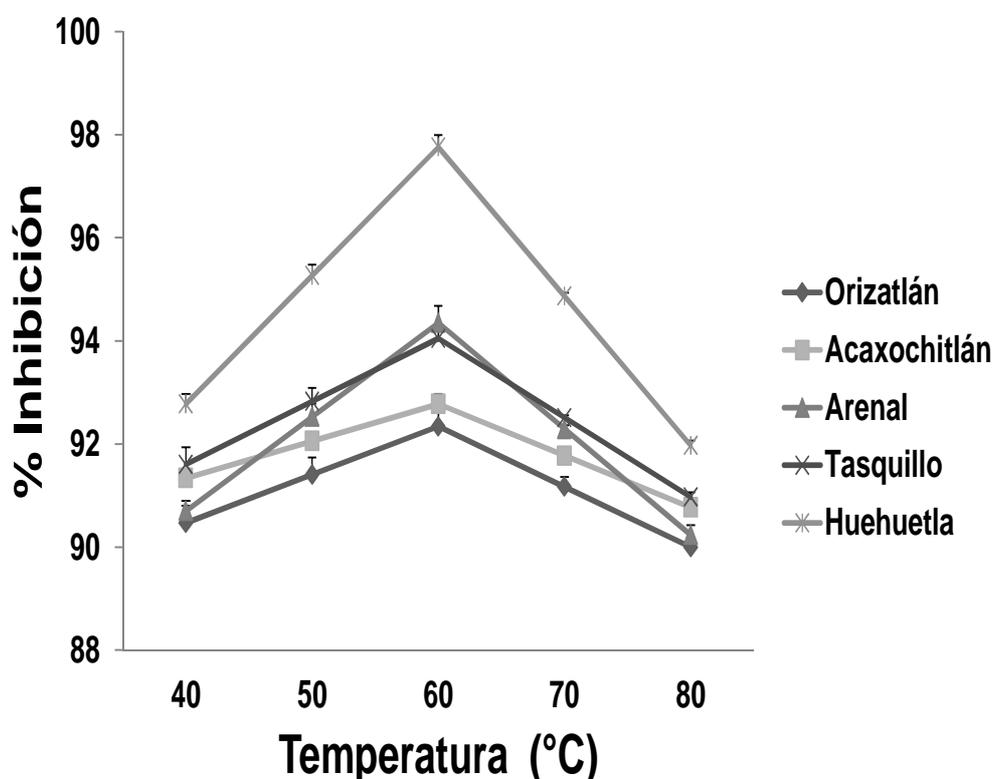


Fig. 10. Inhibición del crecimiento de *S. aureus* por mieles multiflorales del estado de Hidalgo sometidas a diferentes temperaturas.

Los resultados en las bacterias Gram-Negativas de igual forma presentaron curvas de respuesta tanto lineal como cuadrática. En *Salmonella sp.* (Figura 11) se observó una curva de respuesta lineal en todas las mieles. Al incrementar las diferentes temperaturas va descendiendo paulatinamente la actividad

antibacteriana. Los resultados sugieren que los componentes antibacterianos que afectan a *Salmonella sp.* son sensibles a la temperatura.

La miel con mayor actividad antibacteriana en *Salmonella sp.* fue Acaxochitlán que tuvo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto a las mieles de Orizatlán y Huehuetla.

Con respecto a la interacción entre miel y temperatura se observa que no hay diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el diseño factorial.

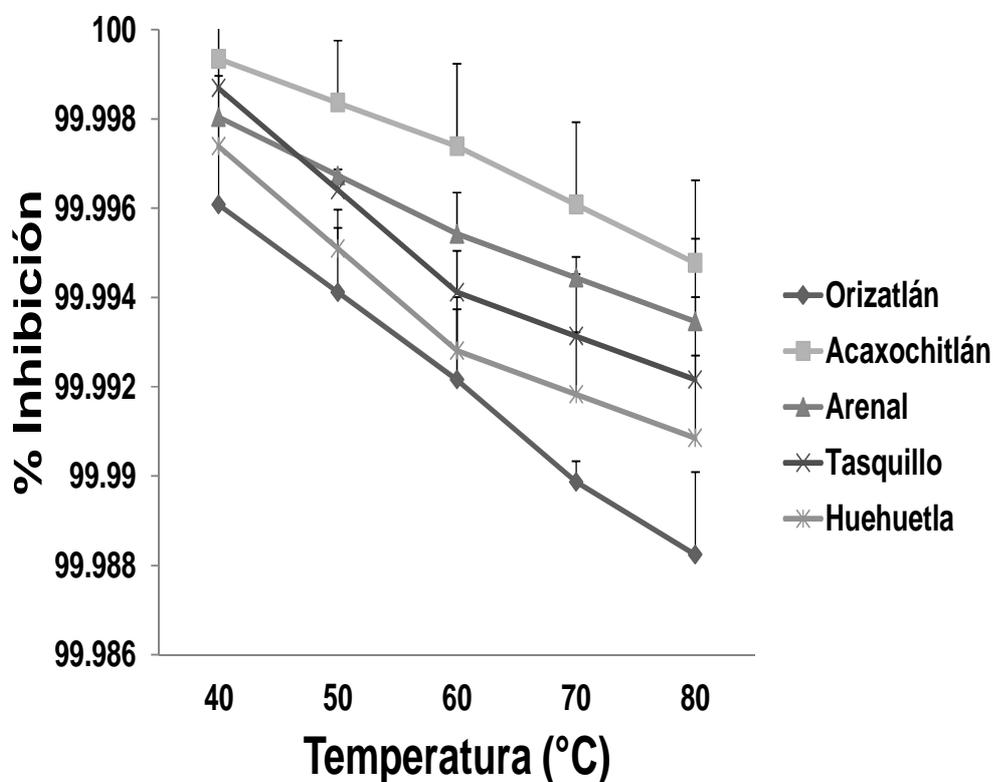


Fig. 11. Inhibición del crecimiento de *Salmonella sp.* por mieles multiflorales del estado de Hidalgo sometidas a diferentes temperaturas.

En *P. aeruginosa* (Figura 12) se encontró una curva de respuesta lineal en las muestras de miel de Arenal, Tasquillo y Huehuetla, en cuanto a las muestras de

Orizatlán y Acaxochitlán se observa una curva de respuesta cuadrática. Los resultados nos indican que los componentes antibacterianos que afectan a *P. aeruginosa* en las muestras de miel de Arenal, Huehuetla y Tasquillo son diferentes a los de Orizatlán y Acaxochitlán.

La miel con mayor actividad antibacteriana en *P. aeruginosa* fue Arenal que tuvo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto a las mieles de Acaxochitlán, Orizatlán y Tasquillo siendo así que todas las mieles demostraron un comportamiento distinto.

Con respecto a la interacción entre miel y temperatura se observa que si hay diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el diseño factorial.

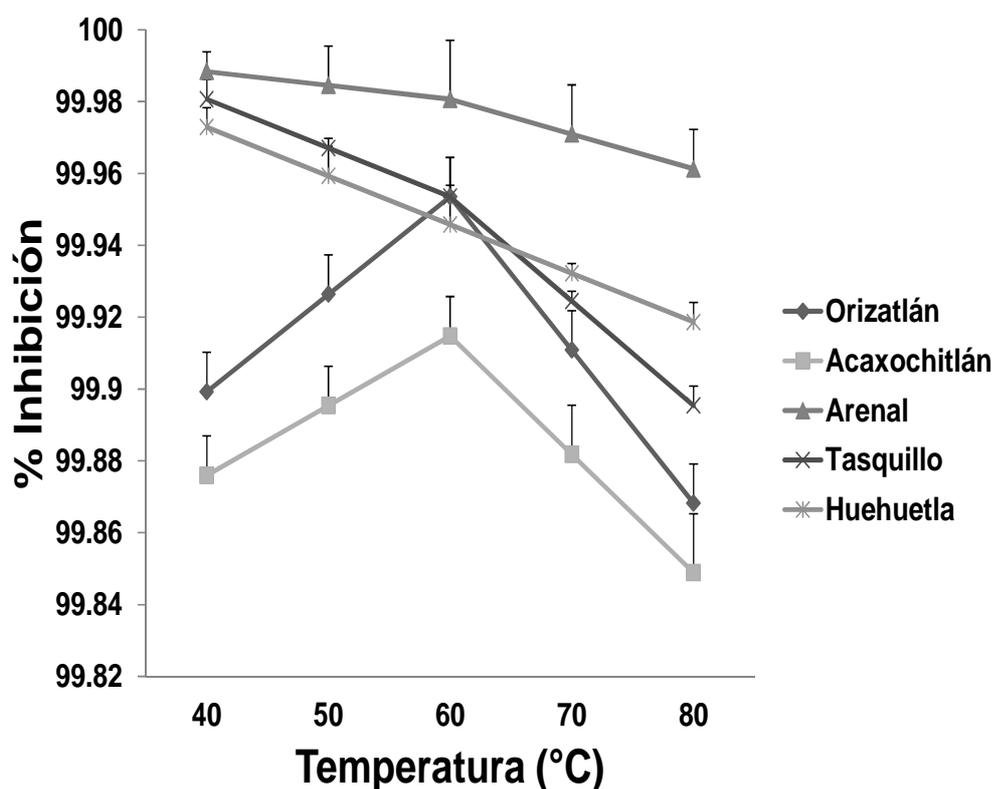


Fig. 12. Inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa* por mieles multiflorales del estado de Hidalgo sometidas a diferentes temperaturas.

En *E. coli* (Figura 13) se encontró una curva de respuesta cuadrática en todas las mieles. Los resultados sugieren que los componentes con actividad antibacteriana sobre *E. coli* tiene su mayor porcentaje de inhibición a los 60°C.

La miel con mayor actividad antibacteriana en *E. coli* fue Huehuetla que tuvo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) con respecto a las demás mieles de Orizatlán, Acaxochitlán, Arenal y Tasquillo siendo así que todas las mieles demostraron un comportamiento distinto.

Con respecto a la interacción entre miel y temperatura se observa que si hay diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el diseño factorial.

Estos resultados obtenidos son similares a los reportados por Boban *et al.* (2010) donde se observó que al someter el vino a un tratamiento térmico, incrementó con más eficiencia su actividad antibacteriana contra *E. coli* en tiempos cortos.

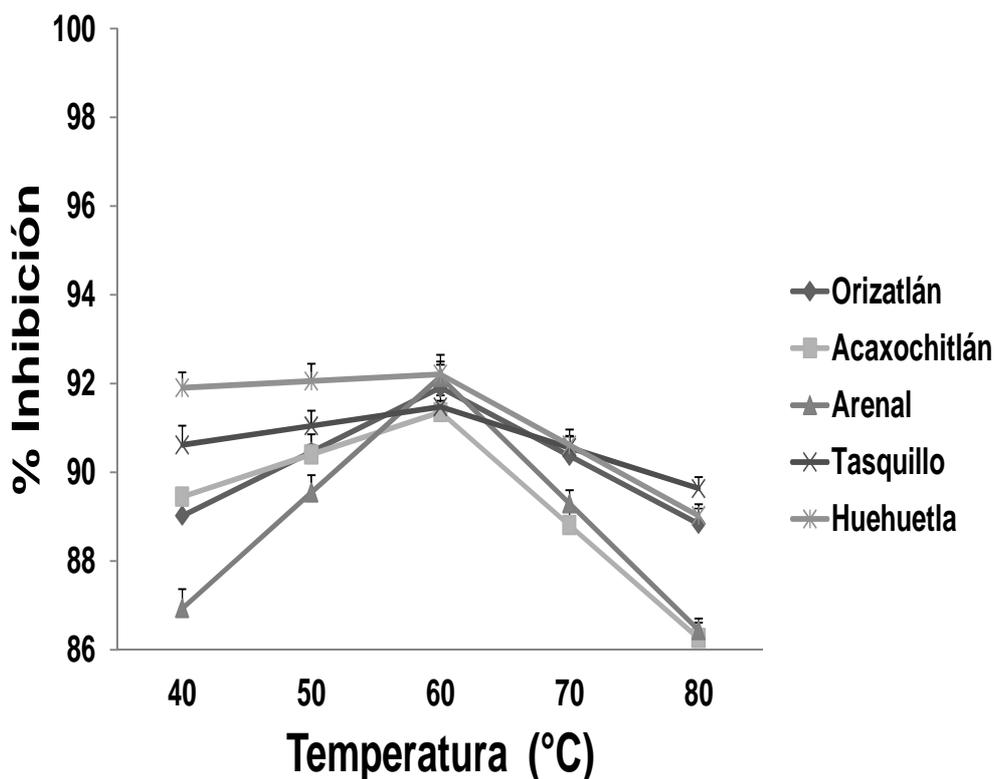


Fig. 13. Inhibición del crecimiento de *E. coli* por mieles multiflorales del estado de Hidalgo sometidas a diferentes temperaturas.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio mostraron que en *Salmonella sp.* con la muestra de miel Acaxochitlán es la de mayor actividad antibacteriana con un porcentaje de inhibición del 99.9993% a los 40°C contra esta bacteria, mientras que en *B. subtilis* y *L. monocytogenes* la mayor inhibición fue con la muestra de miel de Orizatlán con porcentajes mayores del 99.9763% de inhibición a los 60°C, en cuanto a *P. aeruginosa* la muestra de miel de Arenal su mayor efectividad de inhibición fue del 99.9883% a los 40°C y para lo que fue *S. aureus* y *E. Coli* la mejor muestra de miel fue Huehuetla con inhibiciones por debajo del 97.7591% a los 60°C. Por lo que con estos resultados sugieren que los componentes bioactivos existentes en cada una de las muestras de miel actúan de forma distinta según la bacteria patógena a inhibir y de la temperatura.

Con respecto a las curvas de respuesta sobre temperatura en la actividad antibacteriana se observó que las muestras de miel de Acaxochitlán y Orizatlán que se comportan en forma similar en las diferentes bacterias. Mientras en Huehuetla y Arenal tuvieron un comportamiento similar y con Tasquillo sólo difiriendo en *L. monocytogenes* (Tabla 6). Estos resultados nos indican que las mieles contienen diferentes compuestos bioactivos que actúan en las diferentes bacterias patógenas.

Tabla 6  
Comportamiento en el tipo de curva de respuesta (Lineal o Cuadrático) de mieles sometidas a diferentes temperaturas en su actividad antibacteriana

Muestras	Microorganismo					
	<i>Salmonella sp.</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
OR	L	C*	C	C*	C	C
AC	L*	C	C	C	C	C
AR	L	L	L*	C	C	C
TA	L	L	L	L	C	C
HU	L	L	L	C	C*	C*

- o OR-Orizatlán, AC-Acaxochitlán, AR= Arenal, TA-Tasquillo, HU-Huehuetla.
- o L (Lineal)- C (Cuadrático), L\*-C\*= Miel con mayor actividad antibacteriana.

Con respecto a la correlación en cuanto a las cepas de *L. monocytogenes* y *S. aureus* como se observa en la tabla 7 con respecto a pH y acidez libre su correlación fue regular por debajo de  $r=0.65$  seguida de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *B. subtilis* con correlaciones menores de  $r=0.50$ .

Tabla 7

Coefficiente de correlación (r) de la actividad antibacteriana con referente a fenoles totales, pH, acidez libre, solidos solubles totales, humedad, actividad de agua de diferentes mieles sobre bacterias Gram-Positivas

Muestra Miel	Gram +																	
	<i>B. subtilis</i>						<i>L. monocytogenes</i>						<i>S. aureus</i>					
	Fenoles Totales	pH	Acidez Libre	SST (°Brix)	Humedad	a <sub>w</sub>	Fenoles Totales	pH	Acidez Libre	SST (°Brix)	Humedad	a <sub>w</sub>	Fenoles Totales	pH	Acidez Libre	SST (°Brix)	Humedad	a <sub>w</sub>
OR	0.4035	0.4642	0.6584	0.8540	0.8911	0.7589	0.5351	0.5259	0.6564	0.9106	0.9581	0.7767	0.5218	0.5164	0.6527	0.9086	0.9572	0.7739
AC	0.0855	0.3492	0.3755	0.3890	0.6306	0.4378	0.4991	0.6252	0.6377	0.5568	0.9770	0.6763	0.45698	0.6006	0.6150	0.5394	0.9684	0.6577
AR	0.1152	0.1387	0.1579	0.1985	0.6721	0.1557	0.6402	0.6500	0.6574	0.6982	0.9663	0.6640	0.6438	0.6463	0.6495	0.6966	0.9622	0.6610
TA	0.0759	0.2572	0.3523	0.2204	0.2706	0.3218	0.5825	0.6660	0.5919	0.6924	0.9543	0.6155	0.6117	0.6654	0.5836	0.6926	0.9528	0.6055
HU	0.0612	0.1161	0.1317	0.0387	0.4579	0.0765	0.5335	0.6369	0.6272	0.7522	0.9604	0.7760	0.6095	0.6032	0.6166	0.7369	0.9479	0.7635

○ OR- Orizatlan, AC- Acaxochitlan, AR- Arenal, TA- Tasquillo, HU- Huehuetla.  
○ SST- Solidos solubles totales (°Brix), a<sub>w</sub>-Actividad de agua

En cuanto a la correlación entre fenoles totales y la actividad antibacteriana se halló que sólo en *Salmonella sp.* se encontró una correlación promedio de  $r=0.892$  en las mieles estudiadas (Tabla 8) demostrando efectivamente que los fenoles totales presentes tienen efecto en el crecimiento de esta bacteria, en cuanto a *E. coli* sólo la muestra de miel de Acaxochitlán se encontró una correlación de  $r=0.8896$  entre los fenoles y el porcentaje de inhibición (Tabla 8). Estos resultados sugieren que las mieles tienen diferentes compuestos bioactivos a los fenoles que actúan de forma distinta según cada bacteria patógena. Como se observa en la tabla 8 para la bacteria de *Salmonella sp.* se tiene una buena correlación con respecto al pH y la acidez libre con un promedio de  $r=0.9781$  en pH, mientras que en su acidez libre presenta un promedio de  $r=0.9872$  esto sugiere que realmente estos parámetros fisicoquímicos influyen en la actividad antibacteriana.

Tabla 8

Coefficiente de correlación (r) de la actividad antibacteriana con referente a fenoles totales, pH, acidez libre, solidos solubles totales, humedad, actividad de agua de diferentes mieles sobre bacterias Gram-Negativas

Muestra Miel	Gram -																	
	<i>Salmonella sp.</i>						<i>P. aeruginosa</i>						<i>E. coli</i>					
	Fenoles Totales	pH	Acidez Libre	SST (°Brix)	Humedad	a <sub>w</sub>	Fenoles Totales	pH	Acidez Libre	SST (°Brix)	Humedad	a <sub>w</sub>	Fenoles Totales	pH	Acidez Libre	SST (°Brix)	Humedad	a <sub>w</sub>
OR	0.9378	0.9623	0.9962	0.9381	0.8815	0.9940	0.6412	0.5266	0.3412	0.2492	0.1956	0.3015	0.2718	0.1340	0.0711	0.1148	0.1392	0.1006
AC	0.9642	0.9838	0.9811	0.9911	0.6533	0.9680	0.2497	0.0095	0.0373	0.0347	0.4624	0.1068	0.8896	0.7410	0.7229	0.6718	0.4584	0.6809
AR	0.9880	0.9934	0.9925	0.9985	0.8826	0.9950	0.5667	0.5738	0.5805	0.6269	0.9365	0.5893	0.5718	0.5212	0.4935	0.5779	0.7771	0.5383
TA	0.8123	0.9986	0.9824	0.9966	0.8334	0.9760	0.4374	0.3761	0.2721	0.4111	0.7925	0.2984	0.3801	0.7351	0.7415	0.7471	0.9114	0.7717
HU	0.7849	0.9527	0.9839	0.9917	0.8912	0.9930	0.3955	0.4104	0.3962	0.5482	0.8508	0.5788	0.4853	0.2504	0.2816	0.4265	0.7520	0.4636

- OR- Orizatlan, AC- Acaxochitlan, AR- Arenal, TA- Tasquillo, HU- Huehuetla.
- SST- Solidos solubles totales (°Brix), a<sub>w</sub>-Actividad de agua

## 8 CONCLUSIONES

Cada miel tiene distintas propiedades fisicoquímicas, ya que depende de su origen geográfico así como también del tipo de clima. La miel de Orizatlán tuvo el mayor contenido de sólidos solubles totales; el menor pH, la miel de Huehuetla; la menor actividad de agua las tuvieron las mieles de Acaxochitlán, Tasquillo y Huehuetla; la menor humedad las mieles de Arenal, Tasquillo y Huehuetla; la mayor acidez la tuvo la miel de Acaxochitlán y el mayor contenido de fenoles la tuvo la miel de Tasquillo.

Las temperaturas tienen un efecto sobre las muestras de miel cambiando sus propiedades fisicoquímicas con curvas de respuesta lineales.

Las mieles tuvieron actividad antibacteriana con las distintas concentraciones de 55, 70 y 85% con excepción de la *P. aeruginosa* a la concentración de 55% las mieles de Arenal, Tasquillo y Huehuetla no presentaron actividad antibacteriana.

Las mieles multiflorales de diferentes zonas del estado de Hidalgo al ser sometidas a distintas temperaturas mostraron curvas de respuesta (lineal o cuadrática) dependiendo de la miel y de la bacteria patógena a inhibir en su actividad antibacteriana.

El efecto antibacteriano de las diferentes mieles no depende del Gram de la bacteria.

Solo en *Salmonella sp.* se encontró una buena correlación entre los fenoles totales, pH, acidez libre, actividad de agua, humedad y sólidos solubles totales con la actividad antibacteriana.

## **9 RECOMENDACIONES**

Identificar que compuestos son los que actúan sobre cada bacteria patógena con mayor eficiencia en la actividad antibacteriana de cada miel y ver de qué forma interviene estos compuestos contra las bacterias utilizadas en este trabajo.

Cuantificar la cantidad de glucosa oxidasa a las muestras de miel y ver si hay una correlación con la actividad antibacteriana.

---

---

## 10 BIBLIOGRAFÍA

- Acquarone, C., Buera, P., Elizalde, B., 2007. Pattern of pH and electrical conductivity upon honey dilution as a complementary tool for discriminating geographical origin of honeys. *Food Chemistry* 101, 695–703.
- Albayrak, S., Aksoy, A., Sagdic, O., Hamzaoglu, E. 2010. Compositions, antioxidant and antimicrobial activities of *Helichrysum* (Asteraceae) species collected from Tukey. *Food Chemistry*, 119 (1): 114:122.
- Alberto, M., Rinsdahl, M., Manca, M. 2006. Antimicrobial effect of polyphenols from Apple skins on human bacterial pathogens. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9 (3): 1-5.
- Aljadi A.M, Kamaruddin M.Y. 2004. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two Malaysian floral honeys, *Food Chemistry*. P. 513-518.
- Al-Mamary, M. Al-Meerri, A., Al-Habori, M., 2002. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. *Nutrition Research*. P. 1041-1047.
- Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., Battino, M., 2010. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism* 3, 15–23.
- Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Romandini, S., Vidal, A., Battino, M., 2009. Methodological aspects about determination of phenolic compound and in vitro evaluation of antioxidant capacity in the honey: a review. *Current Analytical Chemistry* 5, 292–302.
- Amsterdam D. Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media. Lorian V (ed). *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 4<sup>a</sup> edición. Williams & Wilkins. Baltimore, 1996. pp. 52-111.

- Andrews, J. M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48:5-16.
- Anklam, E., 1998. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chemistry* 63 (4), 549–562.
- AOAC. 2005. International. Gaithersburg. MD. USA. Methods 920.181. Ash of honey. Association of Official Analytical Chemists. Virginia. USA: Arlington.
- AOAC. 2000. Official methods of analysis. In K. Helrich (Ed.16th). Arlington, VA, USA: Association of official Analytical Chemists, Inc.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis. In K. Helrich (Ed.) (15th Ed.). Arlington, VA, USA: Association of official Analytical Chemists, Inc.
- AOAC. 1999. Official Methods of analysis of AOAC international. Ed. 16. Gaithersburg. MD. USA.
- Azeredo, L.C., Azeredo, M.A., De Souza, R.M., Dutra, V.M.L., 2003. Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chemistry* 80, 249–254.
- Badui Dergal Salvador. Química de los alimentos, 4 Ed. 2006. P. 507-515.
- Bath Parminder Kaur, Singh Narpinder., 1999. A comparison between *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey. *Food Chemistry*. P. 389-397.
- Baltrušaitytė, V., Venskutonis, P.R., Ceksterytė, V., 2007. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry*. P. 502-514.
- Basualdo, C., Sgroy, V., Finola, MS, Marioli, JM, 2007. Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Veterinary Microbiology*. P. 375-381.

- Bertoncelj, J., Dobersek, U., Jamnik, M., & Golob, T. 2007. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. *Food Chemistry*. P. 822–828.
- Bogdanov, S. 1997. Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebensmittel Wissenchard und Technology*. P. 748–753.
- Boban N., Tonkic M., Modun D., Budimir D., Mudnic I., Sutlovic D. 2010. Food Control, Thermally treated wine retains antibacterial effects to food-born pathogens. *Food Control*. P. 1161-1165.
- Bradford, M.M., 1976. Rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Bunting, C., Molan, P., 2003. The effect of dilution on the rate of hydrogen peroxide production in honey and its implications for wound healing. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 9, 267–273.
- Caballero Torres A. E., Ed. *Ciencias Médicas*, 2008, Temas de Higiene de los Alimentos. P. 30-42.
- Chen, L., Mehta, A., Berenbaum, M., Zangerl, A.R., Engeseth, N.J., 2000. Honeys from different floral sources as inhibitors of enzymatic browning in fruit and vegetable homogenates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. P 4997–5000.
- Chirife, J., Zamora, M.C., Motto, A., 2006. The correlation between water activity and % moisture in honey: fundamental aspects and application to Argentine honeys. *Journal of Food Engineering*. P. 287–292.
- Cushnie T.P. Tim, J., Andrew Lamb. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids, *International Journal of Antimicrobial Agents*. P. 343-356.

- Escriche, I., Visquert, M., Carot, J. M., Doménech, E., & Fito, P. 2008. Effect of honey thermal conditions on hydroxymethylfurfural content prior to pasteurization. *Food Science and Technology International*. P. 29–35.
- Escriche, I., Visquert, M., Juan-Borrás, M., & Fito, P. 2009. Influence of simulated industrial thermal treatments on the volatile fractions of different varieties of honey. *Food Chemistry*. P. 329–338.
- Escuredo O., Silva L.R, Valentão P., Seijo M.C., Andrade P.B. 2012. Assessing *Rubus* honey value: Pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity, *Food Chemistry*. P. 671-678.
- Estevinho, L., Prereira, 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. EU, 2001. Council Directive 2001/110 relating to honey. *Official Journal of the European Communities*.
- Fernández E. E. 2000, *Microbiología e inocuidad de los alimentos*. Universidad Autónoma de Querétaro México.
- Ferreira, I., Aires, E., Barreira, J.C.M., Estevinho, L., 2009. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*. P. 1438–1443.
- Finola, M.S., Lasagno, M.C., Marioli, J.M., 2007. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. *Food Chemistry*. P. 1649-1653.
- Franch, V.M., Cooper, R.A., Molan, P.C., 2005. The antibacterial activity of honey against coagulase-negative staphylococcus. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. P. 228–231.

- Frankel, S., Robinson, G.E., Berenbaum, M.R., 1998. Antioxidant capacity and correlation characteristics of 14 unifloral honeys. *Journal of Apiculture Research*. P. 27–31.
- Frías, I. Hardisson, A. y Corrales, J. 1994. Color y contenido de mineral en mieles de consumo frecuente en Santa Cruz de Tenerife. *Alimentación*. P. 93-98.
- Fujita A, Borges K., Correia R, Melo Franco B.D.G., Genovese M.I., 2013. Food Research International, Impact of spouted bed drying on bioactive compounds, antimicrobial and antioxidant activities of commercial frozen pulp of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh). *Food Research International*. P. 495–500
- Gamboa M.V., Figueroa J., 2009. Poder antibacterial de *Tetragonisa angustala*, valorada por concentración mínima inhibitoria Pp. 97-106. Universidad Nacional de Colombia, Cr. 30 N.º 45-03, Bogotá, Colombia.
- García-Pedraza, L. G., Reyes-Agüero, J.A., Aguirre-Rivera, J.R., Pinos-Rodríguez, J.M. 2005. Preliminary nutritional and organoleptic assessment of xoconostle fruit (*Opuntia spp.*) as a condiment or appetizer. *Italian Journal Science* 3:333–40.
- Gheldof, N., Engeseth, N.J., 2002. Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. P. 3050–3055.
- Gheldof, N., Xiao-Hong, W., Engeseth, N., 2002. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. P. 5870–5877.
- Gil, H. 2010. Tratado de nutrición. Composición y calidad nutritiva de los alimentos. 2da. Edición. Editorial panamericana, México. P. 812.

- 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*. P. 544-548.
- Gómez, P. 2004. Mielles Españolas y Portugal Conocimiento y Cata. Ed. Montaguid P. 151.
- Gómez, a. 1996 a. Analisis sensorial de mieles: influencia de la composición y el procesado. *Vida avícola*. P. 15-20.
- Gonzales G, González C, Pérez S, Gómez O, 1995. Características fisicoquímicas de la miel producida en el Estado de Durango. IX Seminario de Apicultura. Colima, Colima.
- Gonnet, M. 1986. Analyse des miels. Description de quelques méthodes de contrôle de la qualité. *Bulletin Technique Apicole*. P. 17–36.
- Griffith. Eieri Jones. 1993. La ciencia Aplicada al estudio de los alimentos. Ed. BROWNSSELL. P. 56-72.
- Guler, A., Bakan, A., Nisbet, C., & Yavuz, O. 2007. Determination of important biochemical properties of honey to discriminate pure and adulterated honey with sucrose (*Saccharum officinarum* L.) syrup. *Food Chemistry*. P. 9-1125.
- Harold Egan, Ronald S. Kirk, Ronald S. 1993. Análisis Químicos de los Alimentos de Person. Ed. Continental, S.A de C.V. P. 185.
- Ibarz, A., Pagañ, J., Garza, S., 1999. Kinetic models for color changes in pear puree during heating at relatively high temperatures. *Journal of Food Engineering*. P. 415–422.
- Ibarz, A., Pagañ, J., Garza, S., 2000. Kinetic models of non-enzymatic browning in apple puree. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. P. 1162-1168.

- Iglesias, M.T., de Lorenzo, C., Polo, M.C., Martín-Alvarez, P.J., Pueyo, E., 2007. Usefulness of amino acids composition to discriminate between honeydew and foral honeys. Application to honeys from a small geographic area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. P. 84–89.
- Irish, J., Carter, D.A., Shokohi, T., Blair, S.E., 2006. Honey has an antifungal effect against *Candida* species. *Medical Mycology*. P. 289-291.
- Kaškonienė V, P.R. Venskutonis, V. Čeksterytė. 2010. Carbohydrate composition and electrical conductivity of different origin honeys from Lithuania, *Food Science and Technology*. P. 801-807.
- Kil, H. Y., Seong, E. S., Ghimire, B. K., Chung, I. -M., Kwon, S. S., Goh, E. J. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food Chemistry*. P. 1234–1239.
- Kirsa Evelin, Raili Palla, Kaie Martverka, Katrin Laosa., 2011. Physicochemical and melissopalynological characterization of Estonian summer honeys. *Procedia Food Science*. P. 616 – 624.
- Klancnik, A., Piskernik, S., Jersek, B., Mozina, S. S. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extract. *Journal of Microbiological Methods*. P. 121-126.
- Küçük, M., Kolaili, S., Karaoglu, S., Ulusoy, E., Baltaci, C, Candan, F., 2007. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*. P. 526-534.
- Kumar, A., Kaushik, R., Kashyap, A., Kashyap, M.K., 2005. Indian honey: a natural product with antibacterial activity against antibiotic resistant pathogens, an “in vitro” study. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. P. 190-193.
- Lachman, J., Orsák, M., Hejtmánková, A., Kovářová, E., 2010. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. *Food Science and Technology*. P. 52–58.

- Lastras, P. 2009. Probioticos, *Lactobacillus acidophilus* y *bifodobacterium bifidum*, suplementos nutricionales, Salud BIO, P. 12.
- Lazarevic´, Kristina B., Filip Andric´, Jelena Trifkovic´, Z´ivoslav Tešic´, Dušanka Milojkovic´-Opsenica. 2012. Characterisation of Serbian unifloral honeys according to their physicochemical parameters. Food Chemistry. P. 2060-2064.
- Lothrop, R.E, 1936. Potencial alkalinity of honey: it isa cid-base value is a food Journal Nutritional; P. 511-514.
- Lurlina, Fritz, R., 2005. Caracterización de microorganismos en Argentina de diferentes fuentes de miel. Revista Internacional de Microbiología de Alimentos. P. 297-304.
- Lusby, P.E., Coombes, A.L., Wilkinson, J.M., 2005. Bactericidal activity of different honeys against pathogenic acteria. Archives of Medical Research. P. 464-467.
- Mateu, A., Moreno B., Rosello Caselles, J. 1993. La apicultura Valenciana. Tradición y aprovechamiento. Generalitat Valenciana Conselleria D` Agricultura, Pesca. España.
- Mato I.H., Sanchez F.P., Muniategui S., Fernandez M., Snachez T. 1998. Enzymatic determination of l-malic acid in honey. Food Chemistry. P. 503-508.
- Meda A., Lamien C.E., Romito M., Millogo J., Nacoulma O.G., 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. Food Chemistry. P. 571–577.
- Mendes, E., Brojo Proença, E., Ferreira, I.M.P.L.V.O., Ferreira, M.A., 1998. Quality evaluation of Portuguese honey. Carbohydrate Polymers. P. 219–223.

- Molan, P.C., Betts, J.A., 2004. Clinical usage of honey as a wound dressing: an update. *Journal of Wound Care*. P. 353–356.
- Moussa A., Nouredine D., Saad A., Abdelmalek M., 2012. Influence of temperature on the inhibitory potency of *Eucalyptus* honey against *Candida albicans*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. P. 567-570.
- Muchuweti, L. M., Mupure, A. N., Murenje, M.A.N. T., Benhura. 2007. Screening of antioxidant and radical activity of *Vigna unguiculata*, *Bidens pilosa* and *Cleome gynandra*, *American Journal of Food Technology*. P. 161–168.
- Mulu, A., Tessema, B., Derby, F., 2004. In vitro assessment of the antimicrobial potential of honey on common human pathogens. *Ethiop.J.Health Dev.* P. 107-112.
- Murakami, M., Yamaguchi, T., Takamura, H., & Matoba, T. 2004. Effects of thermal treatment on radical-scavenging activity of single and mixed polyphenolic compounds. *Journal of Food Science*. P. 7–10.
- Naczki M., Shahidi F. 2004. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*. P. 95-111.
- Nanda, V., Sarkar, B. C., Sharma, H. K., & Bawa, A. S. (2003). Physicochemical properties and estimation of mineral content in honey produced from different plants in Northern India. *Journal of Food Composition and Analysis*. P. 613–619.
- Norma ISO 6887-1983 (E). Microbiology General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination. International Organization for Standardization.
- Norma ISO 7954. 1987. Microbiology - General Guidance for Enumeration of Yeast and Moulds - Colony Count Technique at 25 °C. International Organization for Standardization.

- Norma oficial mexicana NOM-092-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- Norma oficial mexicana NOM-110-SSA1-1994, bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- Norma oficial mexicana NOM-111-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
- NMX-F-036-1997. Alimentos-Miel-Especificaciones y Métodos de prueba., NORMEX fecha de publicación 2006.
- NTCL-CM, 2000. Norma Técnica de Competencia Laboral-Cosecha de Miel. Consejo de Normalización y NTCL-CM, 2000. Consejo de Normalización y Certificación de Competencia Laboral Manual de la Miel.
- Nzeako, B.C., Hamdi, J., 2000. Antimicrobial potential of honey on some microbial isolates. Medical Sciences. P. 75-79.
- Olaitan, P.B., Adeleke, O.E., Hala, I.O. de 2007. Miel: un reservorio de microorganismos y un agente inhibidor para los microbios. África Ciencias de la Salud. P. 159-165.
- Ouchemoukh Salim, Hayette Louaileche, Paul Schweitzer 2007. Physicochemical characteristics and pollen spectrum of some Algerian honeys. Food Control. P. 52-58.
- Papadopoulou, C., Soutli, K., & Roussis, I. G. 2005. Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. Food Technology and Biotechnology. P. 41-46.
- Pereira, J.A., Pereira, A.P.G., Ferreira, I.C.F.R., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., 2006. Table olives from Portugal:

- compounds, antioxidant potential, and antimicrobial activity. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. P. 8425–8431.
- Pérez, R.A., Iglesias, M.T., Pueyo, E., González, M., De Lorenzo, C., 2007. Amino acid composition and antioxidant capacity of Spanish honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. P. 360–365.
- Pinelo, M., Manzocco, L., Nunez, M. J., & Nicoli, M. C. 2004. Solvent effect on quercetin antioxidant capacity. *Food Chemistry*. P. 201–207.
- Pinelo, M., Rubilar, M., Sineiro, J., & Nunez, M. J. 2005. A thermal treatment to increase the antioxidant capacity of natural phenols: Catechin, resveratrol and grape extract cases. *European Food Research and Technology*. P. 284–290.
- Prathapan, A., Lukhman, M., Arumughan, C., Sundaresan, A., Raghu, K.G., 2009. Effect of heat treatment on curcuminoid, colour value and total polyphenols of fresh turmeric rhizome. *International Journal Food Sciences. Technol.* P. 1438–1444.
- Qu, W., Pan, Z., Ma, H., 2010. Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. *Journal Food Engineer*. P. 16–23.
- Radovanovic, A., Radovanovic, B., & Jovancevic, B. 2009. Free radical scavenging and antibacterial activities of southern Serbian red wines. *Food Chemistry*. P. 326-331.
- Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., Vuorela, P., 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*. P. 3–12.
- Rodríguez Graciela, Betzabé Sulbarán de Ferrer, Alexis Ferrer, Belkis Rodríguez. 2004. Characterization of honey produced in Venezuela. *Food Chemistry*. P. 499-502.

- Rooso, L., Bajard, S., Flandrois, J.P., *et al.* 1996. Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8 °C: consequences for the shelf life of chilled products. *Journal of Food Protection*. P. 944-949.
- Ross, J. A., Kasum, C. M. 2002. Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition*. P.19-34.
- SAGARPA. 2010. Producción de miel en México, enciclopedia de los Municipios de México-Regionalización del Estado de Hidalgo, Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal.
- Sagrin Sandra M, and Chong G.H. 2013. Effects of drying temperature on the chemical and physical properties of *Musa acuminata Colla* (AAA Group) leaves Original Research Article, *Industrial Crops and Products*. P. 430-434.
- Sancho, M.T.,S. Muniategui, J.E. Huidobro and J. Simal. 1992. Aging of Honey *Journal Agricultural Food Chemical*. P. 134-138.
- Sakihama, Y., Cohen, M., Grace, S., & Yamasaki, H. 2002. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*. P. 67–80.
- Saraiva, A. M., Saraiva, C. L., Gonçalves, A. M., Soares, R. R., Mendes, F. O., Cordeiro, R. P. 2012. Antimicrobial activity and bioautographic study of *antistaphylococcal* components from *Caesalpinia pyramidalis* Tull. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. P. 147–154.
- Saxena Sudhanshu, Satyendra Gautam, Arun Sharma. 2010. Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chemistry*. P. 391–397.
- Schocken-Iturrino R, Carneiro M, Kato E, Sorbara J, Rossi O, Gerbasi L. 1999. Study of the presence of the spores of *Clostridium botulinum* in honey in Brazil. *Inmol Medic Microb*. P. 379-382.

- Silici S., Sagdic O., Ekici L., 2010. Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of *Rhododendron* honeys. *Food Chemistry*. P. 238-243.
- Silva R. Luis Romeu Videira, Andreia . Monteiro, Patrícia Valentão, Paula B. Andrade. 2009. Honey from Luso region (Portugal): Physicochemical characteristics and mineral contents. *Microchemical Journal*. P. 73–77.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. P. 152–178.
- Sotelo, D. I., Casas, F. N., Camelo, M. G. 2010. Borojó (*Borojoa patinoi*): Source of polyphenols with antimicrobial activity. *Vitae* P. 329-336.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2007. *Fisiología vegetal*. ed. University Jaume I. México. P. 543- 546.
- 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*. P. 217–225.
- Terrab, A., Diez, M.J., Heredia, F.J. 2002. Characterization of Moroccan unifloral honeys by their physicochemical characteristics. *Food Chemistry*. P. 373–379.
- Theunissen, F., Grobler, S., Gedalia, I. 2001. The antifungal action of three South African honeys on *Candida albicans*. *Apidologie*. P. 371-379.
- Tiwari, B. K., Valdramidis, V. P., O'Donnell, C. P., Muthukumarappan, K., Bourke, P., & Cullen, P. J. 2009. Application of natural antimicrobials for food preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. P. 5987–6000.

- Tosi, E., Martinet, R., Ortega, M., Lucero, H., Ré, E. 2008. Honey diastase activity modified by heating. *Food Chemistry*. P. 883–887.
- Tosi, E., D. E. Lucero, H., Bulacio, L. 2004. Effect of the high temperature short warm honey on parameters related to quality, crystallization phenomena and inhibition of fungal. *Lebensm.-Wiss. U-Tec*. P. 669-678.
- Tosi, E., Ciappini, M., Ré, E., Lucero, H. 2002. Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content. *Food Chemistry*. P. 71–74.
- Turkmen, N., Sari, F., Poyrazoglu, E.S., Velioglu, Y.S. 2006. Effects of prolonged heating on antioxidant activity and color of honey. *Food Chemistry*. P. 653–657.
- Vaikousi H., Koutsoumanis K., Biliaderis C.G. 2009. Kinetic modelling of non-enzymatic browning in honey and diluted honey systems subjected to isothermal and dynamic heating protocols, *Journal of Food Engineering*. P. 541-550.
- Vaquero, M. J. R., Alberto, M. R., & de Nadra, M. C. M. 2007. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*. P. 93–101.
- Vega-Gálvez A., Ah-Hen K., Chacana M., Vergara J., Martínez-Monzó J., García-Segovia P., Lemus-Mondaca R., Scala K.D., 2012. Effect of temperature and air velocity on drying kinetics, antioxidant capacity, total phenolic content, colour, texture and microstructure of Apple (var. *Granny Smith*), slices. *Food Chemistry*. P. 51-59.
- Voidarou, C., Alexopoulos, A., Plesas, S., Karapanou, A., Mantzourani, I., Stavropoulou, E., Fotou, A., Tzora, A., Skoufos, I., Bezirtzoglou, E. 2011. Antibacterial activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Anaerobe*. P. 375-379.
- Wang, X.H., Gheldof, N., Engeseth, N.J. 2006. Effect of processing and storage on antioxidant capacity of honey. *Journal of Food Science*. P. 96–101.

- Weston, R.J., 2000. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. *Food Chemistry*. P. 235–239.
- Weston R.J., Mitchell K.R., Allen K.L. 1999. Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey, *Food Chemistry*. P. 295-301.
- White. 2005. Honey: A modern wound management product, *Journal of Tissue Viability*. P. 34.
- White, J.W., 1975. Composition of honey. *A Comprehensive Survey*. Crane, Russak & Company, New York. P. 1.
- White, J.W., Subers M.H., Schepartz A.I. 1963. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects*. P. 57-70.
- World, M.A., Padilla-Zakour, O.I., Worobo, R.W. 2004. Growth inhibition of food borne pathogens and foods spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal of Food Microbiology*. P. 1-8.
- Yamaguchi, T., Katsuda, M., Oda, Y., Terao, J., Kanazawa, K., Oshima, S., 2003. Influence of polyphenol and ascorbate oxidases during cooking process on the radical-scavenging activity of vegetables. *Food Science and Technology Research*. P. 79–83.
- Yamaguchi, T., Mizobuchi, T., Kajikawa, R., Kawashima, H., Miyabe, F., Terao, J., 2001. Radical-scavenging activity of vegetables and the effect of cooking on their activity. *Food Science and Technology Research*. P. 250–257.
- Zamora M, y Chirife J., 2004. Determination of water activity change due to crystallization in honeys from Argentina; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) Rivadavia 1917, Buenos Aires Argentina. *Food Control*. P. 59-64.

Zanchi, D., Poulain, C., Konarev, P., Tribet, C., & Svergun, D. I., 2008. Colloidal stability of tannins: Astringency, wine tasting and beyond. *Journal of Physics Condensed Matter*. P. 494224.

Zanchi, D., Vernhet, A., Poncet-Legrand, C., Cartalade, D., Tribet, C., Schweins, R., 2007. Colloidal dispersions of tannins in water–ethanol solutions. *Langmuir*. P. 9949–9959.

## 11 ANEXOS

### Anexo I

**XV CONGRESO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS,  
REALIZADO EN EL PARANINFO DE LA UNIVERSIDAD DE COLIMA, COL.  
DEL 23 Y 24 DE MAYO DE 2013**

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DE DIFERENTES MIELES MULTIFLORALES  
DEL ESTADO DE HIDALGO**

Basilio Cortes U. A.<sup>a</sup>, Pimentel Gonzales D.J.<sup>a</sup>, Quintero Lira A.<sup>a</sup>, Piloni-Martoni J.<sup>a</sup>, Figueira A.C.<sup>b</sup> y Campos Montiel R.G.<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo – UAEH, Av. Universidad km. 1, Rancho Universitario C.P. 43600, Tulancingo, Hgo., Méx.

<sup>b</sup> Instituto Superior de Ingeniería Alimentaria, Universidad de Algarve, C.P. 8000, Faro, Algarve, Portugal.  
\* ragcamposm@gmail.com.

### RESUMEN

Se determinó la actividad antibacteriana, de cinco mieles multiflorales del Estado de Hidalgo. Se recolectaron mieles de Acaxochitlán (AC), Arenal (AR), Comercial (CO), Huehuetla (HU), Orizatlán (OR) y Tasquillo (TA) y como control una miel comercial. Las determinaciones se realizaron por medio de bioensayos por el método de vertido en placa, utilizando las siguientes cepas patógenas *Salmonella sp.*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphilococos aureus*, Todas las mieles mostraron actividad antibacteriana contra *Salmonella sp* con la concentración del 85%, mientras en las otras cepas se encontró un efecto inhibitorio. En todas cepas se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las mieles. En *B. subtilis* todas las mieles tuvieron un efecto mayor al 99% excepto la miel CO. En *E coli* la miel de TA con una concentración del 85% tuvo un efecto del 91%. y en *S. aureus* los mejores resultados los obtuvieron las mieles de AC y CO cercana del 64% de inhibición. Los resultados revelaron que las mieles multiflorales de las diferentes zonas del estado de Hidalgo tuvieron un efecto diferente con cada una de las bacterias patógenas.

## ABSTRACT

Antibacterial activity was determined from five multifloral honeys of the State of Hidalgo. The honeys were collected from Acaxochitlán (AC), El Arenal (AR), Huehuetla (HU), Orizatlán (OR) and Tasquilo (TA).and how control commercial honey Determinations were performed by bioassays by pour plate method using the following pathogenic bacteria: *Salmonella sp.* *Escherichia coli* *Bacillus subtilis*, *Staphilococos aureus*, All honeys showed antibacterial activity against *Salmonella sp* with concentration of 85%, while in the other pathogenic bacteria had an inhibitory effect. In all pathogenic bacteria were significant differences ( $p < 0.05$ ) between the honeys. In *B. subtilis* all had a 99% inhibitory effect except CO honey. In *E coli* TA honey with 85% concentration had an effect inhibitory of 91%. and *S. aureus* obtained the best results with honeys AC and CO near the 64% inhibition. The results revealed that honeys from different multifloral origins of the state of Hidalgo shown to have different effect on each pathogenic bacteria.

## PALABRAS CLAVE

*Salmonella sp*, *B. Subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*.

## ÁREA

Microbiología y Biotecnología.

## INTRODUCCIÓN

La miel es producida por abejas (*Apis mellifera L.*) que recogen el néctar de distintas especies de flores que se encuentran en cada región de donde se recolecto cada muestra ya que el estado de Hidalgo posee una variedad de ecosistemas enriquecidos con climas y vegetaciones multiflorales propias de cada zona dando mieles con características distintas, por lo que es importante caracterizarlas y determinar su efecto antibacteriano. Varios estudios demuestran que un gran número de hierbas medicinales y aromáticas, así como de frutas y

hojas de algunas plantas biosintetizan sus compuestos fitoquímicos que poseen actividad antioxidante y antibacteriana (Jawanmardi *et al.*, 2002).

La mayoría de estas plantas son utilizadas por las abejas para recoger néctar de miel, en consecuencia componentes bioactivos de origen vegetal puede ser transferido a la miel (Baltrusaityte *et al.*, 2007). La composición, la actividad antioxidante y antibacteriana de la miel dependen de la fuente floral que utiliza para recoger el néctar, factores estacionales y climáticos, así como el procesamiento también puede tener un efecto sobre las propiedades de la miel (Al-Mamary *et al.*, 2002).

Se ha reportado que la miel tiene la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano por las propiedades que esta confiere contra las bacterias patógenas de alimentos (Taormina *et al.*, 2001) además que las bacterias exhiben sensibilidad a diferentes tipos de miel. Algunos, tales como *S. aureus* (Estevinho *et al.*, 2008). Por los que se han estudiado algunas bacterias patógenas como *E. coli*, *salmonella sp.*, *s. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, para observar que comportamiento tienen sobre la miel, ya que puede tener la propiedad de antibacteriano o de inhibición en el desarrollo de cada cepa. (Taormina *et al.*, 2001; Estevinho *et al.*, 2008).

En el presente estudio se investigó el efecto inhibitorio y antibacteriano de diferentes mieles recolectadas en distintas zonas del Estado de Hidalgo contra cuatro cepas patógenas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### Muestras de miel

Las muestras de miel procedentes de diferentes zonas geográficas del Estado de Hidalgo México, se recolectaron entre los meses de Sep-Nov de 2012, empezando por el municipio de Orizatlán donde predomina un clima cálido húmedo, Acaxochitlán teniendo un clima templado subhúmedo, El Arenal con un clima

semiseco, mientras que en Tasquillo abunda un clima seco y semiseco, finalmente en el municipio de Huehuetla se tiene un clima templado húmedo.

#### Recolección de muestras de miel

Para la recolección de cada muestra específica se obtuvo a través de una revisión de la distribución geográfica así como también climática de cada zona, para así tener una variedad de muestras con propiedades distintas, ya que el estado de Hidalgo tiene una gran variedad de ecosistemas.

#### Actividad antimicrobiana e inhibición bioensayos

La actividad antimicrobiana e inhibición de las diferentes muestras de miel del estado de Hgo. Méx. se ensayaron mediante el uso de extractos de solución salina fisiológica de concentraciones de 55%, 70% y 85% contra cuatro microorganismos patógenos los cuales se utilizaron para ver el efecto antibacteriano inhibitorio contra las muestras de miel del estado de Hidalgo: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphilococos aureus*, *Salmonella sp.*

Para la activación de cada microorganismo se utilizó caldo nutritivo y se llevó a incubar a 37°C por periodos distintos de tiempo para cada cepa hasta obtener una concentración de  $10^6$ - $10^7$  ufc/ml final. Se prepararon los medios de cultivo específicos para *Escherichia coli*, *Staphilococos aureus*, *Salmonella sp*, mientras que para *B. subtilis* se utilizó agar nutritivo en cajas Petri (6 cm de diámetro). Las cajas se dejan solidificar a temperatura ambiente (20°C). Los extractos se prepararon con una solución salina estéril (control), 55%, 70% y 85% concentraciones esterilizadas con solución salina (.85%) después se realizaron las diluciones y se sembró (25µL) para llevar a incubación por un periodo de 18-24h en posición invertida, para finalmente realizar conteo en placa.

### Análisis estadístico

Todos los bioensayos microbiológicos se llevaron a cabo por duplicado y los datos se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar. Se utilizó un diseño factorial, los cuales tenemos dos factores el origen de cada muestra y el tipo de concentración de cada extracto los resultados obtenidos se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA), y se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) por lo que se utilizó la técnica de comparación de medias Tukey.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se observa en el bioensayo para *Salmonella sp.* en la Fig. 1. al tener una mayor concentración de miel incrementa la actividad antibacteriana. En este caso se obtuvo una actividad antibacteriana por encima del 99.9%. En cuanto al tipo de miel se observó que la muestra de Orizatlán tuvo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con referente a las demás mieles, ya que fue la que obtuvo menor actividad antibacteriana. Estos resultados son similares a los ya reportados (Gamboa *et al.*, 2009) donde se muestra la cepa de *Salmonella sp.* Tiene actividad antibacteriana por mieles de distintas regiones de Colombia con abejas sin aguijón a concentraciones de 45% y 90%.

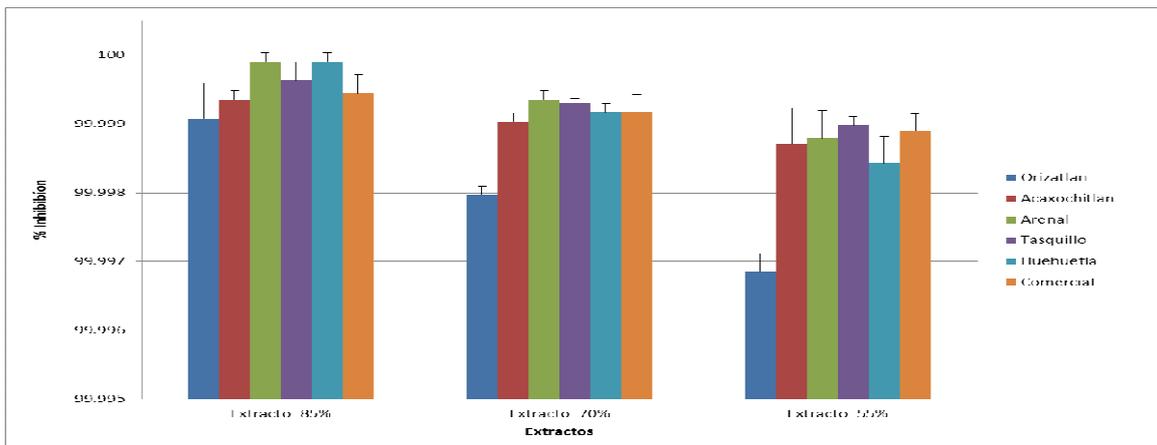


Fig. 1. Efecto inhibitorio de diferentes mieles en el crecimiento de *Salmonella sp.*

Se observa en el bioensayo de *B. subtilis* en la fig. 2. los resultados son similares al bioensayo de *Salmonella sp.* pero en este caso se obtuvo un efecto de inhibición, con una diferencia en la que se encontró inhibiciones mayores al 99.5% en los extractos del 85% de miel, siendo así la miel de Tasquillo y la Comercial resultaron con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) con respecto a las demás, con un porcentaje de inhibición menor. Estos resultados son similares a los ya reportados (Silici *et al.*, 2009) donde se muestra la bacteria de *B. subtilis* que es inhibida por mieles que fueron recolectadas en distintos sitios de Turquía, con concentraciones de 50% y 70%.

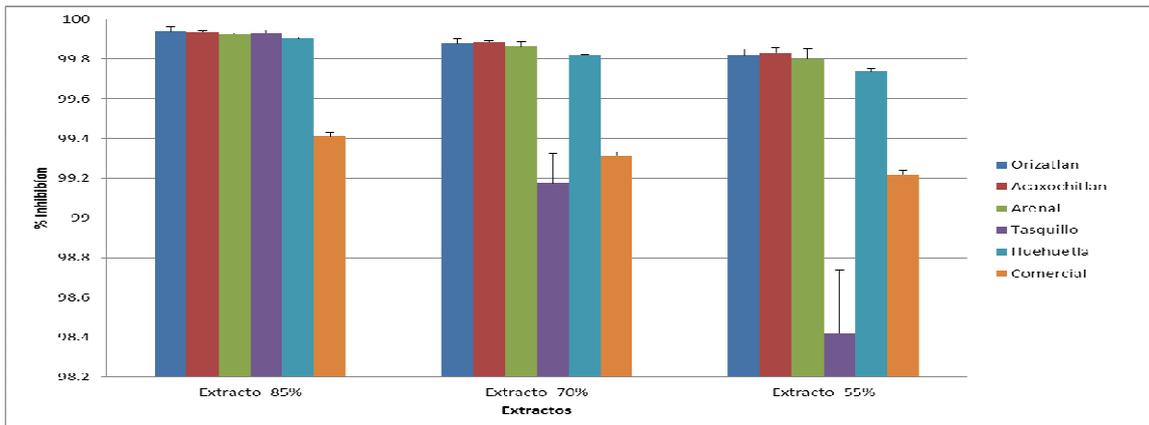


Fig. 2. Efecto inhibitorio de diferentes mieles en el crecimiento de *B. subtilis*.

En cuestión con el bioensayo de *E. coli* las mieles presentaron un efecto de inhibición menor al 91% como se observa en la Fig. 3 encontrando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las distintas muestras de miel. Observando que la muestra de miel de Tasquillo tuvo la mayor inhibición de casi un 91% a la concentración del 85% con respecto a la demás muestras, en cuanto a las muestras de Huehuetla y El Arenal que fueron las que obtuvieron menor inhibición cerca del 84% con concentración del 85%. Los resultados obtenidos son similares a los reportados por (Voidarou *et al.*, 2011) donde *E. coli* demostró resistencia al ser tratada con distintas muestras de miel, obteniendo inhibición a concentraciones del 50% y 75% en mieles provenientes de coníferas, cítricos, tomillo y multifloral.

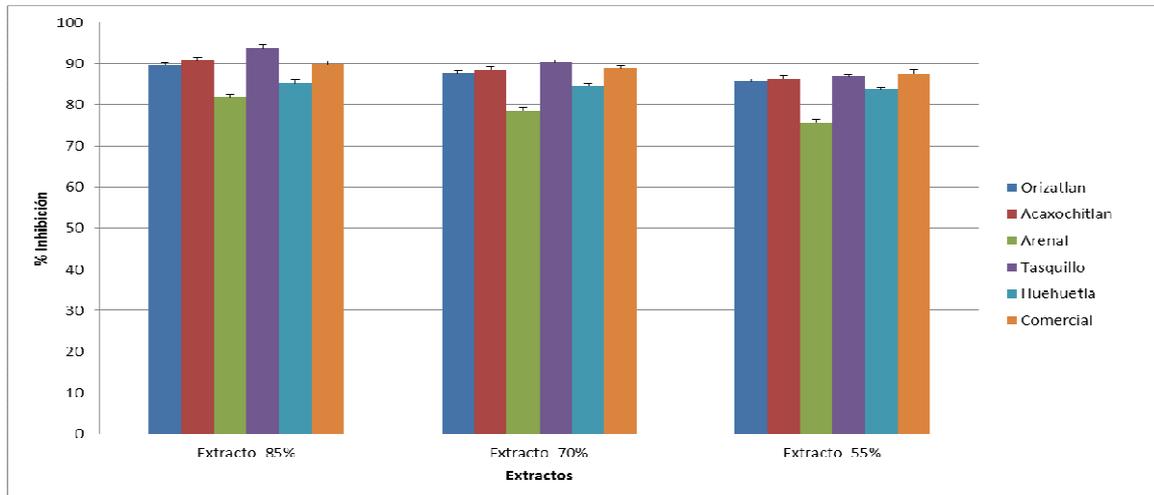


Fig. 3. Efecto inhibitorio de diferentes mieles en el crecimiento de *E. coli*.

Para lo que fue el bioensayo de *S. aureus* su comportamiento con las diferentes muestras de miel fue diferente con respecto a las cepas de *Salmonella sp.* y *B. subtilis*. Como se observa en la Fig. 4. *S. aureus* tuvo efecto inhibitorio por debajo del 65%. Encontrando diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las diferentes muestras de miel. Se observó la mayor inhibición con las muestras Comercial y Acaxochitlan con efectos inhibitorias cercanos al 64% mientras las menores inhibiciones las tuvo Orizatlán y Tasquillo (Cercanos al 20% de inhibición). Esto se corrobora con lo reportado por (Gamboa *et al.*, 2009; Silici *et al.*, 2009) de distintas mieles recolectadas de diferentes regiones de Colombia y Turquía que tienen un efecto inhibitorio menor con la bacteria *S. aureus* en comparación de *Salmonella sp.* y *B. subtilis*. en concentraciones mayores del 50%.

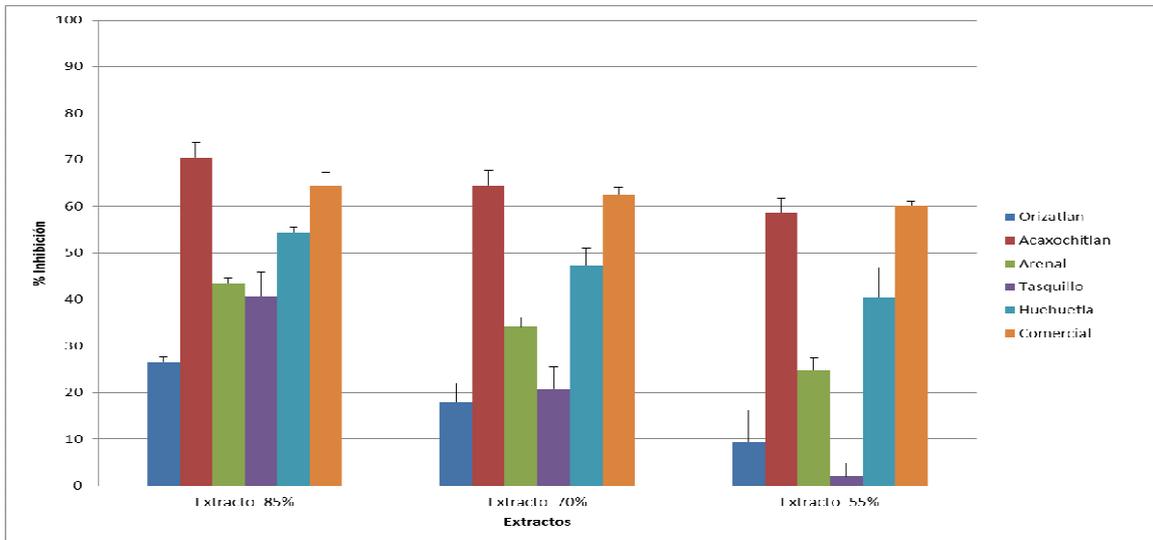


Fig. 4. Efecto inhibitorio de diferentes mieles en el crecimiento de *S. aureus*.

Las muestras de miel frente a *Salmonella* sp. mostraron una actividad antibacteriana, mientras que ante las demás cepas mostraron actividad de inhibición donde *B. Subtilis* obtuvo la mayor inhibición mientras que en *S. aureus* y *E. coli* O157: H7, tuvieron una menor inhibición ante las muestras de miel.

### CONCLUSIONES

Las mieles multiflorales de diferentes zonas del estado de Hgo. México tuvo un efecto antibacteriano o inhibitorio en las bacterias patógenas utilizadas en los bioensayos. Con un efecto diferente dependiendo de la miel y el microorganismo probado.

### AGRADECIMIENTO.

Este proyecto fue financiado parcialmente con los recursos de la Maestría en Ciencia de los Alimentos de la UAEH del PIFI 2012.

### REFERENCIAS

Al-Mamary et al., 2002. M. Al-Mamary, A. Al-Meer, M. Al-Habori Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey *Nutrition Research*, 22 (2002), pp. 1041–1047.

Baltrusaityte V., Baltrusaityte, P.R. Venskutonis, V., 2007. Ceksteryte Radical scavenging activity of differential floral origin honey and beebread phenolic extracts Food Chemistry, 101 (2007), pp. 502–514.

Estevinho, L., Prereira, 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. EU, 2001. Council Directive 2001/110 relating to honey. Official Journal of the European Communities.

Gamboa M.V., Figueroa J., 2009. Poder antibacterial de *Tetragonisa angustala*, valorada por concentración mínima inhibitoria 97-106. Universidad Nacional de Colombia, Cr. 30 N.º 45-03, Bogotá, Colombia.

Jawanmardi et al., 2002. J. Jawanmardi, A. Khalighi, A. Kashi, H.P. Bais, J.M. Vivanco. 2002. Chemical characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) found in local accessions and used in traditional medicines in Iran Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50 (21) (2002), pp. 5878–5883.

Silic S., Sagdic O., Ekici L., 2009. Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of *Rhododendron* honeys. Food Chemistry 121 (2010) 238-243.

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.

Voidarou, C., Alexopoulos, A., Plesas, S., Karapanou, A., Mantzourani, I., Stavropoulou, E., Fotou, A., Tzora, A., Skoufos, I., Bezirtzoglou, E. 2011. Antibacterial activity of different honeys against pathogenic bacteria. Anaerobe 17 (2011) 375-379.



La Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Colima,  
 La Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad  
 Autónoma de Nuevo León y la División Ciencias de la  
 Vida de la Universidad de Guanajuato

Otorgan la presente

## **CONSTANCIA**

A

**Basilio Cortes U. A., Pimentel Gonzales D.J., Quintero Lira A., Piloni-  
 Martoni J., Figueira A.C. y Campos Montiel R.G.**

Por su participación con el trabajo:

“EFECTO ANTIBACTERIANO DE DIFERENTES MIELES  
 MULTIFLORALES DEL ESTADO DE HIDALGO” en el marco del XV  
 Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos

*Colima, Col., 23 y 24 de Mayo de 2013*

*M. C. Daniel Jaramillo Cano*  
 Director de la FCQ

*Dra. Ma. Gpe. De Jesús Alanís Guzmán*  
 Jefe del Depto. de Alimentos, FCB

*Dr. Gerardo Martínez Soto*  
 Director del Depto. de Alimentos, DICIVA

Este documento quedó registrado en la Dirección General de Educación Continua en  
 Libro: 1 foja: 80. Colima, Col., México; 24 de mayo de 2013.  
 Registro STPS: R6UCO-6209190013

## Anexo II

### V CONGRESO INTERNACIONAL BIOLÓGICO Y AGROPECUARIO, REALIZADO EN LA CIUDAD DE TUXPAN DE R. CANO, VERACRUZ DEL 25 AL 27 DE SEPTIEMBRE DE 2013.

#### Efecto de la temperatura sobre diferentes mieles multiflorales del Estado de Hidalgo en su actividad antibacteriana

Basilio-Cortes U. A.<sup>a</sup>, Pimentel-Gonzales D.J.<sup>a</sup>, Quintero-Lira A.<sup>a</sup>, Hernández-Fuentes A.D.<sup>a</sup>, Figueira-A.C.<sup>b</sup>. y Campos-Montiel R.G.<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo – UAEH, Av. Universidad km. 1, Rancho Universitario C.P. 43600, Tulancingo, Hgo., Méx.

<sup>b</sup> Instituto Superior de Ingeniería Alimentaria, Universidad de Algarve, C.P. 8000, Faro, Algarve, Portugal.  
\* ragcamposm@gmail.com.

#### RESUMEN:

Se determinó el efecto de la temperatura en la actividad antibacteriana de cinco mieles multiflorales del estado de Hidalgo. Se recolectaron mieles de Acaxochitlán (AC), Arenal (AR), Huehuetla (HU), Orizatlán (OR) y Tasquillo (TA). Las determinaciones se realizaron por medio de bioensayos en los cuales se tenía una concentración inicial de  $10^6$  -  $10^7$  UFC/mL de las bacterias patógenas (*Salmonella sp.*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*) determinando la eliminación por el método de un vertido en placa. Todas las mieles fueron sometidas a diferentes temperaturas (40, 50, 60, 70 y 80°C). Se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el comportamiento de las diferentes mieles con respecto a la temperatura. En *Salmonella sp.*, se encontró un efecto lineal en todas las mieles, al incrementar la temperatura va descendiendo su actividad antibacteriana. Para *B. subtilis* y *P. aeruginosa* el comportamiento de las mieles AR, TA y HU fue de forma lineal, al incrementar la temperatura desciende su actividad antibacteriana mientras las mieles de OR y AC su comportamiento fue cuadrático en donde a los 60°C se encuentra la mayor actividad antibacteriana. En cuanto a *L.*

*monocytogenes* las mieles AC, AR, HU y OR se comportaron de forma cuadrática con una mayor actividad antibacteriana a los 60°C, pero en la miel de TA se obtuvo un efecto lineal. Los resultados revelaron que las mieles se comportan de una manera diferente (lineal o cuadrática) al ser sometidas a diferente temperatura y dependiendo de la bacteria patógena que estén eliminando.

