

Actividad antioxidante y antimicrobiana de mieles monoflorales de plantas nativas chilenas

[Antioxidant and antimicrobial activity of unifloral honeys of plants native to Chile]

Gloria MONTENEGRO, Francisca SANTANDER, Claudia JARA, Gabriel NUÑEZ & Carolina FREDES

Departamento de Ciencias Vegetales, Facultad de Agronomía e Ingeniería, Pontificia Universidad Católica de Chile
Contactos / Contacts: Carolina FREDES - E-mail address: cpfredes@uc.cl

Abstract

Chile has a great diversity of endemic and native species which gives floral origin to honey. Due the diversity of unifloral and multifloral honey previously identified it would be necessary to have information about the antioxidant content and biological activity. The objective of this study was to determine total phenols, antioxidant activity (DPPH and FRAP methods) and biological activity of unifloral honeys of native plants from Chile. For this purpose 59 beehoneys of different geographical origin were analyzed by melisopalinological method to determine the pollen present. Antimicrobial activity was tested against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes* determining minimal bactericidal concentration (MBC). Results indicate that Chilean native honeys showed significant differences in their antioxidant as well as biological activity, which depends on the botanical and geographical origin, and it can be associated with polyphenol content.

Keywords: Antioxidant, biological activity, honey, Chile.

Resumen

Chile presenta una gran diversidad de especies vegetales endémicas y nativas que pueden dar origen a mieles producidas por *Apis mellifera*. En base a la diversidad de mieles poliflorales y monoflorales que han sido identificadas anteriormente en Chile, se propuso estudiar la actividad antioxidante y biológica para controlar el crecimiento de microorganismos patógenos. El objetivo de este estudio fue determinar el contenido de fenoles totales, actividad antioxidante (Métodos de FRAP y DPPH) y la actividad antibacteriana de mieles monoflorales de plantas nativas chilenas. Se utilizaron 59 mieles de diferente origen geográfico para determinar su origen botánico, mediante análisis melisopalínológico. La actividad antibacteriana se evaluó contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, determinando la concentración mínima bactericida (CMB). Los resultados indicaron que las mieles nativas de Chile muestran diferencias significativas tanto en la actividad antioxidante como en la actividad contra patógenos, la que depende del origen botánico y geográfico, pudiendo estar asociada al contenido de polifenoles.

Palabras Clave: Antioxidante, actividad biológica, miel, Chile.

Recibido | Received: 10 de Septiembre de 2012.

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 15 de Noviembre de 2012.

Publicado en línea | Published online: 30 de Mayo de 2013.

Declaración de intereses | Declaration of interests: Proyecto FONDECYT 1110808 (G. Montenegro).

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: G Montenegro, F Santander, C Jara, G Nuñez, C Fredes. 2013. Actividad antioxidante y antimicrobiana de mieles monoflorales de plantas nativas chilenas. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 12 (3): 257 – 268.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con el Codex Alimentarius, la miel es una sustancia dulce natural producida por abejas (*Apis mellifera*) a partir del néctar de las flores, de secreciones de partes vivas de éstas o de excreciones de insectos chupadores de plantas y que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, las cuales depositan, deshidratan, almacenan y dejan en el panal, para que madure y añeje (Codex Stan 12, 1981). Los azúcares y el agua representan los componentes químicos principales de la miel (> 95%); entre los primeros, fructosa (38%) y glucosa (31%) son los constituyentes principales. Las proteínas, aldehídos aromáticos, ácidos carboxílicos aromáticos y sus ésteres, carotenoides degradados, terpenoides, compuestos fenólicos y otros, también son parte de la composición de la miel natural y contribuyen a su sabor (Muñoz et al., 2007). La composición de la miel es variable y depende de las condiciones regionales y climáticas, y del tipo de flores visitadas por las abejas (Fredes, 2004; Muñoz et al., 2007; Fredes y Montenegro, 2006). La calidad de la miel es principalmente determinada por sus características químicas, sensoriales, físicas y microbiológicas (Alvarez-Suarez et al., 2010).

Algunas características reconocidas de la miel son su capacidad antioxidante y su actividad antimicrobiana. Muchos autores han demostrado que la miel sirve como fuente natural de antioxidantes (Kucuk et al., 2007; Al-Mamary et al., 2002; Aljadi et al., 2004) y que al ser consumida puede mejorar las defensas contra el estrés oxidativo (Van der Berg et al., 2008). Los compuestos fenólicos, como los ácidos aromáticos y los flavonoides, presentes en las plantas, son considerados como los causantes del efecto antioxidante y la capacidad antiradicalaria de la miel (Burda et al., 2001).

Por otra parte, la miel también ha sido utilizada como un remedio tradicional contra infecciones microbianas desde tiempos antiguos (Molan, 1992), inhibiendo el crecimiento o destruyendo algunos patógenos (Chick et al., 2001). La actividad antimicrobiana de la miel se atribuye a su alto contenido de azúcar, a la osmolaridad, al pH, a la producción de peróxido de hidrógeno y a la presencia de otros componentes fitoquímicos, que guardan relación con las especies vegetales que las abejas pecorean como fuente de néctar (Cooper, 2007).

Existen escasos antecedentes de la actividad antioxidante y antimicrobiana de las mieles de especies nativas chilenas. Muñoz et al. (2007)

evaluaron fenoles totales y capacidad antioxidante de mieles chilenas de diferente origen, encontrando que el contenido de fenoles se correlaciona con la actividad antioxidante; sin embargo, esta correlación resultó ser baja, probablemente por el uso de miel entera y no de un extracto de ésta. Por otro lado, Montenegro et al. (2009) determinaron que mieles de quillay (*Quillaja saponaria* Molina -Quillajaceae-) son capaces de inhibir el crecimiento de ciertos patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, y *Streptococcus β* hemolítico.

Chile central es un “hotspot” de biodiversidad; tiene alrededor de 1.605 plantas endémicas, que equivalen al 0,5% de las 300.000 especies de plantas descritas mundialmente. Esto se traduce en que el 46,8% de las plantas descritas en Chile sean endémicas (Myers et al., 2000).

La flora nativa fue utilizada por los habitantes prehispánicos con fines diversos, entre los cuales estuvo el uso alimenticio, combustible, religioso, ornamental, cestería, tintóreo y medicinal. La tradición de uso medicinal de las plantas chilenas por las poblaciones nativas ha quedado registrada en crónicas de los colonizadores quienes, a su vez, la enriquecieron con el aporte de las plantas medicinales provenientes de Europa y otras regiones (Massardo y Rossi, 1996). Los libros de la medicina naturista muestran que el uso medicinal de las plantas nativas de Chile incluye un amplio espectro de afecciones y prácticas curativas (Rozzi y Massardo, 1994a; Rozzi y Massardo, 1994b).

La miel se ha utilizado tradicionalmente como endulzante en postres y bebidas como infusiones o leche, como también en la medicina (Orzaez et al., 2002; Edelsztejn, 2011; Sacchi et al., 2007; Paul et al., 2007).

Dentro de las mieles chilenas se destaca el origen en especies endémicas como el corontillo (*Escallonia pulverulenta* ([Ruiz et Pav.] Pers. - Escalloniaceae-) y quillay en la zona centro-norte y central del país, y nativas como el ulmo (*Eucryphia cordifolia* Cav. -Eucryphiaceae-), en la zona sur (Montenegro, 2002; Montenegro et al., 2003; Montenegro et al., 2010a; Montenegro et al., 2010b).

Debido a que la miel hereda las propiedades de la planta que la origina, se esperaría encontrar mieles con contenidos muy diferentes de antioxidantes y de actividad biológica muy variada. Frente a esto, el objetivo de este estudio fue cuantificar el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante (métodos DPPH y FRAP) y la actividad biológica (mínima

concentración inhibitoria del crecimiento de bacterias y bactericida) de mieles monoflorales de especies nativas chilenas durante una temporada de producción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de mieles monoflorales de especies nativas chilenas (MENC)

Preliminarmente, se analizaron 59 muestras de mieles de orígenes geográficos distintos, provenientes de la V

a la X regiones, durante la temporada 2010-2011 (Figura 1). Todas las muestras de miel estaban en un estado de cosecha adecuado, como lo indica el Codex Alimentarius (Codex Stan 12, 1981). El origen botánico de las muestras fue determinado mediante análisis melisopalinológico de acuerdo con el protocolo descrito por Loveaux (1978), adaptado por Montenegro *et al.* (2002, 2003), siguiendo la norma NCH 2981.OF2005 (Montenegro *et al.*, 2008).



Figura 1

Mapa Regional de Chile, los puntos indican las localidades de origen de las muestras de miel

De acuerdo con el análisis melisopalinológico, se obtuvieron 9 mieles MENC, equivalente al 15% de las muestras miel.

El origen botánico (porcentaje de especie predominante) y el origen geográfico (Región/Localidad) de las mieles MENC de la temporada 2010 - 2011 se detallan en la Tabla 1.

Análisis de antioxidantes (fenólicos)

Preparación de extractos y diluciones de miel

La preparación de los extractos metanólicos de mieles se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Ferreres *et al.* (1994) y adaptado por Montenegro *et al.* (2009), en que 50 g de miel se diluyeron en 250 mL de agua destilada acidificada con HCl (pH = 2). La solución se pasó por una columna de amberlita XAD-2

(250 mm de ancho por 20 mm de diámetro), a una velocidad de goteo de 2 mL/min, previo filtrado de la solución. La columna se lavó con 100 mL de agua destilada ácida, desechando el líquido. Este lavado se repitió dos veces y el tercero fue realizado con 200 mL de metanol puro (p.a), de manera que este eluyera los compuestos fenólicos de la columna. El metanol se colectó en un vaso o matraz limpio y se traspasó a un balón para rotavapor de 500 mL; esta solución metanólica se concentró hasta sequedad en rotavapor a 35 °C y el residuo se resuspendió en 8 mL de una solución metanol:agua (1:1). Para el caso de mediciones microbiológicas, con el método de doble microdilución, se resuspendió en 4 mL de agua destilada, y el líquido obtenido se filtró con filtro de jeringa de 0,45 µm y se colocó en un vial de vidrio.

Tabla 1
Origen botánico (OB) y geográfico (OG) de mieles MENC durante el 2010 – 2011

N°	OB y porcentaje de especie predominante			OG Región/Localidad	Latitud
1	Ulmo (<i>Eucryphia cordifolia</i> Cav.–Eucryphiaceae-)	82	X	Chiloé	42° 36' 0.003"
2	Quillay (<i>Quillaja saponaria</i> Molina –Quillajaceae-)	63	V	Petorca-Chincolco	33° 56' 36.0954"
3	Quillay (<i>Quillaja saponaria</i> Molina –Quillajaceae-)	70	V	Petorca-Chincolco	33° 56' 36.0954"
4	Quillay (<i>Quillaja saponaria</i> Molina -Quillajaceae-)	57	V	San Felipe	32° 44' 59.9634"
5	Quillay (<i>Quillaja saponaria</i> Molina- Quillajaceae-)	45	V	Petorca-Chincolco	33° 56' 36.0954"
6	Ulmo (<i>Eucryphia cordifolia</i> Cav. -Eucryphiaceae-)	98	X	Seno de Reloncaví	41° 37' 36.2454"
7	Avellano (<i>Gevuina avellana</i> Molina –Proteaceae-)	47	VIII	Santa Bárbara	41° 30' 21.9708"
8	Tiaca (<i>Caldcluvia paniculata</i> (Cav.) D. Don –Cunoniaceae-)	88	IX	Villarrica	39° 16' 55.1928"
9	Ulmo (<i>Eucryphia cordifolia</i> Cav. –Eucryphiaceae-)	96	IX	Villarrica	39° 16' 55.1928"

Para la preparación de las diluciones de mieles se utilizó una mezcla de agua destilada y miel, la cual fue homogenizada en vortex durante 30 segundos. Para el caso de mediciones microbiológicas, la dilución se filtró con filtro de jeringa de 0,45 µm. Las diluciones se realizaron en dos concentraciones: 25 y 50% v/v, para lo cual se consideró una densidad de la miel de 1,4 g/mL. Para prevenir la fotodegradación de la glucosa oxidasa que se encuentra en la miel, dando lugar a la actividad antimicrobiana del peróxido de hidrógeno, y para evitar la pérdida de actividad del peróxido de hidrógeno durante el análisis, todas las muestras de mieles fueron almacenadas a temperatura ambiente, y las diluciones se prepararon el mismo día de las mediciones (Sherlok *et al.*, 2010).

Determinaciones de fenoles totales (FT) y actividad antioxidante (AA)

En este estudio se utilizó el método descrito por Singleton y Rossi (1965), para la obtención del contenido de FT de los extractos metanólicos (EM) y diluciones de mieles (DM) a través del uso del reactivo Folin-Ciocalteu. La absorbancia fue medida usando un espectrofotómetro (Shimadzu UV-160, Kyoto, Japan) a 765 nm. Los resultados se calcularon utilizando una ecuación de regresión de ácido gálico (20 – 200 µM) y fueron expresados como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por kg de miel (mg EAG/kg miel).

En cuanto a la determinación de AA, existen diversos métodos para ello (Gil *et al.*, 2000; Mermelstein, 2008), ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de

las estrategias más aplicadas en las determinaciones de la AA total *in vitro* de un compuesto, mezcla de antioxidantes o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radicalaria, en que la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración. Entre los métodos utilizados para ello, se encuentran: FRAP (ferric reducing activity power), TRAP (total radical-trapping antioxidant parameter), TAR (total antioxidant reactivity), TBARS (thiobarbituric acid reactive substances), radical DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidracil) y ORAC (oxygen radical absorbance capacity). El método FRAP mide la reducción del ión férrico (Fe⁺³) a ferroso (Fe⁺²) en la presencia de antioxidantes, mientras que el método radical DPPH• mide la capacidad de los antioxidantes de atrapar el radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (Meda *et al.*, 2005; Bertoncelj *et al.*, 2007).

En la presente investigación, la AA fue determinada por los métodos de FRAP (habilidad del plasma para reducir el hierro férrico) (Benzie y Strain, 1996) y del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) (Brand-Williams *et al.*, (1995). Para el método de FRAP, la absorbancia fue medida usando un espectrofotómetro (Shimadzu UV-160, Kyoto, Japan) a 593 nm y los resultados fueron expresados como milimoles de Trolox por kg de miel (mmol Trolox eq./kg miel). El reactivo DPPH se preparó disolviendo 10 mg de reactivo en 500 mL de metanol y verificando que la absorbancia fuera superior a 0,5 a 517 nm. Los resultados fueron expresados como el

EC₅₀ (concentración de la muestra necesaria para decolorar el 50% del reactivo DPPH).

El uso de los métodos de FRAP y del radical DPPH (para FT y AA), mediante espectrofotometría, responde tanto a su facilidad y rapidez de análisis, como a su validez en el estudio de los contenidos de polifenoles en mieles (Kishore *et al.*, 2011; Sarikaya *et al.*, 2009; Alvarez-Suarez *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2009; Al-Mamary *et al.*, 2002; Ruiz-Navajas *et al.*, 2011; Bertonecelj *et al.*, 2007; Meda *et al.*, 2005; Nagai

et al., 2011; Lachman *et al.*, 2010; Hussein *et al.*, 2011; Silici *et al.*, 2010; Estevinho *et al.*, 2008).

Para las diluciones de la miel se realizó previamente una curva cinética (Dawidowicz *et al.*, 2012), que mostró que el porcentaje de decoloración del reactivo DPPH no fue superior al 20%, por lo que la AA fue calculada como el porcentaje de decoloración del radical DPPH, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de decoloración (\%)} = [(Ac - As) / Ac] * 100$$

Donde Ac es la absorbancia del control y As es la absorbancia de la muestra (Hussein *et al.*, 2011). Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

Análisis antimicrobiano

Se utilizaron las bacterias: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923) y *Streptococcus pyogenes* (ISP 364-00), provenientes del Instituto de Salud Pública de Chile.

Preliminarmente, se realizó un análisis de la capacidad antimicrobiana con DM, para lo cual se utilizaron placas de petri con 25 mL de agar de soja (BBL TM Trypticase TM soy agar BD [Sparks, MD USA]), como medio de cultivo, las que fueron sembradas con tómulas estériles que fueron sumergidas en una solución bacteriana. Para la solución bacteriana, cada especie bacteriana se diluyó en suero fisiológico a una concentración de 10⁶ ufc/mL. En cada placa se realizaron tres orificios de 6 mm de diámetro donde se colocó 100 µL del extracto. Cada análisis se realizó en triplicado. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h, observándose si existió una inhibición en el crecimiento de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *S. pyogenes*, lo que se midió como milímetros de diámetro de inhibición del crecimiento bacteriano.

Además, se realizó el ensayo de la doble microdilución en serie sobre placas de ELISA (Pontino *et al.*, 2006), con el fin de estimar la concentración mínima bactericida. Para esto, se utilizó 150 µL de caldo de soja, 50 µL de solución bacteriana (5 x 10³ ufc/mL) y 150 µL de extracto de miel por orificio. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Finalmente, se realizó un subcultivo de las disoluciones de las placas ELISA en placas petri con 25 mL de agar de soja.

La concentración mínima bactericida (CMB) fue expresada en g de miel/mL de agua destilada, necesarios para provocar la muerte bacteriana.

Análisis estadístico

Para el análisis se utilizó el software estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2012), con el que se realizaron análisis de varianza para determinar la existencia de diferencias significativas entre mieles analizadas para cada parámetro evaluado. Las diferencias se determinaron mediante la prueba de Tukey (p < 0,05) y se calcularon correlaciones entre datos a través del coeficiente de correlación de Pearson.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenidos de fenoles totales y actividad antioxidantes

Las especies vegetales que predominaron en esta temporada de estudio (2010 - 2011) fueron el quillay y el ulmo, ambas especies emblemáticas de la zona central y del sur de Chile, que han sido encontradas en las mieles MENC en estudios realizados por este grupo anteriormente (Montenegro, 2002; Montenegro *et al.*, 2003; Montenegro *et al.*, 2005; Montenegro *et al.*, 2008; Montenegro *et al.*, 2009; Montenegro *et al.*, 2010a; Montenegro *et al.*, 2010b).

Las DM presentaron mayor contenido de FT y AA que en los EM, para todos los casos. Esto se debe, por un lado, a que las columnas de amberlita presentan una baja capacidad de retención de ciertos compuestos, como por ejemplo, ácido gálico y el ácido cafeico, lo que se traduce en una pérdida de estos compuestos en el extracto metanólico final (Michalkiewicz *et al.*, 2008). Por otra parte, la miel, posee una gran variedad de compuestos no fenólicos que reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, tales como: vitaminas, aminoácidos, nucleótidos y sales inorgánicas, entre otros (Everette *et al.*, 2010;

Ferreira *et al.*, 2009; George *et al.*, 2005), lo que podría también sobrestimar el contenido de FT en las DM. Por este motivo, la extracción fenólica se hace necesaria al momento de estimar el contenido de FT, aun cuando esta resina no sea 100% eficiente los valores de FT de EM son más certeros que los obtenidos en las DM.

Los contenidos de FT de las DM variaron entre 848,7 a 1814,0 mg EAG/kg de miel y la AA varió entre 0,5 y 1,26 mmol Trolox eq./kg de miel para FRAP y el porcentaje de decoloración del radical DPPH que fluctuó entre 10,15 y 43,85%.

Tabla 2
FT y la AA de las mieles MENC analizadas durante la temporada 2010-2011

	FT		FRAP		DPPH	
	DM	EM	DM	EM	DM	EM
1	849,7 a	75,2 a	0,5 a	0,1 a	10,2 a	35,0 g
2	1418,6 bc	288,2 de	1,1 bc	0,5 cd	15,2 a	10,9 ab
3	1443,2 bc	320,9 e	1,1 bc	0,6 d	13,9 a	9,2 a
4	1304,6 ab	219,7 c	0,9 b	0,3 abc	15,7 a	16,5 d
5	1814,0 c	281,2 d	1,1 bc	0,5 bcd	17,6 a	19,8 e
6	1019,4 ab	209,3 bc	0,9 b	0,3 ab	14,8 a	22,0 f
7	1357,7 bc	250,8 cd	1,3 cd	0,4 bcd	11,3 a	11,6 b
8	1256,6 ab	172,1 b	1,0 bc	0,3 abc	43,9 b	19,6 e
9	1418,9 bc	232,0 c	1,4 d	0,3abcd	15,9 a	14,4 c

FT: fenoles totales expresados en mg EAG/kg de miel; FRAP: actividad antioxidante determinada por el método FRAP expresada en mmol Trolox eq./kg de miel; EC₅₀: actividad antioxidante determinada por el método del radical DPPH expresada en como g de miel que decoloró el 50% del radical DPPH y %D: actividad antioxidante por el método DPPH expresada como porcentaje de decoloración del radical DPPH. DM: dilución miel y EM: extracto metanólico. Letras iguales en cada columna significan que no hay diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Tabla 3
Análisis de correlación de Pearson para FT, FRAP y DPPH para DM

	FT	FRAP
FT		
FRAP	0,68	
DPPH	0,09	0,09

FT: fenoles totales; FRAP: actividad antioxidante determinada por el método FRAP, DPPH actividad antioxidante determinada por método DPPH. DM: dilución miel.

La miel de quillay 5 presentó el mayor contenido de fenoles totales y actividad antioxidante, pero sin presentar diferencias significativas; por otro lado, la miel de ulmo 1 presentó el menor contenido de fenoles y la AA más baja.

Los principales factores que afectan los contenidos de polifenoles en mieles son la fuente floral (especie[s] que la origina), el ambiente (localidad y temporada de producción) y la madurez al momento de la cosecha (Kaskoniene y Venskutonis, 2010; Gheldof y Engeseth, 2002). En este estudio se controló

algunos de estos factores (una misma temporada de producción y un mismo estado de cosecha), con el fin de realizar una mejor discusión de los resultados en base al origen botánico (especie[s] que la origina) y la localidad de producción.

Por otro lado, en EM el contenido de FT varió entre 75,32 y 320,9 mg EAG/kg de miel y la AA osciló entre 0,1 y 0,59 mmol Trolox eq./kg de miel, para FRAP, y entre 9,2 y 35,0 g, para DPPH (Tabla 2). Para los contenidos de FT y AA se encontraron diferencias significativas, tanto en las diluciones de

miel como en los extractos metanólicos ($p \leq 0,0016$), acentuándose las diferencias entre muestras de EM (Tabla 2). Sin embargo, se observó que las muestras de quillay 2, 3 y 5 no presentaron diferencias significativas para la mayoría de los análisis, tanto en DM (FT, FRAP, DPPH), como en EM (FT, FRAP), lo que pudo deberse a que proceden de la misma

localidad (Petorca-Chincolco) y presentan especies acompañantes similares (*Schinus molle* y *Gentianella ottonis*); de esta manera, también se explicaría las diferencias encontradas con la miel 4, pues si bien es monofloral de quillay, proviene de otra localidad y es significativamente diferente para FT y DPPH (Tabla 2 y 4).

Tabla 4
Especies acompañantes de mieles MENC

Miel	Especies acompañantes
1	<i>Lotus pedunculatus</i> Cav. (Fabaceae) (5,6%), <i>Trifolium repens</i> L. (Fabaceae) (4,2%), <i>Luma apiculata</i> (DC.) Burret (Myrtaceae) (3,7%)
2	<i>Gentianella ottonis</i> (Phil.) Muñoz (Gentianaceae) (12,5%), <i>Eucryphia glutinosa</i> (Pet. E) Baillon (Eucryphiaceae) (4,9%), <i>Schinus molle</i> L. (Anacardiaceae) (3,1%)
3	<i>Gentianella ottonis</i> (Phil.) Muñoz (Gentianaceae) (12%), <i>Schinus molle</i> L. (Anacardiaceae) (3%)
4	<i>Trifolium pratense</i> L. (Fabaceae) (11,5%), <i>Brassica campestris</i> L. (Brassicaceae) (8,8%), <i>Medicago polymorpha</i> L. (Fabaceae) (8,1%), <i>Schinus sp.</i> (Anacardiaceae) (5,9%)
5	<i>Brassica campestris</i> L. (Brassicaceae) (18,2%), <i>Luma exsucca</i> (DC) Berg. (Myrtaceae) (9,1%), <i>Galega officinalis</i> L. (Fabaceae) (6,8%), <i>Escallonia pulverulenta</i> (Ruiz & Pav.) Pers. (Escalloniaceae) (4,3%), <i>Schinus molle</i> L. (Anacardiaceae) (3,7%)
6	*
7	<i>Luma apiculata</i> DC. Burret (Myrtaceae) (18,4%), <i>Melilotus indicus</i> (L.) All. (Fabaceae) (9,2%), <i>Echium vulgare</i> L. (Boraginaceae) (6,8%), <i>Hypochaeris radicata</i> L. (Asteraceae) (4,3%), <i>Medicago polymorpha</i> L. (Fabaceae) (3,7%)
8	<i>Weinmannia trichosperma</i> Cav. (Cunoniaceae) (3,6%)
9	<i>Lotus pedunculatus</i> Cav. (Fabaceae) (3%)

Se consideró como especies acompañantes las que presentaron sobre un 3% en análisis melisopalinológico. Entre paréntesis el porcentaje de presencia en la muestra. (*) No hay especies con más del 3% de presencia.

Se encontró una importante correlación entre el contenido de FT y AA evaluada con el método FRAP, tanto para DM como EM, lo que coincide con estudios anteriores (Lachman *et al.*, 2010; Thaipong *et al.*, 2006; Zuhair *et al.*, 2011). Por otro lado, en EM se encontró una fuerte correlación negativa entre DPPH - FRAP y DPPH - FT, lo que es esperable, debido a que los resultados del método DPPH se expresaron como EC_{50} , en que mayores valores indican una menor AA. Esta correlación no se presentó en DM, debido a que se produjo una baja capacidad de neutralizar los radicales DPPH, por lo que no se pudo medir la AA como EC_{50} , evaluándose sólo como porcentaje de decoloración, lo que podría deberse a que los compuestos fenólicos presentes en este estado se encuentren unidas a otras moléculas, como azúcares, de los que se separan durante el proceso de extracción (Kaskoniene y Venskutonis, 2010; Ferreres, 1994; Muñoz *et al.*, 2007) (Tablas 3 y 5).

Actividad antimicrobiana

El análisis preliminar de halos de inhibición en agar, realizado con las diluciones de miel, presentaron sólo cinco mieles con acción inhibitoria y la mayoría de estas diluciones (mieles 2, 3 y 4) obtuvieron efecto inhibitorio sobre la bacteria *S. aureus*. Esta bacteria siempre ha sido usada para evaluaciones microbiológicas en mieles, debido a su alta sensibilidad, que puede estar asociada a la acidez natural de la miel (Molan, 1992). Sólo las diluciones de mieles 2, 3, 4, 5 y 7 presentaron efecto inhibitorio para la bacteria *E. coli* (Tabla 6).

De acuerdo a los resultados del método de doble microdilución, la mayoría de los extractos metanólicos generaron una acción bactericida frente a los patógenos estudiados (Tabla 7). En general, el alto efecto bactericida alcanzado por estos extractos pareciera tener relación con la presencia de compuestos específicos presentes en la miel, que sólo

actuarían en ausencia de las moléculas de azúcar de ésta; sin embargo, esto se contradice con publicaciones anteriores que confirman que el alto contenido de

azúcar junto con el pH ácido serían factores que contribuyen a la actividad bactericida (Wahdan, 1998).

Tabla 5
Análisis de correlación de Pearson para FT, FRAP y DPPH para EM

	FT	FRAP
FT		
FRAP	0,87	
DPPH	-0,88	-0,79

FT: fenoles totales; **FRAP:** actividad antioxidante determinada por el método FRAP, **DPPH** actividad antioxidante determinada por método DPPH. **EM:** extracto metanólico

Tabla 6
Actividad inhibitoria de dilución de mieles MENC analizadas en la temporada 2010-2011. Medición de las zonas de inhibición bacteriana (mm de diámetro incluye el agujero de 6 mm). Concentración al 50% v/v.

Miel	Halo de Inhibición (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>
1	-	-	-	-
2	15,7	-	8	-
3	14	-	9,2	-
4	13,2	-	7,5	-
5	8,7	-	-	-
6	-	-	-	-
7	9,5	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-

Tabla 7
Actividad bactericida de extractos metanólicos resuspendidos en agua destilada de las mieles MENC analizadas durante la temporada 2010-2011

Miel	CMB			
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>
1	4,7	6,3	6,3	3,1
2	6,3	6,3	6,3	3,1
3	sa	sa	6,3	6,3
4	sa	sa	6,3	6,3
5	sa	6,3	6,3	6,3
6	6,3	6,3	6,3	6,3
7	6,3	6,3	6,3	3,1
8	6,3	3,1	3,1	3,1
9	6,3	6,3	6,3	3,1

CMB: concentración mínima bactericida expresada en g de miel por mL de agua destilada. sa: sin actividad.

La mayoría de los extractos metanólicos, mostraron una acción bactericida, para todas las bacterias evaluadas con el método de doble microdilución. Sin embargo, algunos de estos extractos no presentaron este efecto frente a los patógenos *E. coli* (miel 3, 4 y 5) y *P. aeruginosa* (miel 3 y 4), a pesar de tener el mismo origen botánico (*Q. saponaria*) y geográfico (V región), que la miel 2, que sí presentó control frente a las bacterias mencionadas.

El efecto de inhibición contra bacterias, tanto en diluciones de miel como en extractos metanólicos, en algunos casos, puede estar asociado a las compuestos fitoquímicos de las especies acompañantes de cada una de estas mieles y su reacción específica con cada patógeno (Tabla 4). Las mieles 2 y 3, evidenciaron la presencia de especies acompañantes del género *Gentianella*. Este género perteneciente a la familia de las Gentianaceae, ha sido ampliamente usado en la medicina tradicional de diferentes países (Vidari et al., 2010). Las especies de esta familia son conocidas por contener xantonas y secoiridoides como componentes característicos (Nadinic et al., 2002); a estos últimos se les atribuye actividad antimicrobiana, analgésica (Van der Sluis, 1985), hepatoprotectoras (Kondo et al., 1994), entre otras. Las mieles 5 y 7 presentaron como especies acompañantes, a especies de la familia Myrtaceae (Tabla 4). Géneros de esta familia como *Maleleuca* y *Kunzea*, son usados con propósitos medicinales y han sido descritas con propósitos antibacteriales (Silva et al., 2009). Por lo tanto, es de esperar, que otras especies de la misma familia compartan estas propiedades.

Cabe mencionar que estudios recientes indicaron que diluciones de mieles nativas chilenas de ulmo tuvieron acción inhibitoria a distintas concentraciones, contra bacterias como *P. aeruginosa* y *E. coli*. Esto no se repitió con mieles de ulmo, lo que podría deberse a que las características antimicrobianas de las mieles son debido a, entre otras cosas, a las especies acompañantes, las que varían según el año y zona, lo que explicaría las diferencias entre las muestras de un mismo origen botánico (Kucuk et al., 2007; Molan, 1992).

Este estudio confirmó que las principales mieles monoflorales de especies nativas chilenas (MENC) provienen de quillay y ulmo, además de la existencia de una gran variabilidad en el contenido de FT y AA entre las mieles de un mismo origen botánico. Si bien en este estudio se utilizaron mieles de una misma temporada, esta variabilidad podría ser

explicada por las diferentes especies acompañantes y zona geográfica de origen de la miel.

Futuros análisis de identificación de polifenoles en mieles MENC son necesarios para dar una mejor explicación de estos resultados. Por otro lado, la identificación de polifenoles en mieles de manera pormenorizada, permitiría relacionar la AA y la actividad antimicrobiana con compuestos en particular y establecer la existencia de potenciales marcadores químicos en éstas.

AGRADECIMIENTOS

Proyecto FONDECYT 1110808 (G. Montenegro). Agradecemos especialmente a Víctor Ahumada por su asistencia técnica en los análisis antimicrobianos.

REFERENCIAS

- Aljadi AM, Kamaruddin M. 2004. Evaluation of the phenolic contents and antioxidant capacities of two malasyan floral honeys. **Food Chem** 85: 513 - 518.
- Alvarez-Saurez J, Tulipani S, Díaz D, Estevez Y, Romandini S, Giampieri F. 2010. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. **Food Chem Toxicol** 48: 2490 - 2499.
- Al-Mamary M, Al-Meerri A, Al-Habori M. 2002. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutr Res** 22: 1041 - 1047.
- Benzie IFF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal Biochem** 239: 70 - 76.
- Bertoncelj J, Dobersek U, Jamnik M, Golob T. 2007. Evaluation of phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. **Food Chem** 105: 822 - 828.
- Burda S, Oleszek W. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **J Agric Food Chem** 49: 2774 - 2779.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Sci Technol** 28: 25 - 30.
- Chick H, Shin HS, Ustunol Z. 2001. Growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria grown in skim milk containing honey. **J Food Sci** 66: 1365 - 2621

- Codex Stan 12. 1981. **Codex Standard for Honey** Codex Stan 12-1981, Rev. 1 (1987), Rev. 2 (2001).
- Cooper R. 2007. **Honey in wound care: antibacterial properties.** Medizinischer Honig in der Wundbehandlung: antibakterielle Eigenschaften. GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär 2 (2):Doc 51.
- Dawidowicz A, Wianowska D, Olszowy M. 2012. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). **Food Chem** 131: 1037 - 1043.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. 2012. **InfoStat versión 2012.** Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar> [Consultada el 9 de Diciembre de 2012]
- Edelsztein V. 2011. Los remedios de la abuela, mitos y verdades de la medicina casera (colección ciencia que ladra). Ed. Siglo Veintiuno, Buenos Aires, Argentina.
- Estevinho L, Pereira AP, Moreira L, Dias LG, Pereira E. 2008. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolics compounds extracts of Northeast Portugal honey. **Food Chem Toxicol** 46: 3774 - 3779.
- Everette JD, Bryant QM, Green AM, Abbey YA, Wangila GW, Walker RB. 2010. Thorough study of reactivity of various compounds classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. **J Agric Food Chem** 58: 8139 - 8144.
- Ferreira ICFR, Aires E, Barreira JCM, Estevinho LM. 2009. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. **Food Chem** 114: 1438 - 1443.
- Ferreres F, Andrade P, Tomás-Barberán F. 1994. Flavonoids from Portuguese heather honey. **Z Lebensm Unters Forsch** 199: 32 - 37.
- Fredes CP. 2004. **Relaciones entre el origen geográfico y botánico de mieles chilenas y el contenido de metales pesados.** Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Vegetales. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Universidad Católica, Santiago, Chile.
- Fredes C, Montenegro G. 2006. Heavy metals and other trace elements contents in Chilean honey. **Cienc Inv Agr** 33: 48 - 55.
- George S, Brat P, Alter P, Amiot MJ. 2005. Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. **J Agric Food Chem** 53: 1370 - 1373.
- Gheldof N, Engeseth NJ. 2002. Antioxidant capacity of honey from various floral source based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of *in vitro* lipoprotein oxidation in human serum samples. **J Agric Food Chem** 50: 3050 - 3055.
- Gil MA, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. **J Agric Food Chem** 48: 4581 - 4589.
- Hussein S, Yusoff K, Makpol S, Yusof Y. 2011. Antioxidant Capacities and Total Phenolic Contents Increase with Gamma Irradiation in Two Types of Malaysian Honey. **Molecules** 16: 6378 - 6395.
- Kaskoniene V, Venskutonis PR. 2010. Floral markers in honey of various botanical and geographic origins: a review. **Compr Rev Food Sci Food Saf** 9: 620 - 634.
- Kishore RK, Halim AS, Syazana MSN, Sirajudeen KNS. 2011. Tualang honey has higher phenolic content and greater radical scavenging activity compared with other honey sources. **Nutr Res** 31: 322 - 325.
- Kondo Y, Tacano F, Hojo H. 1994. Suppression of chemically and immunologically induced hepatic injuries by gentiopicroside in mice. **Planta Med** 60: 414 - 416.
- Kucuk M, Kolayli S, Karaoglu S, Ulusoy E, Baltaci C, Candan F. 2007. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. **Food Chem** 100: 526 - 534.
- Lachman J, Orsak M, Hejmankova A, Kovarova E. 2010. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. **LTW Food Sci Technol** 3: 52 - 58.
- Loveaux J, Maurizio A, Vorwohi G. 1978. Methods of melissopalynology by international commission for bee Botany of IUBS. **Bee World** 59: 139 - 157.
- Massardo F, Rossi R. 1996. Valoración de la biodiversidad: usos medicinales de la flora native chilena. **A y D** 3: 76-81.
- Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. 2005. Determination of the total phenolic,

- flavonoid and proline content in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chem** 91: 571 - 577.
- Mermelstein NH. 2008. Determining antioxidant activity. **Food Chem** 11: 63 - 66.
- Michalkiewicz A, Biesaga M, Pyrzynska K. 2008. Solid-Phase extraction procedure for determination of phenolics acids and some flavonols in honey. **J Chromatogr A** 1187: 18 - 24.
- Molan PC. 1992. The antibacterial activity of honey. **Bee World** 73: 59 - 76.
- Montenegro G. 2002. **Chile, nuestra flora útil. Guía de plantas de uso apícola alimentario, medicinal folclórico artesanal y ornamental.** Ed. Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.
- Montenegro G, Pizarro R, Ávila G, Gómez M, Bas F, Olivares L, Villena M, Rizzardini G, Ríos C, González L, Mujica AM. 2002. **Certificación de origen botánico de las mieles Chilenas.** Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, P. Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.
- Montenegro G, Pizarro R, Ávila G, Castro R, Ríos C, Muñoz O, Bas F, Gómez M. 2003. Origen botánico y propiedades químicas de las mieles de la Región Mediterránea Árida de Chile. **Cienc Inv Agr** 30: 161 - 174.
- Montenegro G, Pizarro R, Ávila G, Muñoz O, Mujica AM y Bas F. 2005. Determination of the botanical origin and some chemical properties of honeys from the central zone of Chile. **Phyton Sp I**: 213 - 223
- Montenegro G, Gómez M, Díaz-Forestier J, Pizarro R. 2008. Aplicación de la Norma Chilena Oficial de denominación de origen botánico de la miel para la caracterización de la producción apícola. **Cienc Inv Agr** 35: 181 - 190.
- Montenegro G, Fredes C. 2008. Relación entre el origen floral y el perfil de elementos minerales en mieles chilenas. **Gayana Bot** 61: 123 - 126.
- Montenegro G, Salas F, Peña RC, Piarro. 2009. Actividad antibacteriana y antifúngica de mieles monoflorales de *Quillaja saponaria*, especie endémica de Chile. **Phyton** 78: 141 - 146.
- Montenegro G, Rodríguez S, Vío S, Gómez M, Pizarro P, Mujica AM, Ortega X. 2010a. **Investigación científica y tecnológica en productos apícolas.** Fundación COPEC-Universidad Católica. Santiago, Chile.
- Montenegro G, Peña RC, Pizarro R. 2010b. Multivariate analysis of pollen frequency of the native species *Escallonia pulverulenta* (Saxifragaceae) in Chilean honeys. **Rev Bras Bot** 33: 615 - 630.
- Muñoz O, Copaja S, Speisky H, Peña R, Montenegro G. 2007. Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. **Quim Nova** 30: 848 - 851.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J. 2000. Biodiversity hotspot from conservation priorities. **Nature** 403: 853 - 858.
- Nadinic E, Penna C, Saavedra C, Coussio J, Gutking G, Debenedetti S. 2002. Aislamiento de los compuestos con actividad antimicrobiana de extractos de *Gentianella achalensis* (Gilg) Ho & Liu (Gentianaceae). **Acta Farm Bonaerense** 21: 123 - 130.
- Nagai T, Sakai M, Inoue R, Inoue H, Suzuki N. 2011. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. **Food Chem** 75: 237 - 240.
- Orzaez MT, De Frutos A; Tellez M, Blazquez G. 2002. Hábitos de consumo de productos apícolas en un colectivo de ancianos. **Arch Latinoam Nutr** 52: 362 - 367
- Paul IM, Beiler J, McMonagle A, Shaffer ML, Duda L, Berlin CM Jr. 2007. Effect of honey, dextromethorphan, and no treatment on nocturnal cough and sleep quality for coughing children and their parents. **Arch Pediatr Adolesc Med** 161: 1140 - 1146.
- Pontino M, Di Giulio B, Fernández C, Imperiale B, Bodon A, Morcillo N. 2006. Evaluación de un micrométodo colorimétrico para determinar la concentración mínima de drogas antituberculosas frente a *Mycobacterium tuberculosis*. **Rev Arg Microbiol** 38: 145 - 151.
- Rozzi R, Massardo F. 1994a. Las plantas medicinales chilenas II y III. **Informativos Nueva Medicina** 1 (5): 16-17.
- Rozzi R, Massardo F. 1994b. Las plantas medicinales chilenas II y III. **Informativos Nueva Medicina** 1 (6): 16 - 17.
- Ruiz-Navajas Y, Viuda-Martos M, Fernández-López J, Zaldivar-Cruz JM, Kuri V, Pérez-Álvarez JA.

2011. Antioxidant activity of artisanal honey from Tabasco, Mexico. **Int J Food Prop** 14: 459 – 470.
- Sacchi M, Hausberger M, Pereyra A. 2007. Percepción del proceso salud-enfermedad-atención y aspectos que influyen en la baja utilización del Sistema de Salud, en familias pobres de la ciudad de Salta. **Salud colectiva** 3: 271 – 283.
- Sarikaya AO, Ulusoy E, Ozturk N, Tuncel M, Kolayli S. 2009. Antioxidant Activity and phenolic acid constituents of chesnut (*Castania sativa* Mill.) honey and propolis. **J Food Biochem** 33: 470 - 481.
- Silici S, Sagdic O, Ekici L. 2010. Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys. **Food Chem** 121: 238 - 243.
- Singleton VL, Rossi Jr. JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am J Enol Vit** 16: 144 - 158.
- Silva C, Barbosa L, Demuner A, Montanari R, Pinheiro A, Dias I, Andrade N. 2010. Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils from myrtaceae species planted in Brazil. **Quim Nova** 33: 104 - 108.
- Sherlok, O, Dolan, A, Athman, R, Power, A, Gethin, G, Cowman, S, Humphreys, H. 2010. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **BMC Compl Alt Med** 10: 47.
- Thaipong K, Boonprakob U, Crosby K, Cisneros-Zevallos L, Hawkins D. 2006. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **J Food Comp Anal** 19: 669 - 675.
- Van der Sluis WG. 1985. **Secoiridoids and xanthenes in the Genus *Centaurium* Hill (Gentianaceae): a pharmacognostical study.** Tesis doctoral. Rjksuniversiteit Utrch, Belgica.
- Van der Berg AJ, van den Worm E, van Ufford HC, Halkes SC, Hoekstra MJ, and Beukelman CJ. 2008. An *in vitro* examination of the antioxidant and anti-inflammatory properties of buckwheat honey. **J Wound Care** 17: 172 - 178.
- Vidari G, VitaFinzi P. 2010. Las Gentianaceae: botánica, fitoquímica y actividad biológica. **La Granja** 11: 3 - 14.
- Wahdan H. 1998. Causes of the antimicrobial mactivity of honey. **Infection** 26: 26 - 31.
- Zuhair S, Mohd K, Makpol S, Anum Y. 2011. Antioxidant capacities and total phenolic contents increase with gamma irradiation in two types of Malaysian honey. **Molecules** 16: 6378 - 6395.