

Efecto de miel de abejas sin aguijón con ciprofloxacino frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)

Effect of stingless bee honey with ciprofloxacin against Staphylococcus aureus methicillin resistant

Eduardo Lozano-Guzmán^{1*}, José Alfonso López-García², Víctor Jesús Albores-Flores² y Julieta Grajales-Conesa²

¹ Universidad Juárez del Estado de Durango. México

² Universidad Autónoma de Chiapas. México

*elozano@ujed.mx

Resumen

La miel de abejas sin aguijón es reconocida de manera tradicional por su efecto nutracéutico y antimicrobiano; sin embargo, en los últimos años se han realizado trabajos de investigación para demostrarlo ya que existe poca información al respecto en comparación con otras especies como la *Apis mellifera*. En este estudio se evaluó el efecto de las mieles de abejas sin aguijón de tres especies nativas y su sinergia con ciprofloxacino contra dos cepas de *Staphylococcus aureus*, el testigo (ATCC) y el resistente a meticilina (SARM). Las mieles se colectaron de meliponarios ubicados en Cacaohatán (14°55'13.6"N92°10'35.7"W) y comprenden: *Melipona beecheii*, *M. solani* y *Scaptotrigona mexicana*. Para el estudio se prepararon diluciones de miel (50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, y 0.78% en relación v/v respectivamente) y de ciprofloxacino (32, 16, 8, 4, 2, 1, y 0.5 µg/ml). La actividad antimicrobiana de las mieles se evaluó de manera individual y luego en combinación con el antibiótico. Se encontró que el ciprofloxacino tiene una concentración mínima bactericida de 32 µL/ml (mientras que las mieles presentan 50% (relación v/v). La combinación de mieles y ciprofloxacino mostraron un efecto sinérgico al reducir la concentración mínima bactericida por la combinación de 5.4 mg/ml de CPX con 11 % de miel v/v.

Palabras clave

Ciprofloxacino, melipona, SARM, sinergismo.

Abstract

Honey from honey bees or stingless bees is traditionally recognized by its nutraceutical and antimicrobial effect; however, in recent years, research work has been carried out to demonstrate this,

as there is little information in this regard compared to other species such as *Apis mellifera*. This study evaluated the effect of stingless honeys of three native species and their synergy with ciprofloxacin against two strains of *Staphylococcus aureus*, the control (ATCC) and methicillin resistant (MRSA). Honeys were collected from meliponaries located in Cacahoatán (14°55'13.6"N92°10'35.7"W) and include: *Melipona beecheii*, *M. solani* and *Scaptotrigona mexicana*. Dilutions of honey (50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, and 0.78% in relation v/v respectively) and ciprofloxacin (32, 16, 8, 4, 2, 1, and 0.5 µg/ml) were prepared for the study. Antimicrobial activity of honeys was evaluated individually and then in combination with the antibiotic. It was found that ciprofloxacin has a minimum bactericidal concentration of 32 µL/ml whereas honey presents 50% (v/v ratio). The combination of honey and ciprofloxacin showed a synergistic effect in reducing the minimum bactericidal concentration by the combination of 5.4 mg/ml of CPX with 11% honey v/v.

Keywords

Ciprofloxacin, melipona, SARM, synergism.

Introducción

El desarrollo de los antibióticos ha permitido a la población tener los medios efectivos para tratar diversas infecciones, pero la aparición de resistencia a los antibióticos ha alterado los conocimientos que se tenían de estos. De acuerdo a la OMS (Organización Mundial de la Salud), los niveles de resistencia están aumentando en todo el mundo, provocando que los tratamientos contra enfermedades sean cada vez más difíciles (Abdul et al., 2020). Además de participar en una variedad de procesos de infección, *Staphylococcus aureus* también tiene una gran importancia clínica, por el aumento gradual de mutaciones (Moreno et al., 2014). Las cepas de *S. aureus* que exhiben resistencia a los β-lactámicos se denominan resistentes a la meticilina o SARM (Aguayo et al., 2018).

Los fármacos que se emplean con más frecuencia en los hospitales y con beneficios reportados contra el *S. aureus*, son las fluoroquinolonas, especialmente la ciprofloxacin (CPX) y la levofloxacin (LVX) (Choi et al., 2013; Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2010; Chacón y Rojas, 2020; Zaiss et al., 2010). Ambas se usan por su amplio espectro, su excelente biodisponibilidad, su buena absorción y su buena distribución, pero debido al uso como complemento en la alimentación del ganado (para el desarrollo de la masa muscular) y por el uso excesivo de los consumidores, entre otros factores, cada vez se hace más complicado el tratamiento de las infecciones causadas por este patógeno (Choi et al., 2013).

Por otro lado, se sabe ya con certeza que la miel proveniente de *Apis mellifera* es una alternativa natural para combatir cepas SARM pero se desconoce del comportamiento en mieles de abejas nativas o sin aguijón (producida por diversas especies eusociales). Este tipo de miel se produce en botijas de cerumen en las regiones tropicales y subtropicales del planeta, y contiene diferentes sustancias que le confieren diferentes propiedades, nutracéuticas o antimicrobianas, diferentes de la proveniente de *Apis mellifera* (Nishio et al., 2016; Grajales et al., 2018). Esta miel presenta contenidos altos de humedad, por lo tanto, fermenta más rápido y posee mayor acidez y su sabor es variable según la especie que la produce, lo cual podría ser un punto de inflexión en su composición físico-química y/o su efecto antimicrobiano (Souza et al., 2006; Zamora et al., 2015).

Un enfoque plausible para tratar las infecciones causadas por patógenos y abordar sus complejos problemas de resistencia a múltiples fármacos es aplicar el concepto de sinergia (Abdul et al., 2020; Haas et al., 2010), es decir, el uso de estos fármacos con algún otro compuesto de origen químico o natural. No existen reportes documentados de la evaluación de la actividad sinérgica de las mieles producidas por abejas sin aguijón con ciprofloxacino en bacterias resistentes. En este contexto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto *in vitro* de mieles de tres especies de abejas sin aguijón en la inhibición de las cepas SARM y sus combinaciones con CPX.

Materiales y métodos

Muestras de miel

Las mieles en estudio se adquirieron a través de la Asociación de “Meliponicultores del Soconusco S.C de R.L.” y fueron cosechadas en el municipio de Cacahoatán (14°55'13.6"N -92°10'35.7"W), de las siguientes especies; *Melipona beecheii*, *M. solani* y *Scaptotrigona mexicana*. Se colectaron 100 ml de miel de cada especie y se colocaron en frascos estériles previamente rotulados, para conservarse en refrigeración a 4°C en ausencia de luz hasta su análisis. Se usó también ciprofloxacino CEPOKAB®; de Bayer, en una solución inyectable al 0.2% y de concentración 2 mg/ml.

Cepas y preparación de inóculo

Se usó una cepa previamente identificada como SARM proveniente del cepario del laboratorio de farmacognosia de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango, la cual estuvo conservada en microtubos a -30 °C en medio Skim milk. Fue descongelada a temperatura ambiente y sembrada en placas con agar Mueller Hinton (MH) por estrías cruzadas en cuatro campos. Se incubó a 37 °C por 24 horas. Como cepa de referencia se empleó la *S. aureus* ATCC 29213, según las recomendaciones del CLSI Guidelines para los métodos de dilución.

Los inóculos se prepararon suspendiendo dos colonias previamente cultivadas, en 100 ml de caldo MH estéril. Para determinar la población del inóculo se cultivaron diluciones sucesivas en placa con agar MH. Esta población se tomó como base para calcular las concentraciones efectivas 50 como se describe posteriormente.

Estudios de inhibición y determinación de CMB

Los estudios de inhibición se realizaron por triplicado mediante el método de macro dilución seriado descrito por Taroco et al. (2006). Cada seriación se hizo por triplicado para cada una de las cepas. Se probaron por separado mieles y CPX. Un alícuota de cada tubo de cada serie fue sembrada en agar MH e incubada a 37° por 24 horas. Después se contabilizó la población de cada placa, incluyendo el inóculo y se reportó como UFC x10E⁶. Se estableció como concentración mínima bactericida (CMB o 100% de efecto) aquella concentración a la cual ya no había crecimiento detectable en placa.

Curva dosis-efecto: Se define como mortalidad a la diferencia entre la población inicial (inóculo) y la contabilizada en placa a cada concentración de antimicrobiano. Se define como efecto a la relación entre el promedio de la mortalidad de las tres repeticiones en cada concentración y la

población inicial expresada en porcentaje. La curva dosis-efecto se construye por el log de las concentraciones vs el porcentaje de efecto obteniéndose una recta, (Curva dosis-efecto) y se determinó la ecuación correspondiente. Finalmente, con dicha ecuación se calculó la concentración a la cual se obtendría el 50% de efecto siendo esta la CE50.

Las diluciones en el ensayo de cada miel fueron 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, y 0.78% en relación v/v respectivamente y de ciprofloxacino 32, 16, 8, 4, 2, 1 y 0.5 µg/ml.

Combinaciones

Para evaluar las combinaciones entre las mieles y CPX se siguió la metodología descrita por Tallarida (2001) para estudios isoblográficos. Estas combinaciones se evaluaron sólo en la cepa SARM. Esta metodología se basa en el supuesto de que al combinar dos antimicrobianos a concentración que cada uno de ellos produzca un efecto del 50%, entre los dos tendrán una inhibición al 100% (efecto simple aditivo), pero, si las combinaciones se diluyen y el efecto es el mismo, entonces se obtendría un efecto sinérgico.

Análisis de datos

Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) con los softwares Microsoft Excel® y el SPSS ver. 19.0.

Resultados y discusión

La mortalidad se basó en el efecto de inhibición que presentaron las cepas al CPX y/o a la miel de las abejas nativas incluidas en el presente trabajo. La cepa ATCC sólo sirvió como control y presentó una inhibición total ante CPX. En el caso de la cepa SARM ante CPX, la tabla 1 muestra el porcentaje de efecto obtenido. Como puede apreciarse, las concentraciones 32 y 16 mg/ml presentan una inhibición del 100%, pero a 8 mg/ml empieza a detectarse un crecimiento en los cultivos. Las diluciones de 2 mg/ml y restantes presentaron un crecimiento irrestricto, por lo que se infiere un efecto nulo en ellas.

Tabla 1.
Inhibición de SARM con ciprofloxacino

Concentración (mg/ml)	% efecto*
32	100
16	98
8	43
4	22
2	0
1	0
0.5	0

* Promedio del triplicado

La tabla 2 muestra el efecto inhibitorio de las mieles ensayadas. La miel proveniente de *M. solani* no presentó ningún efecto inhibitorio en las concentraciones ensayadas. Sin embargo, las restantes tuvieron un comportamiento muy parecido, dejando de ser totalmente efectivas a la dilución del 6.25 %.

Tabla 2.

Porcentaje de inhibición en pruebas de mieles contra SARM.

Concentración (%)	<i>M. beecheii</i>	<i>M. solani</i>	<i>S. mexicana</i>
50	100	0	100
25	98	0	90
12.5	34	0	43
6.25	0	0	0
3.125	0	0	0
1.56	0	0	0
0.78	0	0	0

Las correspondientes curvas dosis-efecto de cada antimicrobiano arrojó las CMB (100% de efecto) a 5.4 mg/ml de CPX+11% de miel *M. beecheii*; 5.4 mg/ml de CPX+11.1% de miel *S. mexicana* y 5.4 mg/ml de CPX+25% de miel *M. solani*. Con base a esto, se ensayaron las siguientes combinaciones, mostradas en la tabla 3. Debido a que *M. solani* no presentó, por sí sola, efecto inhibitorio, se combinaron las concentraciones a partir del 50%.

Tabla 3.

Porcentaje de efecto en las combinaciones.

CPX + <i>M. beecheii</i>	% de efecto	CPX + <i>S. mexicana</i>	% de efecto	CPX + <i>M. solani</i>	% de efecto
10.8 + 22	100	10.8 + 22.2	100	10.8 + 50	100
5.4 + 11	100	5.4 + 11.1	100	5.4 + 25	100
2.7 + 5	48	2.7 + 5.5	0	2.7 + 12.5	0

Para CPX las concentraciones están en mg/ml y para las mieles en %.

La combinación de CPX con miel de *S. beecheii* presenta resultados ligeramente superiores en la efectividad con respecto a la combinación con las otras dos especies de abejas nativas. Como se especificó en la metodología, las combinaciones teóricas suponen que al combinar dos CE50 el resultado sería de una inhibición del 100%, pero, al disminuir la concentración (5.4 + 11) el porcentaje de inhibición persistió. Esto es sinónimo de un sinergismo. Sin embargo, al combinar 5.4 mg/ml de CPX con 11% de miel, la inhibición al 100% persiste. Esto se repite en las demás combinaciones.

La miel de abejas melíferas de origen monofloral y polifloral contiene una cantidad variable de alcaloides y flavonoides que al combinarse con antibióticos pueden ser útiles en el tratamiento

de cepas resistentes, como lo reportado para *E. coli* por Pourahmad y Ghalamfarsa (2021) lo que explica el comportamiento detectado en nuestros resultados.

Las cepas SASM y SARM pueden ser inhibidas por mieles de abejas nativas de las especies *S. bipunctata* y *S. postica*, debido a una posible acción sinérgica de los diferentes componentes, tales como el peróxido de hidrógeno, azúcares y otros compuestos no identificados (Nishio et al., 2016). En contraste, nuestros resultados muestran que no se obtuvo una inhibición completa de la cepa de estudio, y así como en otros trabajos, las concentraciones y la especie de abeja fueron las principales directrices de este efecto (Batiston et al., 2020).

La actividad antimicrobiana no únicamente se observa en mieles sino también en propóleos contra cepas resistentes a la meticilina de *S. aureus*, por lo cual puede sugerirse un efecto conjunto de miel, propóleos o incluso polen que pudiera estar contenido en las mieles estudiadas y conferir propiedades inhibitorias (Grajales et al., 2021; Nweze et al., 2016; Wasihun y Kasa 2016). El estudio a detalle de la composición de las mieles de abejas sin aguijón es necesario ya que pueden haber diferencias de acuerdo al contenido de la actividad de péptidos o proteínas con actividad antibacteriana, tal como lo demostró Ramón et al., (2022), donde las mieles de *M. beecheii* mostraron amplio espectro antibacteriano y actividad antioxidante a través de mecanismos como agente reductor y propiedades de promotor de radicales libres.

Se han obtenido resultados similares a este trabajo al comparar mieles de *Apis mellifera* y abejas sin aguijón que van del 6.3-50% y del 3.1-25% respectivamente en la inhibición de *E.coli*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* y *C. neoformans* (Nweze et al., 2016). Esta actividad antimicrobiana dependiente de la composición fisicoquímica de las mieles de abejas sin aguijón ha quedado demostrada para *M. mondury*, *M. quadrifasciata*, *S. bipunctata*, *Tetragona clavipes* que muestran de acuerdo a la especie, diferentes grados de inhibición contra microorganismos (Topolski et al., 2020).

La prueba ANOVA no arrojó diferencias significativas entre las tres combinaciones, por lo que se infiere que tienen efectos similares.

Conclusiones

La presencia de SARM es afectada por la concentración de ciprofloxacino en combinación con las mieles ensayadas. La miel de *M. solani* no mostró efecto inhibitorio de los microorganismos por sí sola, pero de manera combinada se encontró evidencia de efecto sinérgico con CPX.

Agradecimientos

Los resultados forman parte de la Red de Colaboración de Investigadores de la Universidad Juárez del Estado de Durango y de la Universidad Autónoma de Chiapas. Los análisis se realizaron a partir de la base de datos de la Tesis de licenciatura del alumno Ronmel Vázquez Balanzar.

Referencias

Abdul, M., Hamouda, S. y Abd El Rahmn, M. (2020). Synergistic Antimicrobial Effect of Egyptian honey with antibiotics and its capability to restore MRSA sensitive to oxacillin. *CPQ Medicine* 8(3), 01-12.

- Aguayo, A., Quezada, M., Mella, S., Riedel, G., Opazo, A., Bello, H. y González G (2018). Bases moleculares de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. *Revista Chilena de Infectología*, 35(1), 7-14.
- Batiston, T., Frigo, A., Stefani, L., Da Silva, A. y Araujo, D. (2020). Physicochemical composition and antimicrobial potential of stingless honey: a food of differentiated quality. *Research Society and Development* 9(10), <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/8223/8115>
- Chacón, L. y Rojas, K. (2020). Resistencia a desinfectantes y su relación con la resistencia a los antibióticos. *Acta Médica Costarricense*, 62(1),7-12.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2010). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Twentieth Informational Supplement*, 30(1), 60-73.
- Choi, S., Kim, E. y Kim, Y. (2013). Systemic use of fluoroquinolone in children. *Korean journal of pediatrics*, 56(5), 196-201. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3668199/>
- Grajales, J., Elías, J., Lozano, E., Albores, V. y López, A. (2021). Actividad antimicrobiana de propóleos de abejas sin aguijón en combinación con ajo, *Allium sativum* (amaryllidaceae). *Revista de Biología Tropical*, 69(1), 23-35. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/41241>
- Grajales, J., Vandame, R., Santiesteban, A., López, A. y Guzmán, M. (2018). Propiedades físicoquímicas y antibacterianas de mieles de abejas sin aguijón del sur de Chiapas, México. *IBCIENCIAS*, 1(1), 1-7.
- Haas, P., Hesje, C., Sanfilippo, C. y Morris, T. (2010). Bactericidal activity of besifloxacin against staphylococci, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65,1441-1447.
- Moreno, F., Cervantes, M., López, D., Vertiz, A., Cenicerros, R. y Lozano, E. (2014). Synergistic interaction of extracts of garlic (*Allium sativum*) and propolis against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Microbiology Research*, 8(52). <https://academicjournals.org/journal/AJMR/article-full-text-pdf/7600CB649632>
- Nishio, G., Eches, M., Andrei, C., Proni, E., Takayama, R. y Nakazato, G. (2016). Antibacterial activity of honey from stingless bees *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 and *S. postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Apicultural Research*, 54(5), 452-460. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1162985>
- Nweze, J., Okafor, J., Nweze, E. y Nweze, J. (2016). Comparison of antimicrobial potential of honey samples from *Apis mellifera* and two stingless bees from Nsukka, Nigeria. *The Open Natural Products*, 2(124), 1-7. <https://doi.org/10.4172/2472-0992.1000124>
- Pourahmad, R., y Ghalamfarsa, F. (2021). Antibacterial activity of honeys and potential synergism of honeys with antibiotics and alkaloid extract of *Sophora alopecuroides* plant against antibiotic-resistant *Escherichia coli* mutant. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 24 (5), 623-628. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2021.54224.12179>
- Ramón, J., Villanueva, M., Yam, A., Rodríguez, M., Arias, C. y Ortiz, E. (2022). Antimicrobial and antioxidant activity of proteins isolated from *Melipona beecheii* honey. *Food Chemistry*, 13, 1-7, <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100177>
- Souza, B., Roubik, D., Barth, O., Heard, T., Enriquez, E., Carvalho, C., Villas, J., Locatelli, J., Persano, L., Almeida, L., Bogdanov, S. y Vit, P. (2006). Composition of stingless bee honey: setting quality standards. *Interciencia* , 31(12), 867-875. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-453635>

- Tallarida, R. (2001). Drug synergism: its detection and applications. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(3), 865-72. <https://jpet.aspetjournals.org/content/298/3/865.short>
- Taroco, R., Seija, V. y Vignoli, R. (2006). *Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Oficina del libro FEFMUR, 36(1), 665-668.
- Topolski, T., Frigo, A., Moura, L., Chafer, A. y Nunes, D. (2020). Physicochemical composition and antimicrobial of stingless honey: a food of differentiated quality. *Research Society and Development*, 9(10). <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i10.8223>
- Vázquez, R. (2022). Efecto de la combinación de miel de abejas sin aguijón con ciprofloxacino en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chiapas.
- Wasihun, A. y Kasa, B. (2016) Evaluation of antibacterial activity of honey against multidrug resistant bacteria in ayder referral and teaching hospital, northern Ethiopia. *Springer Plus* 5, 842. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2493-x>
- Zaiss, N., Witte, W. y Nubel, U. (2010). Fluoroquinolone resistance and *Clostridium difficile*, Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 16(4), 675-678. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3321944/>
- Zamora, G., Beukelman, K., Van den Berg, B., Arias, M., Umaña, E., Aguilar, I. y Fallas, N., (2015). Stingless bee honeys from Costa Rica exhibit antimicrobial activity against antibiotic-resistant clinical isolates. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 5(2), 144-149. <https://doi.org/10.1080/22311866.2015.1053099>