

Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón

Luis Gabriel Zamora¹, María Laura Arias²

¹Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales, Universidad Nacional, Costa Rica. ²Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales y Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica

RESUMEN

Introducción. Desde la antigüedad, la miel de abeja ha sido reconocida por sus propiedades antiinflamatorias y antibacterianas. La creciente aparición de cepas bacterianas resistentes contra los antibióticos ha motivado que se analice, de nuevo, el uso de tratamientos alternativos, como la miel de abeja, sobre úlceras, quemaduras y heridas. Existen dos grandes grupos de abejas productoras de miel: con aguijón (*Apis mellifera*) y sin aguijón (*Meliponini*). La composición de la miel de estos dos grupos no es idéntica, lo cual puede marcar una diferencia en el efecto que puedan presentar sobre diferentes microorganismos.

Objetivo. Se pretende con este trabajo evaluar la carga microbiológica presente en miel proveniente de abejas sin aguijón, así como su posible efecto antimicrobiano, con el fin de valorar su utilización a nivel de tratamiento de heridas, úlceras, quemaduras, etc.

Materiales y Métodos. Se analizó la calidad microbiológica de 30 muestras provenientes de diversas zonas geográficas de Costa Rica, así como la potencial presencia de *Clostridium botulinum* y la actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (UCR 2902), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) y *Listeria monocytogenes* (ATCC 19116).

Resultados. Los resultados obtenidos muestran que el 87% de las muestras tenía recuentos bac-

terianos y de esporas iguales o menores a 1.0×10^1 UFC/g, ninguna muestra presentó coliformes totales ni fecales y no se obtuvo ningún resultado positivo en la determinación de la presencia de *C. botulinum*. Todas las mieles analizadas exhibieron algún efecto inhibitorio sobre, al menos, uno de los microorganismos evaluados, tanto de forma pura como diluida.

Conclusiones. Los resultados obtenidos permiten concluir que la miel de abejas sin aguijón muestra una buena calidad microbiológica y un adecuado efecto inhibitorio sobre el crecimiento de varios microorganismos, por lo que su potencial uso terapéutico es muy prometedor.

Palabras clave: miel, abeja sin aguijón, actividad antimicrobiana

ABSTRACT

Microbiological quality and antimicrobial activity of honey coming from stingless bees

Introduction. Honey has been recognized for its anti-inflammatory and antibacterial properties since ancient times. The growing appearance of antibiotics resistant bacterial strains has promoted honey's analysis for the alternative treatment of ulcers, wounds and burns. There are two major groups of honey producing bees, those that sting (*Apis mellifera*) and stingless (*Meliponini*). The chemical composition of each of these two

Autor para correspondencia: María Laura Arias-Echandi. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
E-mail: maria.ariasechandi@ucr.ac.cr

Recibido: el 21 de junio de 2011. **Aceptado para publicación:** el 30 de agosto de 2011

Este artículo está disponible en <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb112223.pdf>

Zamora et al.

group's honey is not identical, and these chemical differences may affect the honey's effects on microorganisms.

Objective. The aim of this work was to evaluate the microbiological charge present in stingless bee honey and their potential antimicrobial effects, in order to evaluate its use in the therapeutic treatment of wounds, ulcers, burns, etc.

Materials and Methods. The microbiological quality and potential presence of *Clostridium botulinum* was evaluated in 30 samples coming from different geographic zones of Costa Rica. Also, antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (UCR 2902), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) and *Listeria monocytogenes* (ATCC 19116) was evaluated.

Results. Results obtained show that 87% of the samples had bacterial and spore counts equal or lower than 1.0×10^1 CFU/g, none presented fecal or total coliforms, and none were positive for the detection of *C. botulinum*. All the honeys analyzed exhibited some kind of inhibitory effect over at least one of the microorganisms evaluated, either in pure form or diluted.

Conclusions. Results obtained conclude that stingless bee honey shows good microbiological quality and adequate inhibitory effect over the growth of several microorganisms, so, its potential therapeutic use is promising.

Key words: honey, stingless bees, antimicrobial activity

INTRODUCCIÓN

Se define la miel de abeja como aquella sustancia producida por abejas melíferas a partir del néctar de las plantas, de secreciones de las partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos succionadores, las cuales son transformadas mediante sustancias específicas propias, deshidratadas y almacenadas en colmenas

hasta su maduración (1).

El uso de este producto en el tratamiento de heridas, úlceras, quemaduras e infecciones data desde la antigüedad, ya que, además de poseer propiedades antibacterianas, el producto demuestra una importante actividad antiinflamatoria. Diversos estudios han reportado el efecto inhibitorio de la miel de abeja sobre aproximadamente 60 diferentes especies bacterianas, incluyendo Gram positivas y Gram negativas, así como actividad antifúngica contra algunas levaduras y especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, así como contra dermatofitos comunes (2).

Por otro lado, su capacidad antiinflamatoria se asocia con la prevención de la formación de exudados serosos capaces de ser colonizados por bacterias y con la estimulación del crecimiento y reparación de los tejidos (3). Además, estimula la proliferación de linfocitos y fagocitos, activando de esta manera la respuesta inmune ante la infección (4).

Existen dos grandes grupos de abejas productoras de miel: aquellas con aguijón (*Apis mellifera*) y sin aguijón. Estas últimas pertenecen a la subfamilia *Miliponinae*, tribu *Meliponini* y *Trigonini*, y poseen una amplia distribución geográfica, encontrándose en las áreas tropicales y subtropicales del mundo (5). Al comparar la miel de los melipónidos con la miel producida por *Apis mellifera*, se encuentra que ésta tiende a ser más líquida, más ácida y su composición no es idéntica, lo cual puede marcar una diferencia en el efecto que puedan presentar sobre los microorganismos. Al respecto, existe consenso a nivel científico de que no todas las mieles poseen igual actividad antimicrobiana, esto debido a los diferentes niveles de producción de peróxido de hidrógeno y de factores no peróxido, los cuales son muy dependientes del origen de la miel (6), incluyendo la fuente del néctar, el área geográfica y el mismo procesamiento de la miel (2).

La eficiente actividad antibacteriana y antiinflamatoria pone de manifiesto su enorme

Actividad antimicrobiana de la miel

potencial de aplicación en el ámbito clínico a nivel dermatológico. No obstante, al igual que en el caso de la miel producida por las abejas del género *Apis mellifera*, su uso en el tratamiento de las heridas debe evaluarse, dada la potencial presencia de esporas de *Clostridium botulinum* (7).

En Costa Rica, la meliponicultura representa una industria artesanal creciente, por lo que con este trabajo se pretende evaluar la carga microbiológica presente en ésta, así como su posible efecto antimicrobiano, con el fin de valorar su utilización a nivel de tratamiento de heridas, úlceras, quemaduras, etc.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de las muestras. Se analizaron 30 muestras de miel de abeja sin aguijón provenientes de diversas zonas geográficas de Costa Rica, las cuales fueron recolectadas por el Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales de la Universidad Nacional de Costa Rica (CINAT) y traídas al Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Aguas de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

Análisis bacteriológico

Recuento total aerobio mesófilo. Se pesaron 10 g de la muestra de miel y se diluyeron en 90 mL de agua peptonada estéril (APE) 0.1 %. Se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-4} en APE 0.1 % y a partir de cada una se inocularon, por vaciado, platos de Agar Estándar + TTC (2,3,5 cloruro de trifeniltetrazolium) que se incubaron a 35°C por 6-7 días en atmósfera aerobia (8).

Recuento total anaerobio mesófilo. Se realizó de la misma forma que el recuento total aerobio, excepto por la incubación que se hizo en atmósfera anaerobia (8).

Recuento de esporulados aerobios. Se pesaron 10 g de la muestra de miel y se diluyeron en 90 mL de APE 0.1 %, posteriormente la dilución se llevó a ebullición durante 5 minutos. Con esta dilución

madre se realizaron diluciones hasta 10^{-4} en APE 0.1% y a partir de cada una se inocularon, por vaciado, platos de Agar Estándar + TTC, los cuales se incubaron de igual forma que para el recuento total aerobio (8).

Recuento de esporulados anaerobios. Se realizó de la misma forma que el recuento de esporulados aerobios, excepto por la incubación que se hizo en atmósfera anaerobia (8).

Número más probable (NMP) de coliformes fecales y totales. De las diluciones preparadas, se tomó 1 mL y se depositó en series de tres tubos de caldo lactosado simple (CLS) con campana de Durham, que se incubaron a 35°C por 48 horas. A partir de los tubos que presentaron formación de gas y turbidez, se inoculó caldo bilis verde brillante (CBVB) por 48 h a 35°C y caldo *E. coli* (EC) por 24 h a 44.5°C para corroborar la presencia de coliformes totales y fecales, respectivamente (8).

Evaluación de la actividad antibacteriana. A partir de la miel de abeja, se realizaron las diluciones en agua peptonada estéril 0.1%, adecuadas para obtener concentraciones finales de 75%, 50%, 25%, 12.5% y 6.25% (p/v), así como miel pura (100%). Se realizaron suspensiones en agua peptonada estéril ajustadas al 0.5 de la escala de McFarland de las siguientes bacterias: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (UCR 2902), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *E. coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) y *Listeria monocytogenes* (ATCC 19116), procedentes de cultivos frescos de 24 horas en agar sangre; se hicieron suspensiones en agua peptonada estéril ajustadas al 0.5 de la escala de McFarland. En estas suspensiones se humedeció una torunda, eliminando el exceso de líquido, y se distribuyó el inóculo en 2 placas de agar Muller-Hinton de 3 mm de grosor para cada cepa, a las cuales se les realizó previamente 3 pocillos (de aproximadamente 0.6 mm de diámetro), dispuestos de forma

equidistante para poder observar claramente los halos de inhibición sin que se traslaparan. En cada pocillo, se agregaron 6 gotas (120 µL) de las diluciones previamente preparadas de la miel de abejas. Se incubaron por 18 horas a 35°C y se midieron los halos de inhibición, tomando como sensible la aparición de un halo de inhibición de diámetro mayor al del pocillo.

Determinación de la presencia de *Clostridium botulinum*

Cultivo para enriquecimiento de las muestras de miel de abeja. De cada muestra de miel, se inoculó aproximadamente 1 mL en 10 mL de medio Chopped Meat prerreducido (PRAS) y se incubó en anaerobiosis por 5 días a 35°C (9).

Extracción de ADN de las bacterias de las muestras de miel de abeja. La extracción de ADN aplicada fue la metodología desarrollada por Lindstrom *et al.* (10) y descrita por Fournier *et al.* (9). Brevemente, los tubos que presentaron turbidez luego de su incubación fueron calentados a 80°C por 5 minutos con el fin de romper las células y liberar el ADN. Posteriormente, se dejaron enfriar y se centrifugaron por 20 minutos a 8000 RPM. Para extraer el ADN del sedimento, se resuspendió

en fenol-cloroformo en partes iguales, y éste se precipitó con etanol absoluto, incubándose a -20°C durante toda la noche. El extracto de ADN se almacenó a -20°C hasta que se realizó el PCR.

Extracción del ADN de las cepas de referencia.

Como cepas de referencia, se utilizaron: *Clostridium botulinum* tipo A (ATCC19397), *C.botulinum* tipo B (ATCC 7949), *C.botulinum* tipo E (ATCC 17786) y *C.botulinum* tipo F (ATCC 25764), proporcionadas por el Laboratorio de Investigación en Bacterias Anaerobias de la Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. La extracción y precipitación del ADN se realizaron de la misma forma que se describió para las muestras de miel de abeja (10).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el ADN de las muestras y cepas de referencia de *Clostridium botulinum*. Los primers utilizados se resumen en el **Cuadro 1**. Se tomó 1 µl del ADN extraído, 1 µl de los primers, agua libre de ADNasas para PCR, y el master mix 2x que incluye: Taq polimerasa, desoxinucleótidos trifosfato a 0.4 mM (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) y MgCl₂ 4 mM, todo esto en un volumen final de 25 µl.

El ciclo de PCR consistió de una desnatu-

Cuadro 1

Primers utilizados en el análisis de la presencia de *Clostridium botulinum* en miel de abeja sin aguijón

Tipo	Primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño (bp)	Región codificante	Temp. (° C)	Contenido GC (%)
A _f	CBMLA1	AGCTACGGAGGCAGCTATGTT	782	1788-1808	63.9	52
A _r	CBMLA2	CGTATTTGGAAAGCTGAAAAGG		2569-2548	63.4	41
B _f	CBMLB1	CAGGAGAAGTGGAGCGAAAA	205	434-453	64.3	50
B _r	CBMLB2	CTTGCGCCTTTGTTTTCTTG		638-619	64.5	45
E _f	CBMLE1	CCAAGATTTTCATCCGCCTA	389	156-175	63.7	45
E _r	CBMLE2	GCTATTGATCCAAAACGGTGA		544-525	63.6	43
F _f	CBMLF1	CGGCTTCATTAGAGAACGGA	543	185-194	64.1	50
F _r	CBMLF2	TAACTCCCCTAGCCCCGTAT		727-708	63.3	55

Actividad antimicrobiana de la miel

realización inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 27 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, alineamiento a 60°C por 25 s y extensión a 72°C por 1 minuto 25 s. La extensión final fue a 72°C por 3 minutos (10).

Los productos amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. Además, se utilizó el Mass Ruler ADN como marcador de peso molecular.

RESULTADOS

En el **Cuadro 2** se presentan los resultados obtenidos a partir del análisis de recuento total

aerobio y anaerobio y de recuento de esporulados aerobios y anaerobios de 30 muestras de miel sin aguijón. Todas las muestras presentaron un recuento total aerobio <10 UFC/g y únicamente dos muestras presentaron un recuento total anaerobio mayor que 2×10^4 UFC/g. En cuanto a los recuentos de formas esporuladas, únicamente una muestra (3%) presentó un recuento superior a $1,0 \times 10^6$ UFC/g (aerobio y anaerobio). Ninguna muestra presentó coliformes totales ni fecales.

En el **Cuadro 3** se presentan los resultados obtenidos al evaluar la capacidad antibacteriana de las muestras de miel de abeja en diferentes concen-

Cuadro 2
Recuento total aerobio (RTA), anaerobio (RTAna) y de microorganismos esporulados aerobio (RTEA) y anaerobio (RTEAna) obtenidos a partir de 30 muestras de miel de abeja sin aguijón

Recuento	RTA	RTAna	RTEA	RTEAna
<10 UFC/g	30 (100%)	28 (93%)	29 (97%)	29 (97%)
>10 UFC/g	0	2 (7%)	1 (3%)	1 (3%)

RTA: Recuento total aerobio

RTAna: Recuento total anaerobio

RTEA: Recuento total esporulados aerobios

RTEAna: Recuento total esporulados anaerobios

Cuadro 3

Actividad antimicrobiana de muestras de miel de abeja sin aguijón frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (UCR 2902), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Escherichia coli* O157:h7, *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) y *Listeria monocytogenes* (ATCC 19116)

Concentración miel de abeja	<i>Staphylococcus aureus</i> n(%)	<i>S. epidermidis</i> n(%)	<i>P. aeruginosa</i> n(%)	<i>E coli</i> n(%)	<i>E coli</i> O157:H7 n(%)	<i>S. enteritidis</i> n(%)	<i>L. monocytogenes</i> n(%)
100%	27(90)	27(90)	24(80)	22(73)	26(87)	25(83)	20(67)
75%	25(83)	25(83)	13(43)	12(40)	21(70)	19(63)	14(47)
50%	21(70)	15(50)	9(30)	5(17)	10(33)	8(27)	7(23)
25%	3(10)	6(20)	-	-	1(3)	-	2(7)
12.5%	-	-	-	-	-	-	1(3)

tracciones contra agentes patógenos frecuentes. Es importante destacar que el 90% de las muestras de miel, a una concentración del 100%, ejercieron un efecto inhibitorio sobre *S. aureus* y *S. epidermidis* y 87 % sobre *E. coli* O157:H7, contrario a *L. monocytogenes* donde únicamente 67% de las mieles lograron algún tipo de inhibición sobre ésta. También, cabe destacar que muestras de miel diluidas a 25% presentaron actividad contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* y aun a 12.5% contra esta última.

Con respecto a *C. botulinum*, 13 muestras de miel fueron analizadas mediante la técnica de PCR ya que presentaron crecimiento en medio *chopped meat*; no obstante, ninguna correspondió a esta bacteria.

DISCUSIÓN

El desmedido uso de agentes antimicrobianos tópicos y sistémicos ha ejercido una presión selectiva en el ambiente, cuya resultante ha sido la aparición de cepas resistentes contra los antimicrobianos. Ante esta realidad, en los últimos años se ha incentivado la búsqueda de tratamientos alternativos, lo que ha llevado al redescubrimiento de la miel de abejas, dadas sus propiedades antimicrobianas y su notable efecto desinflamatorio y cicatrizante (11). Las propiedades medicinales de ésta han sido reconocidas desde tiempos antiguos (12); no obstante, al ser un producto de origen animal se debe considerar su carga microbiológica ya que, eventualmente, podría representar un riesgo al ser utilizada sobre heridas, úlceras y abrasiones.

Dentro de las propiedades intrínsecas de la miel, se puede destacar que tiene un pH ácido, con un promedio de 3.9 (3.4-6.1) (13) una alta osmolaridad y una actividad de agua (*Aw*) baja, entre 0.56 y 0.62 (2), características que resultan inhibitorias hacia bacterias pero que permiten el crecimiento de levaduras. Estas propiedades son las responsables de los bajos recuentos de bacterias obtenidos a partir de las muestras analizadas y de la ausencia de coliformes totales y fecales. Cabe

destacar que, a pesar de que no existe una norma relacionada con la calidad de la miel de abeja en Costa Rica, la ausencia de bacterias indicadoras en el producto y los bajos recuentos obtenidos ponen de manifiesto su baja osmolaridad así como su buena calidad microbiológica.

Los resultados obtenidos a partir de la actividad antibacteriana de la miel de abeja sin aguijón contra diferentes microorganismos demuestran que todas las mieles exhiben algún efecto inhibitorio sobre, al menos, uno de los microorganismos evaluados, tanto de forma pura como diluida. Lo anterior pone de manifiesto que la actividad antimicrobiana de este producto se debe no sólo a sus propiedades físico-químicas, sino también a otros factores incluyendo la actividad de la lisozima, la presencia de ácidos aromáticos y volátiles, así como a la producción de peróxido de hidrógeno asociada con la enzima glucosa oxidasa (14).

El género *Staphylococcus* fue el que presentó mayor susceptibilidad a la miel de abeja. Este hallazgo es importante dado que el *S. aureus* es uno de los agentes más frecuentemente aislados a partir de heridas de pacientes y es una de las bacterias que presenta más resistencia contra antimicrobianos (15).

En un estudio previo realizado en Costa Rica con miel de abeja comercial (15), se reporta una marcada resistencia de *S. epidermidis* contra ésta; sin embargo, en el presente estudio, únicamente 10% de las muestras fueron resistentes e, inclusive, se obtuvo inhibición a concentraciones tan bajas como 25% de miel de abeja. Esta diferencia de comportamiento se puede deber a que la miel de melipónidos tiende a ser más ácida que la de la abeja del género *Apis* y a las diferencias en composición química entre ambas (16). Estos datos coinciden con los resultados obtenidos por French et al. (3), quienes reportan una alta sensibilidad a la miel de abeja en *S. epidermidis* y *Pseudomonas sp.*

Con respecto a las mieles evaluadas, 87% mostró un efecto inhibitorio sobre *Escherichia*

Actividad antimicrobiana de la miel

coli, 84% sobre *Salmonella sp.* y 80% sobre *Pseudomonas aeruginosa*, a concentraciones de 50%. Esto coincide con un estudio realizado en Egipto por Badawy y colegas (4), quienes usaron muestras de niños y terneras que habían sufrido infección por alguno de estos dos patógenos y reportan mayor sensibilidad a la miel en las cepas de *E.coli*; también con los resultados obtenidos por Cabrera y colegas (14), referidos a *Pseudomonas*. Cabe destacar que la miel de abeja utilizada en el tratamiento de lesiones normalmente se aplica a una concentración de 100%; no obstante, dado el comportamiento propio de las lesiones, ésta tiende a diluirse, razón por la que la evaluación realizada abarcó concentraciones más bajas.

Al comparar la capacidad inhibitoria de la miel de abeja sin aguijón con la miel de abeja con aguijón, se encuentra un mayor poder inhibitorio de la primera contra *Staphylococcus aureus* y *S.epidermidis*, mientras que con los otros microorganismos evaluados el comportamiento es similar (15).

Con respecto a la evaluación de la presencia de *C.botulinum*, éste no fue detectado en ninguna de las 30 muestras probadas. Este resultado es consistente con los resultados reportados por Estrada *et al.* (15) y por Fournier *et al.* (9). Lo anterior permite interpretar que la contaminación de mieles de origen costarricense con esta bacteria es muy baja; no obstante, no se puede garantizar que toda la miel está libre de esporas, por lo que sería recomendable desarrollar algún método que garantice que la miel que se va a utilizar en heridas y úlceras esté libre de esporas, como la esterilización con radiación gamma sugerida por Molan y Allen (17).

Los resultados obtenidos permiten concluir que la miel de abejas sin aguijón muestra una buena calidad microbiológica y un adecuado efecto inhibitorio sobre el crecimiento de varios microorganismos; por lo que su potencial uso a nivel hospitalario es muy prometedor.

AGRADECIMIENTOS

A Karla Gómez y Pamela Martínez por su cooperación en el desarrollo del proyecto.

REFERENCIAS

1. **Bogdanov S, Martin P.** Honey Authenticity: A Review. Swiss Bee Research Centre 2002.
2. **Lusby P, Coombes A, Wilkinson J.** Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria. Arch Med Rev 2005; 36:464-7.
3. **French R, Cooper A, Molan P.** The antibacterial activity of honey against coagulase-negative *Staphylococci*. J Antimicrob Chemoth 2005; 56:228-31.
4. **Badawy O.** Antibacterial Activity of Bee Honey and its Therapeutic Usefulness Against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* Infection. Rev Cien Tecnol Internacional Epiz 2004; 23:1011-22.
5. **Nates-Parra G.** Las Abejas sin Aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) de Colombia. Biota Colombiana 2001; 1:1-9.
6. **Bansal V, Medhi B, Pandhi P.** Honey – A remedy rediscovered and its therapeutic utility. Kathmandu University Medical Journal 2005; 3:305-9.
7. **Nevas M, Hielm S, Lindstrom M, Horn H, Koivulehto K, Korkeala H.** High prevalence of *Clostridium botulinum* types A and B in honey samples detected by polymerase chain reaction. Int J Food Microbiol 2002; 72:45-52.
8. **Pouch F.** Compendium of methods for the microbiological examination of foods, American Public Health Association; 2001.
9. **Fournier A, Gamboa M, Arias M.** Genes that encode botulism neurotoxins A, B, E and F in Neotropical bee honey identified with Polymerase Chain Reaction. Rev Biol Trop 2005; 54:29-34.
10. **Lindstrom M, Korkeala H.** Laboratory diagnostic of botulism. Clin Microb Rev 2006; 19 :298-314.
11. **Cruz E, Miranda M.** Perdiendo la batalla: Resistencia microbiana en enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLESS) y estrategias de control. Enf Infec Microbiol 2005; 25.
12. **Cooper R, Molan P, Harding K.** The sensitivity to honey of Gram positive cocci of clinical significance isolated from wounds. J Appl Microbiol 2002; 93:857-63.
13. **Martins H, Martins L, Bernardo F.** *Bacillaceae* spores, fungi and aflatoxins determination in honey. Rev Port Cienc Vet 2003; 98:86-8.
14. **Cabrera L, Céspedes E, Nava R, Ojeda G.** Actividad Antibacteriana No-Peróxido de Miel Zulia. Revista Científica 2006; 16:53-7.

15. **Estrada H, Gamboa M, Chaves C, Arias M.** Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*. ALAN 2004; 55:167-71.
16. **Souza B.** Composition of stingless bee honey: Setting quality standards. Interciencia 2006; 31: 867-75.
17. **Molan PC.** Potential of honey in the treatment of wounds and burns. Am J Clin Dermat 2001; 2:13-9.