

Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*. Evaluación de su carga microbiológica

Heylin Estrada, María del Mar Gamboa, Carolina Chaves y María Laura Arias

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. Costa Rica

RESUMEN. La evaluación de la carga microbiológica presente en la miel comercializada en Costa Rica, así como la evaluación de su actividad antimicrobiana sobre diversos microorganismos, incluyendo varios asociados a infecciones de heridas, permitiría emitir criterios a favor o en contra de su utilización en el tratamiento de diversas lesiones, especialmente como una terapia alternativa en los casos donde las bacterias causantes son resistentes a los antibióticos. La carga microbiológica de 25 muestras de miel de abeja adquiridas en el comercio costarricense, se evaluó por medio de una serie de recuentos (recuento total aerobio, recuento total anaerobio, recuento de esporulados aerobios, recuento de esporulados anaerobios y recuento de hongos y levaduras). Además, las muestras se inocularon en tubos con medio Chopped Meat y posteriormente se sembraron en Agar Yema de Huevo para determinar la presencia de *Clostridium botulinum*. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel, se realizó un método de difusión en agar Muller-Hinton, donde se probaron diferentes diluciones de la miel (100, 75, 50, 25, 12.5 y 6.25% v/v) contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (UCR 2902), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19116) y *Aspergillus niger*. La evaluación de la carga microbiológica de la miel mostró que el 91% de las muestras tenía valores iguales o menores a $1,0 \times 10^1$ UFC/g y no se obtuvo ningún resultado positivo en la determinación de la presencia de *Clostridium botulinum*. 92% de las muestras mostraron algún tipo de inhibición sobre las bacterias evaluadas, un 24% logró inhibir el crecimiento de *S. aureus*, hasta en una concentración de 25% v/v. No se observó la inhibición de *Aspergillus niger* por ninguna de las muestras analizadas.

Palabras clave: Miel de abeja; Actividad antimicrobiana; *Clostridium botulinum*; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli*; *Salmonella enteritidis*; *Listeria monocytogenes*; *Aspergillus niger*.

SUMMARY. Evaluation of the antimicrobial action of honey against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* and *Aspergillus niger*. Evaluation of its microbiological charge. The evaluation of the microbiological charge present in Costa Rican samples as the evaluation of its antimicrobial activity over different microorganisms, including those associated to wound infections, will allow to emit criteria referred to its use in therapeutic treatments, specially as alternative therapy for cases involving antibiotic resistant bacteria. The microbiological charge of 25 honey samples, acquired in Costa Rican markets was evaluated through several indicators including total plate aerobic count, total plate anaerobic count, total aerobic spore count, total anaerobic spore count and molds and yeast count. Also, samples were inoculated in tubes with chopped meat media and plated in egg yolk agar in order to determine the presence of *Clostridium botulinum*. For the antimicrobial activity evaluation, the diffusion method in Muller Hinton agar was performed, testing different honey concentrations (100, 75, 50, 25, 12.5 and 6.25% v/v) against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (UCR 2902), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19116) and *Aspergillus niger*. The results obtained for the microbiological characterization of honey show that 91% of samples had counts equal or lower than $1,0 \times 10^1$ CFU/g. No positive result was obtained for the isolation of *C. botulinum*. 24 of the samples analyzed inhibited the growth of *S. aureus* even in a 25% v/v concentration, nevertheless, *A. niger* was not inhibited by any of the samples tested.

Key words: Honey, antimicrobial activity, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* and *Aspergillus niger*.

INTRODUCCION

La miel de abeja ha sido utilizada como medicina desde tiempos antiguos, principalmente para el tratamiento de heridas de piel, quemaduras, úlceras, infecciones oculares, dolor de garganta, así como otras afecciones. Este uso de la miel se inició de manera empírica, simplemente porque se conocía como un remedio efectivo y no por el conocimiento de sus propiedades antimicrobianas; aún en la actualidad, la miel sigue siendo ampliamente utilizada como medicina natural (1- 4).

Con el advenimiento del uso de los antibióticos, el interés se enfocó en el tratamiento de las infecciones con éstos. No fue sino hasta la aparición de diferentes cepas de bacterias resistentes a antibióticos que se recobró el interés por el posible uso de la miel como terapia alternativa, lo que ha llevado a un gran número de investigaciones a nivel mundial para probar la efectividad de la miel en el tratamiento de infecciones (1,5-7). Se han estudiado diferentes cepas bacterianas resistentes a antibióticos, obteniéndose resultados de sensibilidad por parte de éstas a la miel (1, 2,6,7); por otro lado, ésta ha sido utilizada en el tratamiento de heridas que no responden a los antibióticos convencionales, con buenos resultados (6,8). Actualmente se conoce que la efectividad de la miel en aplicaciones médicas, se debe muy probablemente a su amplia actividad antimicrobiana contra diversas bacterias y hongos, sin dejar de lado su capacidad de estimular la producción de citocinas en los monocitos (9).

La miel de abeja consiste en una solución concentrada de azúcares, principalmente glucosa y fructosa, que constituyen el mayor porcentaje de la miel, así como pequeñas cantidades de aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas, minerales y pigmentos. Contiene además cinco enzimas: invertasa, glucosa-oxidasa, amilasa, catalasa y fosfatasa ácida (1,4, 8,10).

Los valores de a_w de la miel de abeja se encuentran entre 0,56 y 0,62, valor que impide el crecimiento de casi cualquier microorganismo con excepción de algunas levaduras y bacterias osmofílicas. Sin embargo, si la miel es diluida, el a_w alcanzado ya no sería efectivo para inhibir el crecimiento de los microorganismos (1,2,4,6).

La miel tiene un pH ácido (3.5 - 4.5); esta acidez se debe a la presencia de ácidos orgánicos y representa un importante factor antimicrobiano (1,2,6). El principal ácido orgánico presente en la miel es el ácido glucónico, producto de la acción de la glucosa-oxidasa (1,2).

Se han identificado varias sustancias en la miel con propiedades antimicrobianas; diversos estudios han encontrado que la principal actividad antimicrobiana se debe a la presencia de peróxido de hidrógeno producido por la enzima glucosa-oxidasa (1,2,4,6,7). También, los fitoquímicos, especialmente los flavonoides y ácidos aromáticos (1,2,6,7,16) y los antioxidantes fenólicos son reconocidos por inhibir un

amplio rango de bacterias Gram positivas y Gram negativas (16). Por otro lado, aún cuando la presencia de lisozima en la miel no está bien esclarecida, en algunos reportes se menciona ésta como uno de los antimicrobianos presentes en la miel (11,16,17,20).

Dentro de las cargas microbianas normales de la miel de abeja se encuentran ciertas bacterias y levaduras. Esta carga microbiana de la miel suele ser baja y proviene de la misma flora bacteriana y fúngica de las abejas, así como del néctar de las flores; generalmente va a estar constituida por esporas del género *Bacillus* y por levaduras del género *Saccharomyces*, que, cuando crecen y se multiplican, son las causantes de la fermentación de la miel (8,21). Por otra parte, se debe tomar en cuenta que una manipulación inadecuada durante la recolección, procesamiento y almacenamiento de la miel, puede llevar a su contaminación de la misma con microorganismos patógenos (21).

La miel ha sido reconocida como una fuente de esporas de *Clostridium botulinum* y ha sido fuertemente asociada al botulismo infantil, y aunque hasta ahora no se ha reportado un caso de botulismo de heridas por uso de la miel sobre las mismas, existe un riesgo por el hecho de que la miel puede contener esporas de esta bacteria (8-13).

Costa Rica es un país donde la producción de miel de abeja representa una industria creciente, por lo que con este trabajo se pretende contribuir a un mejor conocimiento de ésta mediante la evaluación de la carga microbiológica presente en mieles comerciales costarricenses, así como su posible efecto antimicrobiano, con el fin de valorar su utilización a nivel de tratamiento de heridas, úlceras, quemaduras, etc.

MATERIALES Y METODOS

Recolección de muestras

Se obtuvieron 25 muestras de miel de abeja comercializadas en Costa Rica, las cuales fueron adquiridas al azar en supermercados, ferias del agricultor y mercados de diferentes zonas del país.

Análisis bacteriológico

Recuento total aerobio

Se pesaron 10 g de la muestra de miel y se diluyeron en 90 mL de agua peptonada estéril 0.1% (APE). 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 trifentiltetrazolium) que se incubaron a 35°C por 6-7 días en atmósfera aerobia.

Recuento total anaerobio

Se realizó de la misma forma que el recuento total aerobio, excepto por la incubación que se hizo en atmósfera anaerobia.

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.

Recuento de esporulados anaerobios

Se realizó de la misma forma que el recuento de esporulados aerobio, excepto por la incubación que se hizo en atmósfera anaerobia.

Determinación de la presencia de *Clostridium botulinum*

Se inocularon 1-2 g de miel en tubos con 15 mL de medio Chopped Meat por duplicado y se incubaron a 35° por 3-4 días. Uno de los tubos fue tratado con calor (80°C por 10 minutos) y ambos tubos se inocularon en Agar Yema de Huevo e incubaron en anaerobiosis a 35°C por 48 horas.

Recuento de hongos y levaduras

Se utilizaron las mismas diluciones realizadas para el recuento total aerobio y a partir de cada una se inocularon por esparcimiento platos de Agar Papa Dextrosa Acidificado y se incubaron a temperatura ambiente durante una semana.

Evaluación de la actividad antibacteriana

Se realizaron diluciones de cada miel de abeja en APE 0.1% para obtener concentraciones finales de 75%, 50%, 25%, 12.5% y 6.25% v/v. A partir de cultivos de 24 horas en placas de agar sangre de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (UCR 2902), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076) y *Listeria monocytogenes* (ATCC 19116), se prepararon suspensiones en APE 0,1%, las cuales fueron ajustadas al 0.5 de la escala de McFarland. En un lapso no mayor de 15 minutos de ajustado el inóculo, se introdujo hisopo con algodón, se eliminó el exceso de líquido y se distribuyó en la superficie de placas de Agar Muller-Hinton de 4 mm de grosor, a las cuales previamente se les habían hecho seis pocillos, en tres direcciones rotando la placa aproximadamente 60° entre cada una para asegurar una distribución uniforme. A cada pocillo se agregaron 0,30 mL de la miel al 100%, 75%, 50%, 25%, 12.5% y 6.25% v/v, respectivamente. Se incubaron a 35°C por 18 horas y se midieron los halos de inhibición.

Evaluación de la actividad antimicrobiana contra *Aspergillus niger*

Se realizó el método de difusión mencionado anteriormen-

te con las siguientes modificaciones: la suspensión al 0.5 de la escala de McFarland se realizó a partir de un filtrado conteniendo únicamente conidias de *A. niger* y las placas se incubaron durante tres días a temperatura ambiente.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos para el análisis microbiológico de las mieles de abeja. En términos generales, los resultados obtenidos fueron bastante bajos, lo cual era de esperarse, ya que las características propias de la miel de abeja, tales como su alta osmolaridad, viscosidad y bajo pH hacen de ésta un producto con recuentos bajos de microorganismos.

TABLA 1

Recuento total aerobio (RT), recuento total anaerobio (RTA), recuento de esporulados aerobio (RE), recuento de esporulados anaerobio (REA) y recuento de hongos y levaduras (HL) de 25 muestras de miel de abeja adquiridas en el mercado costarricense

Parámetro	RT	RTA	RE	REA	HL
≤ 10 ¹ UFC/g	22 (88%)	25 (100%)	22 (88%)	25 (100%)	20 (80%)
> 10 ¹ UFC/g	3 (12%)	0	3 (12%)	0	5 (20%)

Ciertos tipos de bacterias esporuladas y levaduras osmofílicas, provenientes de las abejas y las plantas, son las que comúnmente pueden encontrarse en la miel (8,21). Sin embargo, también puede haber bacterias vegetativas (8), pero a pesar de que estos microorganismos logran sobrevivir en la miel, no encuentran las características óptimas para multiplicarse en ella; por esta razón, cuando los recuentos totales son altos se deben probablemente a la contaminación por una manipulación inadecuada durante y después de la extracción del producto.

Aunque se podría haber esperado un mayor recuento de hongos y levaduras, puesto que las levaduras constituyen parte de los microorganismos encontrados normalmente en la miel de abeja (8,21), las muestras presentaron recuentos iguales o menores 10² UFC/g. Esto puede deberse a dos razones: al tratamiento con calor que se le realiza a muchas mieles con el fin de destruir las levaduras y evitar la fermentación de la miel, o también que naturalmente posean una baja carga de levaduras.

En la evaluación de la presencia de *Clostridium botulinum* no se obtuvo ninguna colonia sospechosa. Esto correlaciona muy bien con los resultados del recuento de esporulados anaerobios, los cuales fueron también bajos en todas las mieles evaluadas. Sin embargo, esto no indica que no exista la posibilidad de encontrar *C. botulinum* en las mieles comer-

cializadas en el país, ya que en Costa Rica se ha informado la presencia de esta bacteria en suelos y estudios similares llevados a cabo en España y Finlandia con un mayor número de muestras y usando las técnicas de PCR y dilución-centrifugación lograron detectar esta bacteria (8-13).

Con respecto a la evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel, la Tabla 2 presenta el efecto de diversas diluciones de miel de abeja sobre el crecimiento de bacterias. Se debe destacar que solamente dos de las mieles evaluadas (8%) no produjeron ningún tipo de inhibición en el crecimiento de las bacterias utilizadas en el estudio; el resto de las muestras inhibió el crecimiento de al menos una de las bacterias al emplear una concentración de 100% v/v de miel. *Staphylococcus aureus* fue el microorganismo cuyo crecimiento se vio mayormente afectado por la miel, obteniéndose halos de inhibición aún con concentraciones de 50% v/v y de 25% v/v. Diversos estudios realizados han demostrado la sensibilidad de *S. aureus* a la miel de abeja, inclusive de cepas resistentes a antibióticos (21,22,23). Cooper *et al.* (16) reportan la sensibilidad a la miel natural de 18 cepas de *S. aureus* metilicina-resistentes aisladas de heridas infectadas y de 20 cepas de enterococos vancomicina-resistentes aisladas de superficies de ambientes hospitalarios en concentraciones de 10% (v/v) o menos, con el método de concentración mínima inhibitoria. Por otro lado, en un estudio desarrollado en India, por Subrahmanyam y Hemmady (17), se probó el efecto antibacteriano de diferentes mieles locales contra varias bacterias aisladas de heridas de quemaduras, incluyendo *S. aureus*, encontrándose que ninguna de las bacterias aisladas logró crecer en agar Muller-Hinton con concentraciones de 30% de miel. Estos datos son de gran importancia tomando en cuenta dos factores: este es uno de los microorganismos más frecuentemente aislado de heridas infectadas y muchas cepas han desarrollado una gran resistencia a los antibióticos.

TABLA 2

Porcentaje de muestras de miel de abeja que ejercen efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *S. aureus* (A), *S. epidermidis* (B), *P. aeruginosa* (C), *E. coli* (D), *S. enteritidis* (E) y *L. monocytogenes* (F) según las concentraciones evaluadas

Concentración de miel (% v/v)	A% N=25	B%	C%	D%	E%	F%
100%	80	68	76	84	92	48
75%	52	24	36	32	44	20
50%	48	16	24	12	20	16
25%	24	0	8	0	8	0
< 25%	0	0	0	0	0	0

Por otro lado, las bacterias que mostraron menor inhibición por la miel fueron *L. monocytogenes* y *S. epidermidis*. *L. monocytogenes* mostró una marcada resistencia a los efectos antibacterianos de la miel. La resistencia de esta bacteria hacia ambientes adversos ha sido ampliamente documentada en estudios que incluyen su resistencia a bajos pHs, bajas temperaturas, bajos aw y presencia de ácidos orgánicos, entre otros. Por otra parte, la resistencia *S. epidermidis* a diversos agentes antibacterianos también ha sido ampliamente demostrada. Las restantes bacterias evaluadas mostraron un comportamiento similar ante la miel de abeja, sin embargo, *E. coli* no fue inhibida por mieles con diluciones de 25% v/v a diferencia de *Salmonella enteritidis* y *P. aeruginosa*, lo cual resulta importante dada la frecuencia con que ésta última es aislada de heridas infectadas (24,25).

El 8% de las mieles evaluadas no tuvieron efecto alguno sobre el crecimiento microbiano. Esto sugiere que las propiedades de cada miel varían, lo que puede deberse a la fuente floral utilizada por las abejas para la recolección del néctar, así como a la zona donde se da la producción (1,2). Además de las características propias de cada miel, también se deben tomar en cuenta las posibles alteraciones—calentamiento excesivo, dilución con agua, agregado de otras sustancias— a las cuales se pudieron haber sometido las mieles con baja o ninguna actividad antimicrobiana.

En este estudio la cepa de *Aspergillus niger* utilizada no fue inhibida por ninguna de las mieles evaluadas. Varios trabajos han reportado actividad antifúngica principalmente contra especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (17). Efem y colaboradores analizaron diversas mieles sin procesar, las cuales presentaron actividad antifúngica contra hongos que comúnmente se encontraban en heridas quirúrgicas (21). Sin embargo, no todas las mieles que han presentado buena actividad antibacteriana han sido efectivas como antifúngicas (1).

Aún cuando las propiedades antimicrobianas de la miel comúnmente se le han atribuido a su alta osmolaridad y a la acidez, esto es cierto cuando la miel no ha sido diluida (6,18) y por esta razón probablemente fue que se observó la inhibición del crecimiento de las bacterias utilizadas en el estudio por la mayoría de las muestras probadas a una concentración del 100% v/v. Sin embargo, cuando la miel es diluida, ni la osmolaridad ni el pH son suficientes como agentes antimicrobianos (1,2,6), allí es donde cobran importancia el peróxido de hidrógeno y los componentes fitoquímicos. El efecto inhibitorio de diversas mieles sobre *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. enteritidis* aún en concentraciones finales de 25% v/v, evidencia la presencia de otros factores responsables de sus propiedades antimicrobianas, fuera de su alto contenido de azúcares y pH ácido.

Un estudio indicativo de que el peróxido de hidrógeno contribuye a las propiedades antimicrobianas de la miel es el realizado por Taormina y colaboradores (22), quienes encon-

traron que la inhibición del crecimiento de *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes* y *S. aureus* en soluciones de miel de 25% se disminuía luego de tratar dichas soluciones con catalasa.

En la miel los niveles de peróxido de hidrógeno son bajos, aproximadamente 1000 veces menos que las soluciones usadas como antisépticos, de manera que no causa daño tisular; sin embargo, sigue siendo efectivo como antimicrobiano. Parte de la efectividad como antimicrobiano del peróxido de hidrógeno se debe a la liberación lenta de éste y a la producción continua por parte de la glucosa-oxidasa (4,6).

Costa Rica es un país con una importante y variada producción de miel de abeja. La presencia de diversas mieles con actividad antimicrobiana implica múltiples beneficios, entre ellos una fuente natural y propia de un posible tratamiento para infecciones principalmente a nivel de piel. El paso a seguir es un estudio más profundo de cuales son los factores antimicrobianos predominantes en estas mieles, así como su capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos aislados de heridas, quemaduras y úlceras infectadas.

REFERENCIAS

1. The National Honey Board. Honey-Health and Therapeutic Qualities. (The National Honey Board, 390 Lashley Street Longmont, CO 80501-6045 USA). Disponible en: www.nhb.org/download/factsht/compendium.pdf
2. Bogdanov S. 1997. Antibacterial substances in honey. Swiss Bee Research Center en www.apis.admin.ch/english/pdf/BeeProducts/AntibacterialInternet_e.pdf
3. Molan PC. The role of honey in the management of wounds. *Journal of Wound Care*. 1990; 8:32-36.
4. Ramírez J, Calderón R, Ortiz R, Sánchez L. Manual de Apicultura. Programa de Publicaciones e Impresiones de la Universidad Nacional, Costa Rica. Tomo I, 2003; pp 44-77.
5. Manrique A, Párraga A. 1995. Producción de Miel y de Jalea Real. Fonaip Divulga en <http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd48/texto/produccion.htm>
6. National Honey Board. pH & Acids in Honey. (The National Honey Board, 390 Lashley Street Longmont, CO 80501-6045 USA). Disponible en: <http://www.nhb.org/download/factsht/ph-acid.pdf>
7. Rodríguez M. Composición, calidad y consumo de miel en España. *Diario de la seguridad alimentaria* en <http://www.consumaseguridad.com/web/es/sociedad-y-consumo/2003/07/15/7361.php>
8. Martins H, Martins L, Bernardo F. Bacillaceae spores, fungi and aflatoxins determination in honey. *Revista Portuguesa de Ciencias Veterinarias*. 2003; 98:86-88.
9. Tonks A, Cooper R, Jones K, Blair P, Parton, J. Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. *Cytokine* 2003; 7:21.
10. Nakano H, Okabe T, Hashimoto H, Sakaguchi G. Incidence of *Clostridium botulinum* in honey of various origins. *Jpn J Med Sci Biol*. 1990; 43:183-195.
11. 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.
12. Schocken-Iturrino RP, Carneiro MC, Kato E, Sorbara JO, Rossi OD, Gerbasi LE. Study of the presence of the spores of *Clostridium botulinum* in honey in Brazil. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999; 24:379-382.
13. NJ Department of Health and Senior Services. Communicable Disease Service Technical Information for Health Professionals. Communicable Disease Service Manual. *Clostridium botulinum*. Disponible en <http://www.state.nj.us/health/cd/manual/botulism.pdf>
14. McDonnell G. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action and Resistance. *Clin Microb Rev*. 1999; 12:147-179.
15. Selection of honey for use on wounds. Waikato Honey Research Unit. University of Waikato. <http://honey.bio.waikato.ac.nz/>
16. Cooper RA, Molan PC, Harding K. The sensitivity to honey of gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *J Applied Microb*. 2002; 93: 857-863.
17. Subrahmanyam M, Archan H, Pawar S. Antibacterial activity of honey on bacteria isolated from wounds. *Annals of Burns and Fire Disasters*. 2001; XIV: 23-29.
18. Gheldof N, Engeseth N. Antioxidant capacity of honey from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. *J Agric Food Chem*. 2002; 50: 3050-3055.
19. Gheldof N, Wang X, Engeseth N. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J Agric Food Chem*. 2002; 50:5870-5877
20. Molan PC. Potential of honey in the treatment of wounds and burns. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2001 2(1): 13-19
21. Efem S, Udoh K, Iwara C. The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance. *Infection*. 1992; 20:227-229.
22. Taormina P, Niemira B, Beuchat L. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *Int J Food Microb*. 2001; 69: 217-225.
23. Cooper R, Molan PC, Harding KG. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. *J R Soc Med*. 1999; 92:283-285.
24. Cooper R, Molan P. The use of honey as an antiseptic in managing *Pseudomonas* infection. *J Wound Care*. 1999; 8:161-164.
25. Cooper R, Halas E, Molan P. The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *J Burn Care Rehabil*. 2002; 23:366-370.

Recibido: 01-11-2004

Aceptado: 10-06-2005