

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE MIEL DE ABEJAS MULTIFLORALES (*APIS MELLIFERA SCUTELLATA*) DE CUATRO ZONAS APÍCOLAS DEL ESTADO ZULIA, VENEZUELA

Antibacterial Activity of Multifloral Honey Bees (*Apis mellifera scutellata*) from Four Apiarists Zones in Zulia State, Venezuela

Lilibeth Cabrera, Graciela Ojeda de Rodríguez, Euclimar Céspedes y Alejandro Colina

Laboratorio de Alimentos, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad del Zulia.
Apartado postal 526, Maracaibo, Venezuela. E-mail: cabrerallibeth@latinmail.com

RESUMEN

Desde tiempos muy remotos a la miel se le ha reconocido propiedades antibacterianas y terapéuticas, siendo utilizada en el tratamiento de quemaduras y afecciones respiratorias entre otras. El presente trabajo consistió en evaluar la actividad antibacteriana de miel de abejas procedente de cuatro zonas apícolas del estado Zulia: Agronomía, La Rinconada, Mara y Caja Seca durante la época seca (Es): noviembre-abril y lluviosa (Ell): mayo-octubre. Se analizó una muestra representativa de 20 panales de miel por zona, llevando a cabo diluciones de 50 a 5% de concentración utilizando como diluyente agua destilada estéril. Las muestras fueron analizadas por triplicado utilizando cepas patógenas indicadoras de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* y *Proteus mirabilis* en concentraciones de 1×10^6 ufc/ml y utilizando la técnica de difusión en agar. La actividad antibacteriana fue evaluada como halos de inhibición medidos en milímetros. Los resultados obtenidos revelaron que la miel de abejas procedente de las cuatro zonas del estado Zulia, mostraron actividad antibacteriana del tipo bacteriostático contra las cepas bacterianas analizadas. La dilución de las muestras de miel, contribuyó a disminuir el efecto antibacteriano de manera independiente de la zona, época y concentración.

Palabras clave: Actividad antibacteriana, miel de abejas, técnica de difusión en agar.

ABSTRACT

Antibacterial and therapeutic properties of honey bees have been known since very long ago, and have been used for the treatment of burns and respiratory problems, among a lot of

other purposes. The objective of this research was to evaluate the antibacterial activity in different honey bee sources from four zones in Zulia state: The Agromomía Faculty, La Rinconada; Mara y Caja Seca during the dry season (ES); November-April and the rainy season (ELL), (May-October). Twenty honey combs in each zone were sampled making dilutions of between 5 to 50% with sterile distilled water. The samples were analyzed in triplicate using pathogenic strains of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* and *Proteus mirabilis*. The agar diffusion technique was used with concentrations of 1×10^6 cfu/ml. The antibacterial activity was measured in millimeters of the inhibition circle. The results obtained demonstrated that the honey bee from the four zones in Zulia state showed antibacterial activity (bacteriostatic) against the selected strains. The dilution of the honey samples reduced the antibacterial effect irregardless of the zone, season and concentration.

Key words: Antibacterial activity, honey bees, agar diffusion technique.

INTRODUCCIÓN

La miel se ha llegado a definir como una sustancia dulce sin fermentar, producida por las abejas obreras a partir del néctar de las flores o de exudación de otras partes vivas de las plantas, que las abejas recogen, transforman y combinan con otras sustancias específicas y maduran en panales [3].

Desde el punto de vista de su composición es una solución de glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, proteínas, minerales, ácidos orgánicos, vitaminas y enzimas [20]. La proporción de sus componentes varía según el tipo de néctar con que ha sido producida, el cual está directamente relacionado con la flora apícola de la región.

Desde tiempos muy remotos a la miel se le ha reconocido propiedades antibacterianas y terapéuticas, siendo utilizada en el tratamiento de heridas, traumatismos, quemaduras, infecciones y trastornos respiratorios [2, 8, 10, 15, 22]. La actividad antibacteriana que presenta la miel se ha atribuido a algunos factores como la osmolaridad relacionada con su contenido de agua, su bajo pH y a los niveles de peróxido de hidrógeno [2, 9]. Varios autores han resaltado la actividad antibacteriana de la miel de abeja, en este sentido, Effem y col. [6] y Leszczynska y Fik [7] reportaron la sensibilidad de cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella dublin* y *Pseudomonas aeruginosa* a varios tipos de miel de abeja. Postmes y col. [16] evidenciaron la inhibición bacteriana que presenta la miel de lima contra cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* y *Streptococcus faecalis*. Ríos y Novoa [17] encontraron actividad antibacteriana bacteriostática y bactericida de mieles multiflorales sobre cepas de *Listeria spp.*, *Bacillus subtilis* y *P. aeruginosa*. Sobre la base de este conocimiento se planteó el presente estudio con el fin de evaluar la actividad antibacteriana de muestras de mieles puras procedentes de cuatro zonas del estado Zulia contra cepas bacterianas de origen clínico y contribuir así con el conocimiento de los atributos medicinales de la miel de abejas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de las muestras de miel

Las muestras de miel de abejas pura multiflorales fueron obtenidas de apiarios correspondientes a cuatro zonas del estado Zulia, Venezuela: Agronomía, La Rinconada, Mara y Caja Seca. Se muestrearon 20 panales por zona y por época, para un volumen de miel de 20 litros por zona. La época seca (Es) correspondió a los meses noviembre-abril de 1999 y la lluviosa (Ell) a los meses mayo-octubre del mismo año, donde una vez colectados los panales, las mieles fueron centrifugadas utilizando un extractor de tipo radial con capacidad de 32 cuadros y almacenadas asépticamente en envases de color ámbar a temperatura de 25°C, hasta el momento de su análisis.

Preparación de las muestras de miel

Se utilizaron muestras de miel de abejas diluidas y no diluidas. Las muestras diluidas fueron preparadas en concentraciones desde 50% hasta 5% (p/v), utilizando como diluyente agua destilada estéril según la técnica de Allen y col. [1]. Estas soluciones se realizaron en el mismo momento del ensayo para evitar la pérdida de peróxido de hidrógeno.

Cepas bacterianas

Como bacterias indicadoras de la actividad antibacteriana de la miel se utilizaron: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* y *Proteus mirabilis*, obtenidas del Centro de Referencia Bacteriológica del Hospital Universitario de Maracai-

bo, estado Zulia (Venezuela). Las cepas bacterianas fueron cultivadas y mantenidas en Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI, Merck, Alemania) y almacenadas a 4°C, hasta el momento de su utilización. El inóculo empleado en el ensayo de actividad antibacteriana de cada cepa bacteriana fue previamente estandarizado mediante determinación de la densidad óptica y curvas de crecimiento, siendo éste el correspondiente a 1×10^6 ufc/ml. Para el momento del uso de los cultivos bacterianos fueron activados, cultivándolos por 18 horas a 35°C en caldo BHI.

Actividad antibacteriana de la miel

La actividad antibacteriana de las muestras de miel fue evaluada por triplicado mediante la técnica de Difusión en agar [1, 11] utilizando placas de petri con 18 μ L de agar nutritivo (Merck, Alemania) inoculadas con 100 μ L de un cultivo joven bacteriano (3,5 horas de incubación a 35°C). A cada placa con agar solidificado se le realizaron 3 pozos por placa de 8 mm de diámetro utilizando un sacabocado estéril N° 4. A cada pozo se le añadió posteriormente 100 μ L de miel diluida y no diluida. Luego las placas fueron incubadas a 35°C por 18 horas. Como controles se utilizaron placas no perforadas e inoculadas con las cepas indicadoras sin miel y placas perforadas e inoculadas con agua.

La actividad antibacteriana de las muestras de miel fue determinada midiendo el halo de inhibición alrededor de cada pozo (inhibición del crecimiento bacteriano), con ayuda de un vernier marca Calliper, considerando a los halos iguales o mayores de 2 mm de diámetro como inhibitorios.

Análisis Estadístico

A los datos se les efectuó un análisis de varianza, con un diseño aleatorio con efectos fijos, del paquete SAS [19], con comparaciones de media a un nivel de significancia de $P < 0,001$. Se tomó en cuenta el efecto de las muestras de miel de las cuatro zonas apícolas, por época. El modelo planteado correspondió:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_n$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

es decir, al menos dos de los μ_z son diferentes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La actividad antibacteriana de las mieles analizadas, procedente de las cuatro zonas del estado Zulia, ya sean diluida y no diluidas, fue del tipo bacteriostático. En las FIGS. 1 y 2, se observa la actividad antibacteriana de la miel de abejas de Agronomía, durante la época seca y lluviosa, respectivamente. La FIG. 1 muestra variaciones en dicha actividad de-

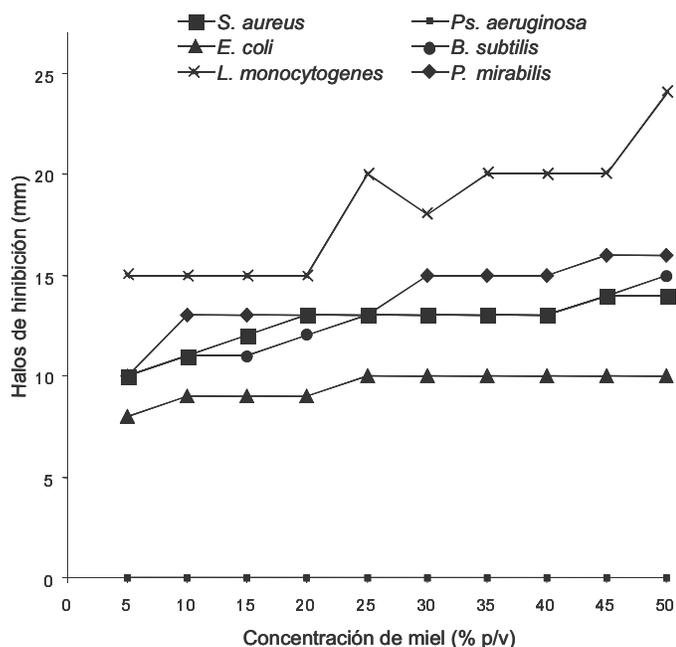


FIGURA 1. VALORES DE HALOS DE INHIBICIÓN (MM) DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR EFECTO DE MUESTRAS DE MIEL PURA DILUIDA CON AGUA DESTILADA, PROVENIENTE DE LA ZONA DE AGRONOMÍA, DURANTE LA ÉPOCA SECA.

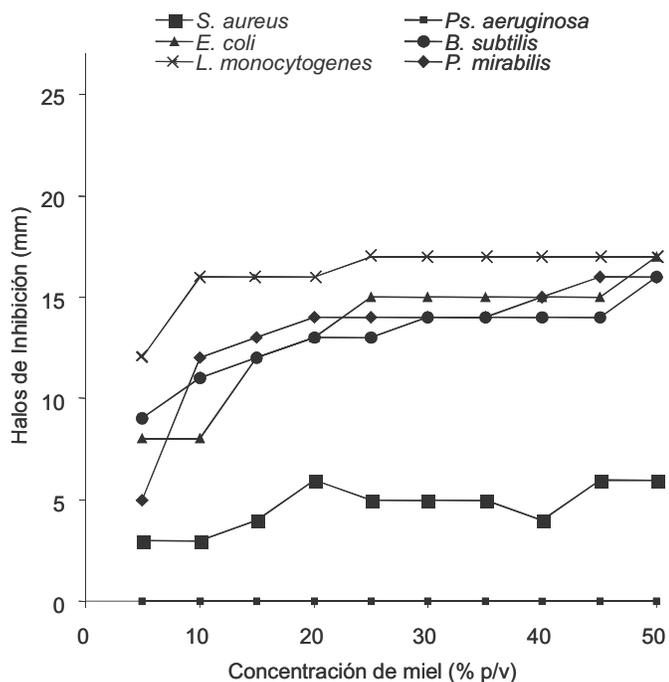


FIGURA 2. VALORES DE HALOS DE INHIBICIÓN (MM) DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR EFECTO DE MUESTRAS DE MIEL PURA DILUIDA CON AGUA DESTILADA, PROVENIENTE DE LA ZONA DE MARACAIBO I: AGRONOMÍA, DURANTE LA ÉPOCA LLUVIOSA.

pendiendo de la cepa bacteriana y la concentración de la miel, donde se encontró halos de inhibición entre 9 y 24 mm, a la mayor dilución de la miel. El mayor halo de inhibición fue de 24 mm el cual correspondió a *L. monocytogenes*. Esta cepa bacteriana fue la más susceptible, con diferencias significativas ($P < 0,001$) en todas las concentraciones de miel, mientras que la cepa de *E. coli* resultó la menos afectada con valores de halos de inhibición menores de 10 mm. Resultados similares reportaron Ríos y Novoa [17] donde *E. coli* y *Listeria* spp. mostraron el mismo comportamiento. Es de resaltar el comportamiento de *P. aeruginosa*, donde no fue afectado en su crecimiento a nivel de ninguna concentración de la miel. El resto de las cepas resultaron con halos de inhibición entre 8 y 16 mm. Armstrong y Otis [2] y MacCarthy [9] indicaron que mieles diluidas pueden contribuir a disminuir el crecimiento de las bacterias, debido a la acción más efectiva del peróxido de hidrógeno presente en la miel de abeja.

En la FIG. 2, se observa un comportamiento similar a la miel de la época seca en cuanto a que las bacterias ensayadas, resultaron ser inhibidas a nivel de todas las concentraciones, excepto *P. aeruginosa*. *S. aureus* resultó menos afectada, con diferencias significativas ($P < 0,001$) en relación a las concentraciones de la miel. *L. monocytogenes* también resultó mayormente inhibida con diferencias significativas ($P < 0,001$) en todas las concentraciones de miel. Resultados similares fueron encontrados por Molan [12] y Willix y col. [21] donde *L. monocytogenes* también fue la bacteria más sensible al efecto inhibitorio de miel de Manuka y Rewarewa, con los mayores halos de inhibición a la concentración más diluida (12 mm). Nabrdalik y Skarbek [14] encontraron también sensibilidad de *L. monocytogenes* frente a concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25% de la miel de Lima. En cuanto a *E. coli* mostró un comportamiento similar a las cepas de *B. subtilis* y *P. mirabilis*.

En las FIGS. 3 y 4, se evidencia la actividad antibacteriana de la miel de La Rinconada, durante la época seca y lluviosa, respectivamente. En la FIG. 3, se observa que *P. aeruginosa* mostró resistencia frente a esta miel al igual que con la miel de Agronomía. El resto de las cepas resultaron con inhibición bacteriostática de su crecimiento a las concentraciones de miel analizadas. *L. monocytogenes* mostró valores constantes de halos de inhibición (18 mm) a concentraciones entre 20 y 50%. *P. aeruginosa* permaneció resistente, mientras que el resto de las cepas mostraron ser inhibidas en su crecimiento a halos menores de 14 mm pero sin diferencias significativas. *L. monocytogenes* junto con *B. subtilis*, fueron las bacterias que mostraron mayores halos de inhibición de su crecimiento a la menor concentración de miel (5%). En lo que respecta a *E. coli* y *P. mirabilis*, Molan [13] indica que dichas especies resultan afectadas en su crecimiento por la miel de Manuka; y por otro lado, no afecta a *P. aeruginosa*, al igual que en el presente trabajo.

Al observar los resultados obtenidos con la miel de La Rinconada, época lluviosa, FIG. 4 se observa que *L. monocytogenes* mostró un comportamiento similar con relación a la época seca. En este caso, dicha bacteria presentó los ma-

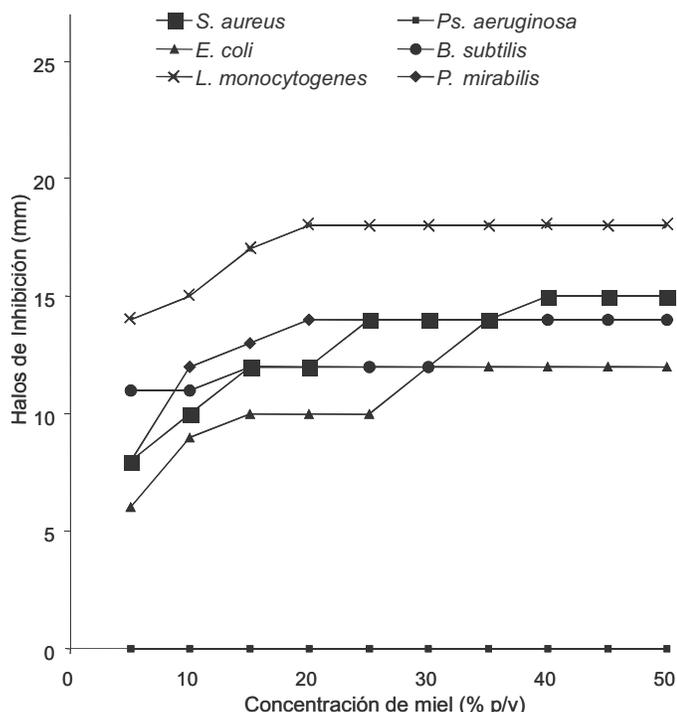


FIGURA 3. VALORES DE HALOS DE INHIBICIÓN (MM) DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR EFECTO DE MUESTRAS DE MIEL PURA DILUIDA CON AGUA DESTILADA, PROVENIENTE DE LA ZONA DE MARACAIBO II: LA RINCONADA, DURANTE LA ÉPOCA SECA.

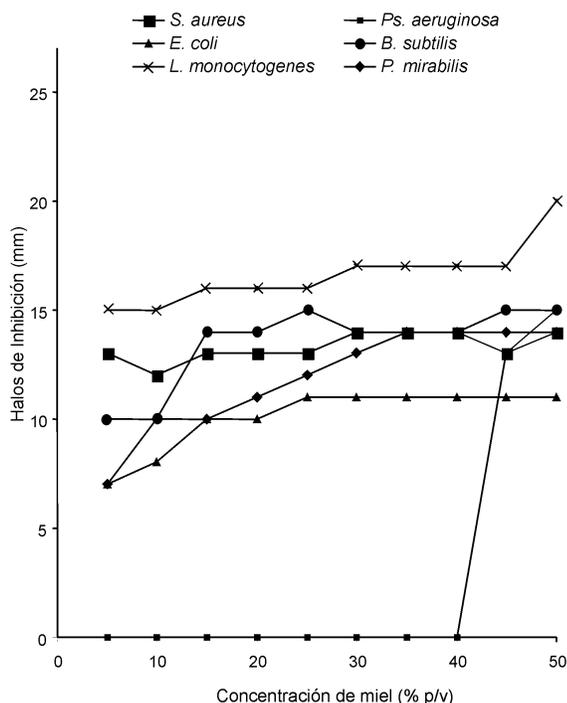


FIGURA 4. VALORES DE HALOS DE INHIBICIÓN (MM) DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR EFECTO DE MUESTRAS DE MIEL PURA DILUIDA CON AGUA DESTILADA, PROVENIENTE DE LA ZONA DE MARACAIBO II: LA RINCONADA, DURANTE LA ÉPOCA LLUVIOSA.

yores halos de inhibición a la menor concentración de 5% al igual que *S. aureus*. Cooper y col. [5] resaltan la susceptibilidad de *S. aureus* frente a la miel de abejas en heridas infectadas. Armstrong y Otis [2] en su trabajo de propiedades antibacterianas de la miel de abeja, indican que la misma es particularmente efectiva contra bacterias que normalmente resultan resistente a los antibióticos, como es el caso de *S. aureus*, el cual es causante de infecciones en heridas intra-hospitalarias. Molan y Allen [11] en este sentido mencionan que concentraciones entre 5 y 10%, tanto de miel de Manuka como de Vipers Bugloss, son efectivas para la disminución de *S. aureus*.

La cepa de *E. coli* ensayada fue una de las bacterias menos sensible, con un halo máximo de inhibición de 11 mm a una concentración del 50% de miel. *P. aeruginosa*, que hasta ahora había mostrado resistencia a la miel de Agronomía (ambas épocas) y de La Rinconada (época seca), resultó afectada en su crecimiento a concentraciones de 45% y 50%, lo que resulta importante en lo que a tratamiento alternativo se refiere, frente a esta bacteria que se encuentra frecuentemente asociada con cuadros de infecciones intra hospitalarias [6].

En las FIGS. 5 y 6 se muestra la actividad antibacteriana de la miel de abejas de Mara durante la época seca y lluviosa, respectivamente. En la FIG. 5 *L. monocytogenes*, al igual que en mieles anteriores, presentó halos de inhibición de mayor diámetro con respecto al resto de las bacterias analizadas, resultando la más susceptible ($P < 0,001$). Es de resaltar que la miel de esta zona también logró afectar el crecimiento de *P. aeruginosa* a partir de concentraciones del 15% y de forma gradual hasta 50% ($P < 0,001$), llegando a presentar halos de inhibición de 19 mm a la concentración de 50%. A concentraciones de 5 y 10% de miel *E. coli* y *P. aeruginosa*, no resultaron inhibidas en su crecimiento. El resto de las cepas mostraron sensibilidad a nivel de todas las concentraciones ensayadas. Postmes y col. [16] reportaron efecto bactericida de muestras de miel de Lima contra cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, a concentraciones del 8%. En este sentido, el efecto inhibitorio de la miel de Mara (época seca) contra dichas bacterias fue evidente pero de manera bacteriostática. Con respecto a *S. aureus* se menciona en la literatura la importancia que tiene el uso de la miel contra dicha bacteria ya que ha desarrollado resistencia a muchos antibióticos [12]; por otro lado, la miel de abejas resulta un antiséptico adecuado contra infecciones causadas por *Pseudomonas* [4].

En la FIG. 6, se observa que la bacteria mayormente afectada en su crecimiento fue *B. subtilis* ($P < 0,001$), con halos de inhibición de 20 mm a la concentración de 15%, incrementando su valor de halo de inhibición a 23 mm, a las concentraciones de 45% y 50%. Un comportamiento similar lo mostró *L. monocytogenes*, resultando la segunda bacteria más afectada, con valores de 19 mm de halos de inhibición a las concentraciones de 45% y 50%. Con relación al *B. subtilis*, Rybak y Szczesna [18] encontraron susceptibilidad de dicha bacteria a concentraciones del 5 y 10% de miel Buckwheat. Las bacterias menos afectadas por la miel de Mara fueron *P. aeruginosa* y

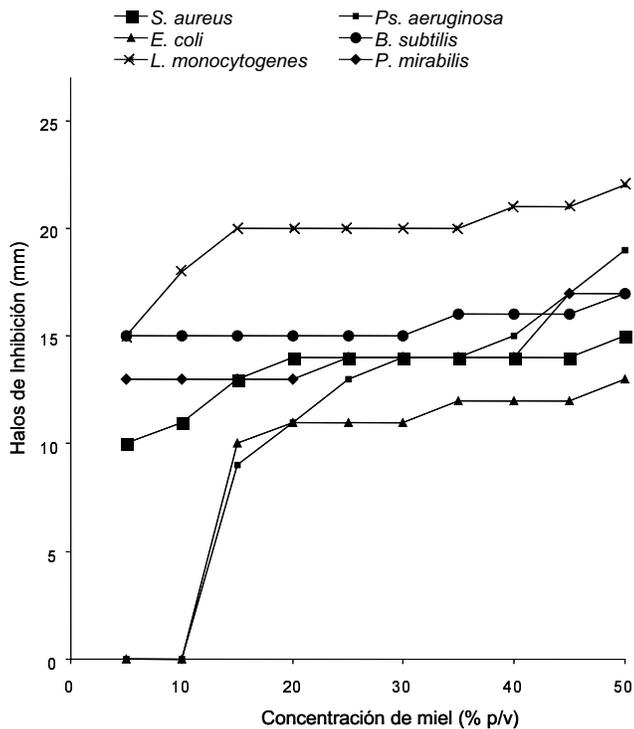


FIGURA 5. VALORES DE HALOS DE INHIBICIÓN (MM) DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR EFECTO DE MUESTRAS DE MIEL PURA DILUIDA CON AGUA DESTILADA, PROVENIENTE DE LA ZONA DE MARA, DURANTE LA ÉPOCA SECA.

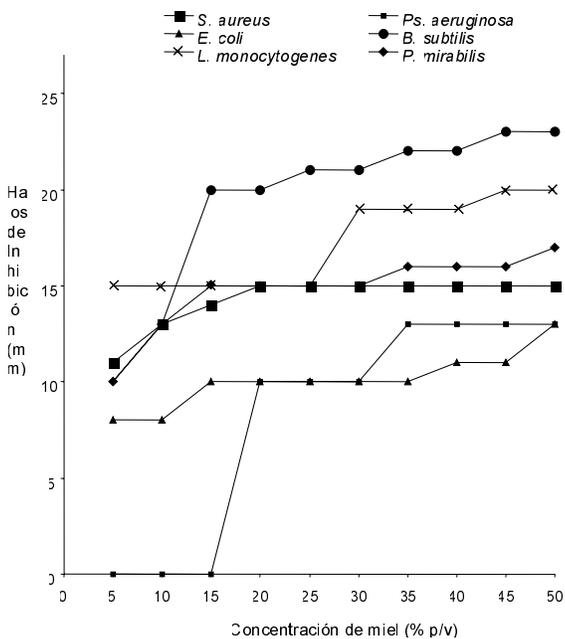


FIGURA 6. VALORES DE HALOS DE INHIBICIÓN (MM) DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR EFECTO DE MUESTRAS DE MIEL PURA DILUIDA CON AGUA DESTILADA, PROVENIENTE DE LA ZONA DE MARA, DURANTE LA ÉPOCA LLUVIOSA.

E. coli, donde la primera fue inhibida en su crecimiento a concentraciones mayores o iguales a 20%. Rios y Novoa [17] en mieles procedentes del estado Cojedes, Venezuela, resaltaron el efecto bacteriostático a concentraciones de 5% al 25%, sobre cepas de *B. subtilis*, *Listeria spp.*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, donde esta última resultó menos sensible, al igual que en el presente estudio.

En las FIGS. 7 y 8 se muestra la actividad antibacteriana de la miel de abeja de Caja Seca, durante la época seca y lluviosa, respectivamente. Se puede observar que las mieles mostraron una actividad antibacteriana frente a todas las bacterias y concentraciones, a excepción de *P. aeruginosa* que solo resultó ser inhibida a concentraciones mayores o iguales a 40%, mostrando diferencias significativas ($P < 0,001$) con mieles de ambas épocas. En esas mismas Figuras se observa que *L. monocytogenes* resultó mayormente afectada a las concentraciones entre 5 y 35%, en relación al resto de las bacterias. *P. mirabilis* a nivel de 40 y 50% de concentración de miel resultó con valores de halos de inhibición mayores que *L. monocytogenes*. Willix y col. [21] encontraron susceptibilidad de cepas de *P. aeruginosa* y *P. mirabilis*, a concentraciones iguales o menores a 7,4% tanto en miel de Manuka como de Rewarewa, destacando que la primera bacteria fue la menos sensible, así como se presentó en la siguiente investigación.

El resto de las cepas bacterianas ensayadas resultaron afectadas en su crecimiento, con halos de inhibición a partir de 8 mm; por otra parte, se observó un efecto muy particular en las bacterias *B. subtilis*, *S. aureus* y *E. coli*, y fue que sus mayores picos de sensibilidad resultaron a la concentración de 50%.

CONCLUSIONES

La miel de abejas procedente de las cuatro zonas del estado Zulia, Venezuela, difieren sustancialmente en su actividad antibacteriana frente a bacterias de origen clínico. La bacteria más resistente al efecto de las mieles analizadas fue *Pseudomonas aeruginosa*, no obstante resultó afectada mayormente con la miel de Mara y en menor grado por la miel de La Rinconada (época lluviosa) y Mara. *Listeria monocytogenes* fue la bacteria más sensible tanto a las mieles analizadas como a las concentraciones ensayadas. En general el efecto inhibitorio encontrado en las mieles zulianas sugiere el uso de un tratamiento alternativo para el control clínico de afecciones y/o infecciones de superficie asociadas con las bacterias antes mencionadas, así como a especies de alta resistencia a los antibióticos como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, que suelen llegar al hombre a través del ambiente o por consumo de alimentos.

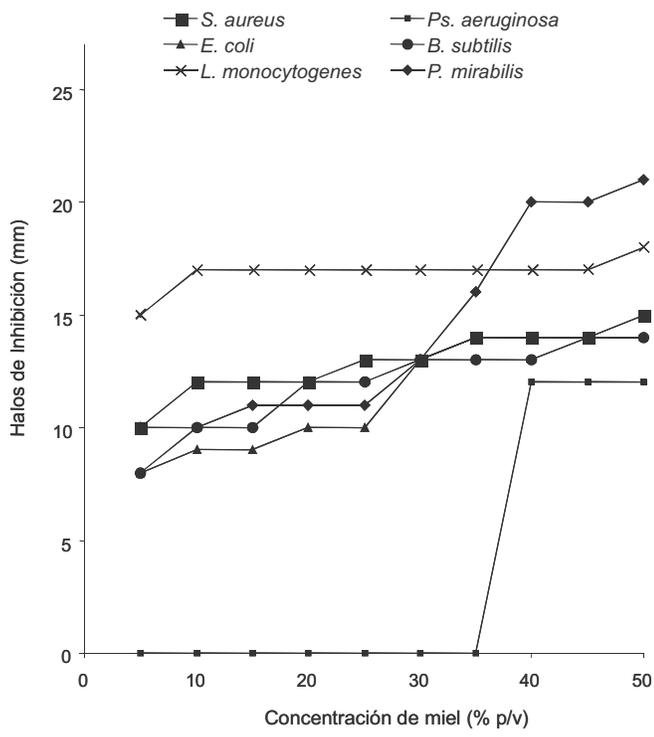


FIGURA 7. VALORES DE HALOS DE INHIBICIÓN (MM) DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR EFECTO DE MUESTRAS DE MIEL PURA DILUIDA CON AGUA DESTILADA, PROVENIENTE DE LA ZONA DE CAJA SECA, DURANTE LA ÉPOCA SECA.

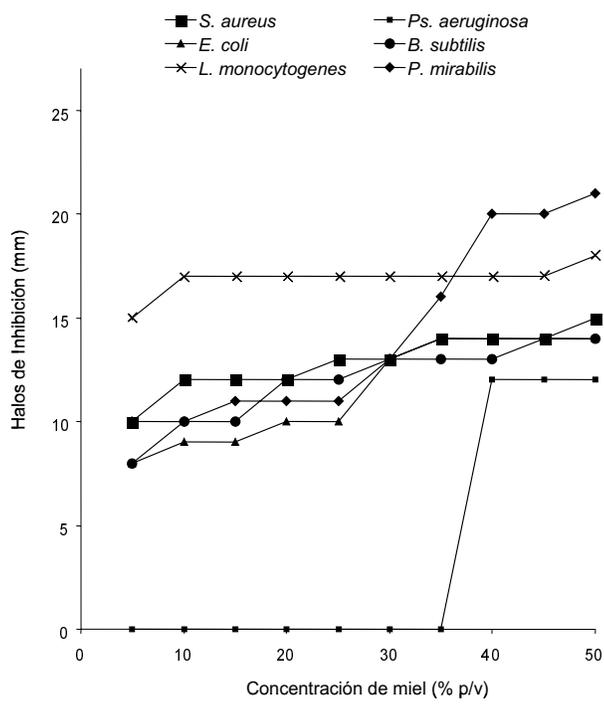


FIGURA 8. VALORES DE HALOS DE INHIBICIÓN (MM) DEL CRECIMIENTO BACTERIANO POR EFECTO DE MUESTRAS DE MIEL PURA DILUIDA CON AGUA DESTILADA, PROVENIENTE DE LA ZONA DE CAJA SECA, DURANTE LA ÉPOCA SECA.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES), por el financiamiento que hizo posible la presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALLEN, K.; MOLAN, P.; REID, G. A survey of the activity of some New Zealand honeys. **J. Pharm. Pharmacol.** 43: 817-822. 1991.
- [2] ARMSTRONG, S.; OTIS, G. The antibacterial properties of honey. **Bee Culture** 123: 500-502. 1995.
- [3] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma 2191 acerca de Miel de abejas. Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela. 1984.
- [4] COOPER, R.; MOLAN, P. The use of honey as an antiseptic in managing *Pseudomonas* infection. **J. Wound Care** 8: 161-164. 1999.
- [5] COOPER, R.; MOLAN, P.; HARDING, K. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. **J. Royal Societ. Medicine** 92: 283-285. 1999.
- [6] EFFEN, S.; UDOH, K.; IWARA, C. The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance. **Infect** 20: 227-229. 1992.
- [7] LESZCZYNSKA, A.; FIK, M. Antibacterial properties of various types of honey and the effect of honey heating on antibacterial activity. **Medycyna Weterynaryjna** 49: 9, 415-419. 1993.
- [8] MANUALES INTEGRALES. **Como cura la miel.** Oasis S. L. Barcelona. 45-46. España. 1997.
- [9] McCARTHY, J. The antibacterial effects of honey: Medical fact or fiction. **American Bee J.** Mayo: 341-343. 1995.
- [10] McINERNEY, R. Honey a remedy rediscovered. **J. Royal Societ. Medicine** 83: 127-129. 1990.
- [11] MOLAN, P.; ALLEN, K. The effect of gamma-irradiation on the antibacterial activity of honey. **J. Pharm. Pharmacol.** 48:1206-1209. 1996.
- [12] MOLAN, P. Honey for the treatment of infections. **Bee Informed** 3: 2, 6-7,9. 1996.
- [13] MOLAN, P. The antibacterial activity of honey. **Bee World** 73: 5-28, 59-76. 1992.
- [14] NABRDALIK, M.; SKARBEB, R. Inhibitory properties of bees honey. **Medycyna Weterynaryjna** 30:669-670. 1974.
- [15] PHILIPPE, J. **Guía del Apicultor.** Mundi-Prensa. 2a. Edición. Madrid, España. pp. 287-317. 1990.

- [16] POSTMES, T.; BOGAARD, A.; HAZEN, M. Honey for wounds, ulcers and skin graft preservation. **Lancet British Edition** 341: 756-757. 1993.
- [17] RÍOS, A.; NOVOA, L. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (C.M.I.) y las características de las propiedades antibacterianas (bactericidas o bacteriostáticas) de miel de *Apis mellifera* de origen multifloral procedente del Estado Cojedes (Venezuela). **I Congreso Venezolano de Ciencia y Tecnología de Alimentos "Dr. Nikita Czyhrinciw"**. Caracas, marzo, Venezuela: 94. 1996.
- [18] RYBAK-CHMIELEWSKA, H.; SZCZESNA, T. Antibacterial activity of honey. **Pszczelnicze Zeszyty Naukowe** 40: 279-280. 1996.
- [19] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE INC. **SAS Users Guide statistics**. Cary, NC. Version 5,0. 1985.
- [20] UROSA, F. **La Apicultura y sus bondades**. América C.A. Caracas, Venezuela. 13-68. 1987.
- [21] WILLIX, D.; MOLAN, P.; HARFOOT, C. A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey. **J. Appl. Bacteriol.** 73: 388-394. 1992.