Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Programa de Pós-Graduação em Genética

Atividade antimicrobiana dos meis produzidos por *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão nativas do Brasil

Matheus de Oliveira Bazoni

**Ribeirão Preto
2012**

Matheus de Oliveira Bazoni

Atividade antimicrobiana dos meis produzidos por *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão nativas do Brasil

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. David de Jong.

**Ribeirão Preto
2012**

Bazoni, Matheus de Oliveira

Atividade antimicrobiana dos meis produzidos por *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão nativas do Brasil. 116 f.: il. ; 29,7 cm.

Orientador: Prof. Dr. David de Jong.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2012.

1. mel. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Apiterapia.

Ofereço:

À minha mãe e ao meu pai pelos ensinamentos, educação e apoio incondicional em todos
os momentos

Aos meus irmãos pelo carinho e apoio prestados a todo o momento

Minha eterna gratidão

Dedico:

À minha filha Laura, que me fortalece para lutar e alcançar meus objetivos.

Agradecimentos

À Deus por me dar saúde e força para vencer mais uma etapa de minha vida.

Ao prof. Dr. David de Jong pela oportunidade concedida, disposição e confiança depositada durante a realização deste trabalho.

À Universidade de São Paulo, em especial a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Genética.

À Capes pelo suporte financeiro através da bolsa de doutorado.

Aos professores Nilce M. Martinez Rossi, Juliana Pfrimer Falcão e Luis Alberto Beraldo de Moraes por disponibilizarem recursos de seus laboratórios para realização deste trabalho.

Aos professores Cláudia Maria Leite Maffei, Antonio Cláudio Tedesco, por esclarecer as dúvidas sobre as metodologias utilizadas.

Aos funcionários Marcos Diogo Martins, Mendelson Mazucato, Jaqueline Passaglia, Sidney Matheus.

Aos amigos Thiago Greggio, Julio Bortolossi, Joyce Izidoro pela amizade e pelos ótimos momentos.

Ao Ayrton Vollet pelo auxílio nas coletas de mel das abelhas sem ferrão no Meliponário do Departamento de Ecologia da FFCLRP.

Aos colegas Fábio Campioni e Fernanda Figueiro pela ajuda indispensável em partes dos experimentos, pela amizade e convívio.

As colegas Gabriela Persinoti, Nálu Peres pelo auxílio nas análises, e também por sanar qualquer dúvida que tivesse.

À Geusa Freitas pela ajuda indispensável na análise polínica.

À Roseli de Aquino Ferreira e ao Paulo Fenerich pela amizade, correção da tese e sugestões.

À Luciana Carnier pelos ótimos momentos, amizade, carinho, compreensão e ajuda na formatação da tese.

Aos companheiros do laboratório de Genética Molecular e de Microorganismos: Rodrigo Cazzaniga, Tiago Jacob, Larissa Gomes da Silva, Nieve Mendes.

Aos colegas do laboratório de Bacteriologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP: Priscila Imore, Roberto Souza, Miliane Frazão, Luisa Campos, pelo convívio e pelos bons momentos.

Aos companheiros do laboratório de Biologia e desenvolvimento de Abelhas APILAB: Fabrício Capellario, Joyce Volpini, Rogério Pereira, Michele Manfrini, Daiana de Souza, Diego Moretti, Aline Turcato, Clycie Machado, Thiago Franco.

Às secretarias do Departamento de Genética, Susie Nalon e Silvia, pela atenção, esclarecimentos e serviços prestados.

À CAPES, CNPq, FAEPA e FAPESP pelos auxílios concedidos.

E, finalmente a todos, que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

Resumo

Bazoni, M. O. 2012. **Atividade antimicrobiana dos meis produzidos por *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão nativas do Brasil**. 116 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Nós avaliamos a atividade antimicrobiana do mel coletado de ninhos de 12 espécies de abelhas nativas sem ferrão comumente encontrados no Brasil e 25 amostras de mel de *Apis mellifera* não pasteurizados que foram identificadas como sendo unifloral e uma amostra de mel multifloral. A atividade antimicrobiana de cada amostra de mel foi testada contra cinco espécies de bactérias patogênicas, uma espécie de fungo patogênico e uma espécie de levedura patogênica, comparando esta atividade com o mel terapêutico de manuka produzido por abelhas *Apis mellifera* na Nova Zelândia a partir do néctar de *Leptospermum scoparium* (Myrtaceae). Cinco das treze amostras de mel das abelhas sem ferrão foram bactericidas e oito foram fungicidas contra o fungo patogênico *Trichophyton rubrum*. Somente a levedura *Candida albicans* foi resistente a todas as amostras de mel. As amostras de mel de *Apis mellifera* que apresentaram atividade bactericida foram caju, romã e cana, nenhuma das amostras de mel de *A. mellifera* afetou o fungo *T. rubrum*. Os meis de *Nannotrigona testaceicornis*, *Plebeia remota*, *Tetragona clavipes* e *Scaptotrigona depilis* todos com alto nível de atividade antimicrobiana, foram significativamente mais eficiente em termos de atividade antimicrobiana que o mel de manuka, especialmente contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *T. rubrum*. O mel artificial feito com os principais açúcares encontrados no mel e com teor de água semelhante, não teve atividade antimicrobiana em nossas análises. Nós também fizemos análises de espectrometria de massas das amostras de mel e encontramos alguns "fingerprint" característicos que foram associadas com a atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: 1. mel. 2. atividade antimicrobiana. 3. apiterapia.

Abstract

Bazoni, M. O. 2012. **Antimicrobial activity of honey produced by *Apis mellifera* and native Brazilian stingless bees.** 116 p. PhD – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

We evaluated the antimicrobial activity of honey collected from nests of 12 species of native stingless bees commonly found in Brazil and 25 unpasteurized honey samples of *Apis mellifera* that were identified as being unifloral and one multifloral honey sample. The antimicrobial activity of each honey sample was tested against five species of pathogenic bacteria, a pathogenic fungal species and a pathogenic yeast species, comparing this activity with therapeutic manuka honey produced by *Apis mellifera* bees in New Zealand from the nectar of *Leptospermum scoparium* (Myrtaceae). Five of thirteen samples of honey from the stingless bees were bactericidal and eight were fungicidal against the pathogenic fungus *Trichophyton rubrum*. Only the yeast *Candida albicans* was resistant to all honey samples. The *Apis mellifera* honey samples that showed bactericidal activity were caju, romã e cana, none of the *A. mellifera* honey samples affected the fungus *T. rubrum*. The honeys from *Nannotrigona testaceicornis*, *Plebeia remota*, *Tetragona clavipes* and *Scaptotrigona depilis* all had a high degree of antimicrobial activity, they were significantly more efficient in terms of antimicrobial activity than manuka honey, especially against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *T. rubrum*. Artificial honey, made with the main sugars found in honey and with similar water content, had no antimicrobial activity in our analyses. We also made mass spectrometry analyses of the honey samples and found some “fingerprint” characteristics that were associated with antimicrobial activity.

Keywords: 1. honey. 2. antimicrobial activity. 3. apitherapy.

Lista de figuras

Figura 1: Aspecto da colônia de <i>Klebsiella pneumoniae</i> cultivada no meio Müller Hinton ágar (A); Fotomicrografia eletrônica mostrando sua forma de bastonete (B); Infecção na pele humana, Tromboflebite superficial (C). http://www.picsearch.com/pictures/Science	31
Figura 2: Aspecto da colônia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cultivada no meio Müller Hinton ágar (A); Fotomicrografia eletrônica mostrando sua forma baciliforme (B); Infecção na pele humana (C) http://www.picsearch.com/pictures/Science	32
Figura 3: Aspecto da colônia de <i>Staphylococcus aureus</i> cultivada no meio Müller Hinton ágar (A); Fotomicrografia eletrônica mostrando sua forma esférica (B); Infecção na pele humana (C). http://www.picsearch.com/pictures/Science	33
Figura 4: Aspecto da colônia de <i>Candida albicans</i> cultivada no meio Müller Hinton ágar (A); Fotomicrografia eletrônica mostrando sua forma baciliforme (B); Infecção na pele humana (C). http://www.picsearch.com/pictures/Science	34
Figura 5: Característica da colônia de <i>Trichophyton rubrum</i> cultivada em meio Sabouraud ágar (A); e seus macroconídios e microconídios (B); Infecção do tipo <i>tinea unguium</i> (C). http://www.mycology.adelaide.edu.au	35
Figura 6: Coleta de mel dos potes conservados dentro dos ninhos de abelhas sem ferrão.....	42
Figura 7: Esquema ilustrativo do procedimento de extração em fase sólida.....	50
Figura 8: Halos de inibição formados pelo método de difusão em ágar, demonstrando os diferentes níveis de atividade antimicrobiana dos meis.....	56
Figura 9: Diferentes níveis de inibição do crescimento da bactéria <i>E. coli</i> causados pelos meis das abelhas sem ferrão, comparado com atividade do mel de manuka da Nova Zelândia e com xarope. “*” = meis que foram mais eficientes que manuka; Mka = manuka; Cn = Controle negativo - xarope com 80% de açúcar.....	57
Figura 10: Diferentes níveis de inibição do crescimento da bactéria <i>K. pneumoniae</i> causados pelos meis das abelhas sem ferrão, comparado com atividade do mel de manuka da Nova Zelândia e com xarope.....	57

Figura 11: Diferentes níveis de inibição do crescimento da bactéria <i>S. aureus</i> 25923 causados pelos meis das abelhas sem ferrão, comparado com atividade do mel de manuka da Nova Zelândia e com xarope.....	58
Figura 12: Diferentes níveis de inibição do crescimento da bactéria <i>S. aureus</i> 43300 causados pelos meis das abelhas sem ferrão, comparado com atividade do mel de manuka da Nova Zelândia e com xarope.....	59
Figura 13: Diferentes níveis de inibição do crescimento da bactéria <i>P. aeruginosa</i> causados pelos meis das abelhas sem ferrão, comparado com atividade do mel de manuka da Nova Zelândia e com xarope.....	59
Figura 14: Diferentes níveis de inibição de crescimento do fungo patogênico <i>T. rubrum</i> causados pelos meis das abelhas sem ferrão, comparado com atividade do mel de manuka da Nova Zelândia e com xarope.....	60
Figura 15: Inibição do crescimento da bactéria <i>E. coli</i> causada pelos meis de diferentes floradas produzidas pelas abelhas <i>Apis mellifera</i> no Brasil, comparando a atividade das amostras com a atividade do mel de manuka da Nova Zelândia e com xarope 80% de açúcar.....	62
Figura 16: Inibição do crescimento da bactéria <i>K. pneumoniae</i> causada pelos meis de diferentes floradas produzidas pelas abelhas <i>Apis mellifera</i> no Brasil, comparando a atividade das amostras com a atividade do mel de manuka e com xarope.....	63
Figura 17: Inibição de crescimento da bactéria <i>S. aureus</i> 25923 causada pelos meis de diferentes floradas produzidas pelas abelhas <i>Apis mellifera</i> no Brasil, comparando a atividade das amostras com a atividade do mel de manuka e com xarope.....	64
Figura 18: Inibição do crescimento da bactéria <i>S. aureus</i> 43300 causada pelos meis de diferentes floradas produzidas pelas abelhas <i>Apis mellifera</i> no Brasil, comparando a atividade das amostras com a atividade do mel de manuka e com xarope.....	64
Figura 19: Inibição do crescimento da bactéria <i>P. aeruginosa</i> causada pelos meis de diferentes floradas produzidas pelas abelhas <i>Apis mellifera</i> no Brasil, comparando a atividade das amostras com a atividade do mel de manuka e com xarope.....	65

Figura 20: Ausência da atividade antifúngica apresentada pelos meis das diferentes floradas produzidas pelas abelhas <i>Apis mellifera</i> no Brasil.....	65
Figura 21: Atividade fungicida do mel de <i>T. clavipes</i> na concentração de 325 mg/mL promovendo 100% de morte e atividade inibitória na concentração de 260 mg/mL promovendo 99,8% de morte (A); atividade fungicida do mel de <i>S. depilis</i> na concentração de 455 mg/mL promovendo 100% de morte e atividade inibitória na concentração de 390 mg/mL promovendo 97,7% de morte (B).....	72
Figura 22: PCA da análise dos dados de <i>fingerprints</i> ESI(-)-EM para as amostras dos meis de abelhas sem ferrão nativas do Brasil, (para abreviação das espécies, consultar Tabela 2).....	81
Figura 23: Análise por espectrometria de massa <i>fingerprints</i> ESI(-)-EM dos meis de abelhas sem ferrão nativas do Brasil. (A) <i>T. angustula</i> de Minas Gerais – Grupo 1; (B) <i>F. varia</i> – Grupo 1; (C) <i>T. clavipes</i> – intermediária Grupos 1 e 2; (D) <i>M. bicolor</i> – Grupo 2; (E) <i>T. angustula</i> de São Paulo – Grupo 2; (F) <i>S. depilis</i> – intermediária Grupos 2 e 3; (G) <i>P. remota</i> – Grupo; (H) <i>M. subnitida</i> – Grupo 3; (I) <i>P. droryana</i> – não se assemelhou a nenhuma das amostras.....	83
Figura 24: Agrupamento das amostras dos meis de <i>Apis mellifera</i> do Sudeste e Nordeste do Brasil pela análise de PCA do <i>fingerprint</i> ESI(-)-EM.....	86
Figura 25: Análise por espectrometria de massa <i>fingerprints</i> ESI(-)-EM dos meis de <i>Apis mellifera</i> (J) mel de eucalipto – Grupo 1; (K) mel de caju – Grupo 1; (L) mel de algaroba localizado próximo ao Grupo 1; (M) mel de romã e (N) mel de cana-de-açúcar – não se assemelharam com nenhuma das amostras.....	87
Figura 26: Pólenes encontrados na amostra de mel de <i>Tetragonisca angustula</i> (SP). (A) Rutaceae; (B) Anacardiaceae; (C) Poaceae; (D) Fabaceae (gênero <i>Mimosa</i>); (E) Fabaceae (gênero <i>Caesalpinia</i>); (F) Anacardiaceae.....	91
Figura 27: Pólenes encontrados na amostra de mel de <i>Tetragonisca angustula</i> (MG). (A) Asteraceae (gênero <i>Aspilia</i>); (B) Amaranthaceae; (C) Anacardiaceae; (D) Poaceae; (E) Fabaceae (gênero <i>Adenantha</i>); (F) Asteraceae.....	91
Figura 28: Pólenes encontrados na amostra de mel de <i>Plebeia remota</i> . (A) Fabaceae (gênero <i>Mimosa</i>); (B) Poaceae; (C) Araceae; (D) Solanaceae; (E) Rutaceae; (F) Arecaceae.....	92
Figura 29: Pólenes encontrados na amostra de mel de <i>Plebeia droryana</i> . (A) Anacardiaceae; (B) Malpighiaceae; (C) Myrtaceae; (D) Sapindaceae; (E) Araceae; (F) Rubiaceae.....	92

Figura 30: Pólens encontrados na amostra de mel de *Nannotrigona testaceicornis*. (A) Melastomataceae; (B) Fabaceae (gênero *Delonix*); (C) Fabaceae (gênero *Caesalpinia*); (D) Amaranthaceae; (E) Fabaceae (gênero *Caesalpinia*); (F) Asteraceae.....93

Figura 31: Pólen encontrado na amostra de mel de *Tetragona clavipes*. (A) Poaceae; (B) Myrtaceae; (C) Anacardiaceae; (D) Fabaceae (gênero *Delonix*); (E) Asteraceae; (F) Malpighiaceae.....94

Figura 32: Pólens encontrados na amostra de mel de *Melipona scutellaris*. (A) Amaryllidaceae; (B) Myrtaceae; (C) Fabaceae (gênero *Mimosa*); (D) Poaceae.....95

Figura 33: Pólens encontrados na amostra de mel de *Melipona quadrifasciata*. (A) Solanaceae; (B) Anacardiaceae; (C) Fabaceae (gênero *Mimosa*).....95

Figura 34: Pólens encontrados na amostra de mel de *Frieseomelitta varia*. (A) Fabaceae (gênero *Piptadenia*); (B) Amaranthaceae; (C) Rutaceae; (D) Fabaceae (gênero *Mimosa*); (E) Melastomataceae (F) Myrtaceae (gênero *Eucalyptus*); (G) Fabaceae (gênero *Caesalpinia*); (H) Fabaceae (gênero *Delonix*); (I) Fabaceae.....97

Figura 35: Pólens encontrados na amostra de mel de *Melipona bicolor*. (A) Anacardiaceae; (B) Myrtaceae (gênero *Eucalyptus*); (C) Solanaceae; (D) Fabaceae (gênero *Caesalpinia*); (E) Burseraceae; (F) Bignoniaceae.....98

Figura 36: Pólens encontrados na amostra de mel de *Melipona subnitida*. (A) Arecaceae; (B) Poaceae e Fabaceae; (C) Anacardiaceae; (D) Boraginaceae; (E) Fabaceae (gênero *Mimosa*); (F) Amaranthaceae.....98

Figura 37: Pólens encontrados na amostra de mel de *Scaptotrigona depilis*. (A) Sapindaceae; (B) Myrtaceae (gênero *Eucalyptus*); (C) Fabaceae (gênero *Caesalpinia*) ; (D) Fabaceae; (E) Fabaceae (gênero *Caesalpinia* sp2); (F) Anacardiaceae.....99

Lista de tabelas

Tabela 1: Identificação floral e origem das mostras de mel produzidas por <i>Apis mellifera</i>	40
Tabela 2: Relação das espécies de abelhas sem ferrão e origem das amostras de mel coletas.....	41
Tabela 3: Constituintes do meio RPMI-1640.....	44
Tabela 4: Teste de sensibilidade das linhagens bacterianas frente aos antibióticos comerciais frequentemente utilizados.....	61
Tabela 5: Determinação das concentrações CBM e CIM dos meis das abelhas sem ferrão.....	70
Tabela 6: Determinação das concentrações CIM, CBM e CFM dos meis das abelhas sem ferrão...	71
Tabela 7: Determinação das concentrações CIM, CBM dos meis de <i>Apis mellifera</i>	74
Tabela 8: Determinação das concentrações CIM, CBM e CFM dos meis de <i>Apis mellifera</i>	75
Tabela 9: Valores de pH encontrado nas amostras de mel.....	78

Sumário

1 Introdução	19
1.1 Mel	19
1.2 Processo de formação do mel	19
1.3 Principais substâncias encontradas no mel	20
1.3.1 Proteínas.....	21
1.3.2 Ácidos	21
1.3.3 Flavonóides	22
1.4 Umidade no mel	23
1.5 Tipos de mel.....	24
1.6 Propriedades do mel restringem o crescimento microbiano	24
1.7 Principais atividades biológicas atribuídas ao mel.....	25
1.7.1 Atividade higroscópica	26
1.7.2 Atividade anti-inflamatória	27
1.7.3 Atividade desodorizante	28
1.7.4 Estimulação da cura de feridas.....	28
1.7.5 Função de barreira física.....	29
1.8 Mel de manuka.....	29
1.9 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	30
1.10 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
1.10.1 Mecanismos de resistência da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
1.11 <i>Staphylococcus aureus</i>	32
1.12 <i>Candida albicans</i>	33
1.13 <i>Trichophyton rubrum</i>	34
2. Objetivos.....	38
3. Material e Métodos	40
3.1 Mel de <i>Apis mellifera</i>	40
3.2 Mel das abelhas sem ferrão.....	41
3.3 Mel artificial.....	42
3.4 Micro-organismos utilizados	42
3.4.1 Linhagens Fúngicas	42
3.4.2 Linhagens bacterianas.....	43
3.5 Meios de cultura.....	43
3.5.1 Meio Sabouraud	43

3.5.2 Meio Malt Extract Agar	43
3.5.3 Meio RPMI	43
3.6 Reagentes	44
3.7 Preparo da suspensão de conídios	45
3.7.1 Linhagem de <i>Trichophyton rubrum</i>	45
3.7.2 Teste de inibição pelo método de difusão em ágar.....	45
3.7.3 Determinações da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	46
3.8 Preparação do inóculo bacteriano	47
3.8.1 Teste de susceptibilidade pelo método de difusão em ágar	47
3.8.2 Teste de sensibilidade	48
3.8.3 Determinações da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	48
3.9 Extração em fase sólida	49
3.9.1 Análise de <i>Fingerprinting</i> por espectrometria de massas.....	50
3.9.2 Análise quimiométrica dos dados.....	51
3.10 Análise de pH.....	51
3.11 Análise polínica pelo método de acetólise.....	52
3.11.1 Preparação da mistura de acetólise	52
3.11.2 Aplicação da mistura de acetólise no material polínico	52
3.11.3 Preparação das lâminas	53
4. Resultados e Discussão	55
4.1 Atividade antimicrobiana a partir da análise do método de difusão em ágar	55
4.2 Teste de Microdiluição para determinação da CIM, CBM e CFM.....	68
4.3 Análise do nível de atividade antimicrobiana do mel a partir das variações de pH ..	76
4.4 Análise por espectrometria de massas e análise quimiométrica do mel das abelhas sem ferrão	79
4.5 Análise por espectrometria de massas e análise quimiométrica dos meis de <i>Apis mellifera</i>	84
4.6 Análise dos grãos de pólen nas amostras de mel	88
5. Conclusões	101
6. Referências Bibliográficas	104

Introdução

1 Introdução

1.1 Mel

O mel se apresenta, em condições normais, como uma solução líquida com baixo teor de água e alta concentração de matéria seca (COUTO & COUTO, 2006). É reconhecido, desde os primórdios da civilização, pelas suas propriedades medicinais, sendo um produto natural elaborado pelas abelhas sociais. As abelhas pertencem à classe Insecta e ordem Hymenoptera. Taxonomicamente estão reunidas na superfamília Apoidea (CULLINEY, 1983), que se divide em oito famílias, com mais de 20.000 espécies diferentes, cerca de 3.000 no Brasil. As abelhas mais conhecidas vivem em sociedade e pertencem à família Apidae. Dentro desta família estão às abelhas indígenas sem ferrão ou Meliponíneos encontradas em nosso país como: *Melipona quadrifasciata*, *Tetragonisca angustula*, *Frieseomelitta varia*, entre outras, e as abelhas da espécie *Apis mellifera*, que se destacam por serem exploradas para obtenção especialmente do mel estocado em suas colméias e da polinização.

1.2 Processo de formação do mel

As abelhas obtêm a maior parte da energia de que precisam a partir de carboidratos na forma de açúcares produzidos pelas plantas, provenientes do néctar encontrado nas flores e também ocasionalmente, em nectários extraflorais ou secreções de insetos que se alimentam em plantas (COUTO & COUTO, 2006). O néctar floral, produzido pelas plantas para atrair polinizadores, é uma secreção aquosa da planta que contém de 5 a 75% de açúcar, sendo os principais: sacarose, glicose, frutose e, pequenas quantidades de compostos nitrogenados, minerais, ácidos orgânicos, vitaminas, lipídeos, pigmentos e substâncias aromáticas (WHITE, 1975). Após ser coletado pelas operárias forrageadoras é levado até o ninho dentro da vesícula melífera. Na colméia, essas

abelhas regurgitam o néctar transferindo-o para as operárias da casa para ser processado, passando, então, por dois processos para se transformar em mel, um processo físico que é a desidratação do néctar e outro químico que é a transformação dos açúcares presentes (COUTO & COUTO, 2006).

Enzimas das glândulas hipofaríngeas, especialmente diástase, glicose oxidase e invertase são adicionadas ao néctar durante a coleta. Essas enzimas são responsáveis pela quebra dos amidos, formação do peróxido de hidrogênio e quebra dos açúcares em formas invertidas simples de glicose e frutose (STANDIFER, 1967), que são mais facilmente digeridas pelas abelhas, protegendo também o mel armazenado de ataques bacterianos. O néctar é evaporado sobre a língua da operária e colocado em alvéolos para evaporação adicional através da ventilação, sendo o teor de água reduzido até 18% aproximadamente a fim de proteger a solução da ação das leveduras e promover assim o armazenamento de um alimento altamente energético em um espaço mínimo. Quando a atividade enzimática e a evaporação da água estão completas, considera-se que o néctar está “maduro” e pode, então, ser chamado de mel (SEELEY, 1985).

1.3 Principais substâncias encontradas no mel

O mel é um alimento altamente nutritivo, devido à concentração de açúcares, vitaminas e sais minerais. Possui grandes quantidades de açúcares simples (média de 32% de glicose e 38% de frutose), além de possuir pequenas quantidades de outros açúcares (sacarose, maltose, outros dissacarídeos e açúcares superiores), sais minerais (potássio, sódio, cloro, enxofre, cálcio, fósforo, silício, ferro e magnésio), aminoácidos e enzimas (invertase, amilase, diastase, inulase, glicose oxidase, catalase e fosfatase), (WHITE, 1967). Outras enzimas, como a alfa-glicosidase, peroxidase e lipase, também já foram detectadas no mel por diferentes autores (SCHEPARTZ & SUBERS, 1966; WHITE & KUSHINIR, 1967; HUIDOBRO *et al*, 1995). Podendo ocorrer também

traços de vitaminas (tiamina, riboflavina, ácido nicotínico, vitamina K, ácido fólico, biotina, piridoxina), possivelmente provenientes do pólen. Além disso, o mel contém alguns pigmentos e substâncias aromáticas, (COUTO & COUTO, 2006).

A filtração do mel para fim comercial pode reduzir o conteúdo de vitaminas, exceto para a vitamina K (HAYDAK *et al*, 1943). Segundo Kitzes *et al*, (1943), tal filtração retira o pólen do mel que é o responsável pela presença de vitaminas no mel.

1.3.1 Proteínas

Em concentrações bem menores, comparado com as outras substâncias descritas anteriormente, encontram-se as proteínas a qual tem duas origens, vegetal e animal. A origem vegetal advém do néctar e do pólen; já a origem animal é proveniente da própria abelha (WHITE & RUDYJ, 1978). No segundo caso, trata-se de constituintes das secreções das glândulas salivares das abelhas (CAMPOS, 1987). Wootton *et al*, (1976), constatarem em seis amostras de mel australianas os seguintes aminoácidos livres: leucina, isoleucina, histidina, metionina, alanina, fenilalanina, glicina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutâmico, prolina, valina, cisteína, tirosina, lisina e arginina. Dentre esses aminoácidos, a prolina, proveniente das secreções salivares das abelhas apresenta os maiores valores, variando entre 0,2% a 2,8%. Juntamente com o conteúdo de água, sua concentração pode ser usada como um parâmetro de identificação da "maturidade" do mel (COSTA *et al*, 1999). Segundo Von Der Ohe, Dustmann & Von Der Ohe (1991), são necessários pelo menos 200 mg de prolina/kg de mel para se considerar um mel “maduro”.

1.3.2 Ácidos

Os ácidos orgânicos do mel representam menos que 0,5% dos sólidos, tendo um pronunciado efeito no flavor, podendo ser responsáveis em parte pela excelente

estabilidade do mel frente a microorganismos. Cerca de dezoito ácidos orgânicos já foram encontrados no mel. Sabe-se que o ácido glucônico está presente em maior quantidade, cuja presença relaciona-se com as reações enzimáticas que ocorrem durante o processo de amadurecimento. Já em menor quantidade, podem-se encontrar outros ácidos como: acético, butírico, láctico, oxálico, fórmico, málico, succínico, pirúvico, glicólico, cítrico, butiricolático, tartárico, maléico, piroglutâmico, alfa-cetoglutárico, alfa ou beta-glicerofosfato e vínico (STINSON *et al*, 1960; WHITE, 1975; MENDES & COELHO, 1983).

Os méis de manuka e de viperina (*Echium vulgare*), apresentam alta atividade antimicrobiana, podendo essa atividade estar relacionada com a presença de alguns tipos de ácido (WILKINS *et al*, 1983). Tan *et al*, (1988), constataram alguns ácidos aromáticos no mel monofloral de manuka (*Leptospermum scoparium*) que não estavam presentes no néctar de suas flores.

1.3.3 Flavonóides

Os componentes menores do mel, como os materiais "flavorizantes" (aldeídos e álcoois), pigmentos, ácidos e minerais, influenciam consideravelmente nas diferenças entre tipos de mel. Sabatier *et al*, (1992) detectaram alguns flavonóides presentes no mel de girassol. Em maiores concentrações, foram encontrados os seguintes flavonóides: pinocembrina (5,7-dihidroxi-flavona), pinobanksina (3,5,7-trihidroxi-flavanona), crisina (5,7-dihidroxi-flavona), galangina (3,5,7-trihidroxi-flavona) e quercetina. Em menores concentrações foram encontrados tectocrisina, quenferol (3,5,7,4-tetrahidroxi-flavona). Bogdanov, (1989) usando HPLC constatou a presença de pinocembrina em quatro amostras de mel (duas de origem floral e duas de origem não-floral, o chamado pseudomel), (WHITE, 1967).

1.4 Umidade no mel

O conteúdo de água no mel é uma das características mais importantes, influenciando diretamente na sua viscosidade, peso específico, maturidade, cristalização, sabor, conservação e palatabilidade (VERÍSSIMO, 1987). Segundo (MENDES & COELHO, 1983), o conteúdo de água no mel pode variar de 15% a 21%, sendo normalmente encontrados níveis em torno de 17%.

A Legislação Brasileira de Produtos Apícolas permite um valor máximo para o conteúdo de água no mel de 20%. Valores acima de 18% podem comprometer sua qualidade final. Entretanto, níveis bem acima desses valores já foram encontrados por diversos pesquisadores em diferentes tipos de mel (CORTOPASSI-LAURINO & GELLI, 1991; COSTA *et al*, 1989; AZEREDO & AZEREDO 1999; SODRÉ, 2000; MARCHINI, 2001). O mel com teor de água acima de 19%, entrando em contato com esporos ou formas vegetativas de leveduras, irá fermentar, perdendo muito de seu valor comercial. Por isso, mel nesta concentração precisa ser pasteurizado com aproximadamente 62°C por 30 minutos (WHITE, 1967; SENAI 1999).

Segundo Crane (1987), a maior possibilidade de fermentação do mel está ligada ao maior teor de umidade e leveduras osmofílicas (adaptadas a altas concentrações de açúcar) presentes também em sua composição. O processo de fermentação pode ocorrer mais facilmente naqueles méis chamados "verdes", ou seja, méis que são colhidos de favos que ainda não tiveram seus alvéolos devidamente operculados (fechados por uma película de cera denominada opérculo) pelas abelhas, nessa situação, o mel apresenta teor elevado de água. Entretanto, mesmo o mel operculado pode ter níveis acima de 18% de água, caso o apiário esteja localizado em região com umidade relativa do ar superior a 60%.

Outros fatores associados ao processo de fermentação estão relacionados com a má assepsia durante a extração, manipulação, envase e acondicionamento em local não apropriado (FARIA, 1993).

1.5 Tipos de mel

As abelhas podem na ausência ou escassez de flores atrativas, coletar soluções açucaradas em frutos, xaropes, sucos, refrigerantes e soqueiras de cana de açúcar. Em algumas regiões, as abelhas coletam secreções adocicadas produzidas por hemípteros, incluindo afídeos e cochonilhas. O mel produzido a partir dessa solução é denominado pseudomel, melato ou “honeydew” (WHITE, 1967).

Os méis também podem ser classificados como mel monofloral, quando o mel é produzido predominantemente a partir do néctar de uma única espécie floral, por exemplo, o mel de angico, de laranjeiras, de eucaliptos, entre outros e, mel multifloral, quando o mel é produzido de néctar coletado de diversas origens florais.

Para que o nome da planta apícola possa ser citado no rotulo é necessário que tenha no mínimo 80% de dominância e seja colhido igualmente de uma região com predominância floral na área de visitação das abelhas do apiário (WIESE, 1985).

1.6 Propriedades do mel restringem o crescimento microbiano

As propriedades antibacterianas do mel foram reconhecidas *in vivo* por Aristóteles (350 A.C.) e posteriormente *in vitro* por Sackett (1919). Trabalhos têm sido direcionados para identificar os constituintes responsáveis por essas propriedades. A atividade antimicrobiana do mel foi originalmente observada como sendo devido aos fatores físicos, como a acidez (pH 3,5) e alta osmolaridade. Dold *et al*, (1937) observou que esta atividade permanecia mesmo depois do mel ser diluído. Outros pesquisadores (WHITE, SUBERS & SHEPARTZ, 1962; WHITE & SUBERS, 1963) concluíram que

esta atividade do mel diluído, era devido a presença de peróxido de hidrogênio, gerado pela ação da enzima glicose-oxidase no mel. Segundo White, Subers & Shepartz (1963), a enzima glicose-oxidase, adicionada ao mel pelas abelhas através das glândulas hipofaríngeas, reage com a água e glicose formando ácido glucônico (principal composto ácido do mel) e peróxido de hidrogênio, popularmente conhecido como água oxigenada, cuja quantidade presente no mel é dependente tanto dos níveis de glicose-oxidase, quanto de catalase, uma vez que a catalase, que se origina do pólen da flor, destrói o peróxido de hidrogênio (WESTON *et al*, 2000). O peróxido é um anti-séptico esporicida que esteriliza o mel selado nos alvéolos, capaz também de protegê-lo contra a decomposição bacteriana até que seu conteúdo de açúcares esteja alto o suficiente para fazê-lo (SCHEPARTZ *et al*, 1966; MENDES & COELHO, 1983).

Segundo White & Subers (1963), algumas amostras de mel tem alta atividade antibacteriana, a qual pode ser somente por ação do peróxido. Adcock (1962) descobriu em testes antibacterianos que esta atividade persiste depois da remoção do peróxido pela adição de catalase. Este resultado suporta a hipótese de que outros fatores de origem herbal, como (néctar, própolis, pólen e substâncias voláteis, como os flavonóides e ácidos fenólicos) (ADCOCK, 1962; MOLAN, 1992; WAHDAN, 1998) são responsáveis pela atividade antibacteriana “não-peróxido” de alguns méis.

1.7 Principais atividades biológicas atribuídas ao mel

O mel apresenta diferentes propriedades terapêuticas, dentre elas a habilidade de estimular a cura de feridas e inibir o crescimento de micro-organismos (COOPER, 1999). Os registros que mencionam a utilização deste produto como produto medicinal refere a sua utilização para o tratamento de diversas doenças, como úlceras de estômago, feridas, queimaduras, entre outras (EFEM, UDOH & IWARA, 1992). Dentre as inúmeras propriedades medicinais atribuídas ao mel pela medicina popular e que vêm

sendo comprovada por inúmeros trabalhos científicos, a atividade antimicrobiana parece ser seu efeito medicinal mais conhecido (SATO *et al*, 2000), sendo que não apenas um fator, mas sim os vários fatores e suas interações, são responsáveis por tal atividade.

As mesmas propriedades desenvolvidas pelas abelhas sociais para preservação do mel contra micro-organismos funcionam na aplicação medicinal. De maneira geral, destinam-se ao mel inúmeros efeitos benéficos em várias condições patológicas. Propriedades antissépticas também são atribuídas ao mel, fazendo com que ele seja utilizado como coadjuvante na área terapêutica em diversos tratamentos profiláticos (STONOGA & FREITAS, 1991). A propriedade antibacteriana do mel foi confirmada em diversos trabalhos (WHITE, SUBERS & SCHEPARTZ, 1963; DUSTMANN, 1979; MOLAN *et al*, 1992; ALLEN, MOLAN & REID, 1991; CORTOPASSI-LAURINO & GELLI, 1991) demonstrando um amplo espectro de ação capaz de inibir bactérias Gram positivas e negativas. Sendo comprovada também, a ação fungicida (EFEM *et al*, 1992), cicatrizante (BERGMAN *et al*, 1983 e EFEM, 1988; GREEN, 1988 e GUPTA *et al*, 1993) e promotora da epitelização das extremidades de feridas (EFEM, 1988). Popularmente ao mel ainda se atribuem outras propriedades como antianêmica, emoliente, antiputrefante, digestiva, laxativa e diurética (VERÍSSIMO, 1987).

1.7.1 Atividade higroscópica

O mel é higroscópico, reduzindo a umidade de ambientes onde é aplicado, desidratando as bactérias. Desta forma age diferentemente dos antibióticos, o qual ataca a parede da célula ou inibi as vias metabólicas intracelulares. A água presente no mel apresenta forte interação com as moléculas dos açúcares, deixando poucas moléculas de água disponíveis para os micro-organismos (VERÍSSIMO, 1987). A disponibilidade de água livre é expressa como atividade de água (A_a); sendo a água pura (A_a) 1.00 e o sangue (A_a) 0.99. O mel possui (A_a) 0.6 e muitas espécies de microrganismos requerem

(A_a) entre 0.94 e 0.99 para se desenvolver (MOLAN, 1992). As bactérias osmotolerantes, capazes de sobreviver em altas concentrações de açúcar, como por exemplo, as bactérias do gênero *Staphylococcus* requerem (A_a) 0,86 para se desenvolverem (CHIRIFE *et al*, 1982).

O conteúdo de açúcar do mel é alto o suficiente para impedir o crescimento microbiano, mas só o conteúdo de açúcar não é a única razão para as propriedades antibacteriana do mel (MOLAN & BETTS, 2004). Cem substâncias são candidatas para justificar as propriedades antibacterianas desses méis, mas o ingrediente chave ainda não foi identificado (SIMON *et al*, 2007).

1.7.2 Atividade anti-inflamatória

Muitas observações clínicas têm sido relatadas na redução dos sintomas inflamatórios quando o mel é aplicado em feridas ou queimaduras (BURLANDO, 1978; DUMRONGLERT, 1983; EFEM, 1993; HEJANE *et al*, 1996). O mel limpa as feridas pela diminuição da secreção resultante do processo infeccioso, elimina o tecido morto, mata as bactérias, suprime diretamente a inflamação e estimula o crescimento de vários tipos de células envolvidas na produção de novos tecidos de reparo das feridas (MOLAN *et al*, 2005).

Componentes responsáveis pela atividade anti-inflamatória do mel têm sido identificados, podendo esta atividade ser devido a presença de antioxidantes. Segundo (FRANKEL *et al*, 1998; GHELDOLF & ENGESETH, 2002; GHELDOLF, WANG & ENGESETH 2002; GHELDOLF, WANG & ENGESETH, 2003 e SCHRAMM *et al*, 2003), o mel possui significativa atividade antioxidante. A ação anti-inflamatória tem sido extensiva e clinicamente observada (MOLAN, 2002; TONKS *et al*, 2007; TONKS *et al*, 2003) em animais modelo (MOLAN, 2006). Os animais são incapazes de terem atitudes que influenciam os processos curativos, o que pode demonstrar que os produtos

naturais sejam efetivos no tratamento de feridas (SHMUELI & SHUVAL, 2007). Assim, esta observação e estudos histológicos podem ser citados como convincente evidência para a eficiência do mel no controle de infecções.

1.7.3 Atividade desodorizante

A rápida ação desodorizante do mel sobre as feridas (24 h) é provavelmente devido a outros fatores além da ação antibacteriana. As substâncias malcheirosas que as bactérias produzem nas feridas, tais como, amônia, amins e componente enxofre, são formadas pelo metabolismo de aminoácidos derivados da decomposição das proteínas do tecido e linfa. A bactéria metaboliza glicose em preferência aos aminoácidos, assim na presença do mel (composição de 30%-40% de glicose), os componentes malcheirosos não são formados (NYCHAS *et al*, 1988; MCINERNEY, 1990; SUBRAHMANYAM, 1991; STEWART, 2002; AHMED *et al*, 2003).

1.7.4 Estimulação da cura de feridas

O mel também é hábil para iniciar processos de cura que possam estar dormentes na ferida, promovendo a formação de granulações no tecido e estimulando o crescimento do epitélio. Observações clínicas dos efeitos estimulantes do mel no crescimento dos tecidos têm sido confirmadas pelas medidas e observações histológicas feitas com feridas de animais em estudos experimentais (BURLANDO, 1978; BERGMAN *et al*, 1983; GUPTA *et al*, 1992; KUMAR *et al*, 1993), onde o tratamento com mel mostrou melhorias estatisticamente significativas. Estes experimentos também demonstraram que o mel estimula a síntese de colágeno (SUGUNA *et al*, 1992).

1.7.5 Função de barreira física

A alta viscosidade do mel fornece uma barreira física para a infecção da ferida desde a contaminação externa, eficiência a qual é aumentada pela atividade antimicrobiana. Esta característica é particularmente útil, pois o mel impede a alta exsudação de feridas, como as causadas por queimaduras, inibindo assim o crescimento de bactérias em particular, *Pseudomonas* spp, que crescem em ambientes úmidos (ROBSON, 2000). O uso profilático do mel como curativo tem sido baseado na solução de problemas com enxertos de pele frequentemente infectados com *Pseudomonas* spp (NATARAJAN *et al*, 2001).

1.8 Mel de manuka

Durante as últimas décadas, o aumento da utilização de antibióticos e suas aplicações indiscriminadas e incorretas, vêm favorecendo a emergência de linhagens de micro-organismos patogênicos resistentes aos mais variados antibióticos. Por este motivo, a comunidade médica e científica tem iniciado uma busca por potenciais alternativos aos antibióticos. Nos últimos 20 anos, houve um aumento dos grupos de investigação que se dedicam à pesquisa da atividade antibacteriana do mel, o que por sua vez, tem resultado em um aumento do número de artigos publicados sobre esta atividade e o início do uso deste produto de maneira mais sistemática, (DUNFORD *et al*, 2000). O aumento da curiosidade nesta área, também levou à criação de empresas como a Medihoney (Austrália) que se dedicam exclusivamente à comercialização de mel com alta atividade antibacteriana. Atualmente alguns países, como a França e a Itália vêm objetivando a produção de mel com propostas terapêuticas específicas nos tratamentos de úlceras e problemas respiratórios (YANIV & RUDICH, 1996). Existem méis no mercado mundial que tem propriedades medicinais excepcionais e grande valor de mercado como manuka (ALLEN, MOLAN & REID, 1991).

O mel de manuka é produzido pela abelha *Apis mellifera* a partir do néctar coletado de *Leptospermum scoparium* (Myrtaceae) nativa da Nova Zelândia. Quando a atividade antibacteriana de alguns tipos de méis foi testada por Allen, Molan & Reid (1991), através da adição de catalase para remover o peróxido de hidrogênio, a maioria dos méis não mostraram atividade antibacteriana significativa. A elevada atividade antibacteriana de manuka foi, em muitos casos, devida exclusivamente a este componente não-peróxido chamado de fator único manuka (UMF). Este UMF é muito importante, especialmente para o tratamento de feridas infectadas, uma vez que as feridas exsudam plasma que pode conter catalase, entre outras enzimas, que podem destruir a atividade do peróxido no mel. Esta descoberta veio abrir muitas portas para a utilização do mel na medicina (COOPER, 2002; MOLAN, 2006).

Embora crenças folclóricas tenham sido vinculadas com o suposto efeito medicinal do mel (RANSOME, 1986; CRANE, 1990), estudos têm sido conduzidos para verificar estes efeitos do mel produzido por *Apis mellifera* (MOLAN, 1997; BOGDANOV, 1997). Entretanto, poucos pesquisadores têm investigado os méis das abelhas sem ferrão (VIT *et al*, 1994, 1998a; BRUIJN & SOMMEIJER, 1995; SOMMEIJER *et al*, 1995).

1.9 *Klebsiella pneumoniae*

É uma espécie de bactéria Gram-negativa, encapsulada, anaeróbia facultativa em forma de bastonete (Figura 1), encontrada na flora normal da boca, da pele e intestinos (RYAN & RAY, 2004). É clinicamente o mais importante membro do gênero *Klebsiella*, Família das Enterobactérias. Pode causar pneumonia embora seja mais comum a sua implicação em infecções hospitalares, em particular em pacientes imunologicamente deprimidos. *K. pneumoniae* também podem causar uma gama de

doenças clínicas, incluindo tromboflebite, infecção do trato urinário, colecistite, diarreia, infecção do trato respiratório, infecção de ferida cirúrgicas, osteomielite, meningite, bacteremia e septicemia. Nos últimos anos, tornou-se um patógeno importante em infecções nosocomiais (RASHID & EBRINGER, 2006).

Figura 1: Aspecto da colônia de *Klebsiella pneumoniae* cultivada no meio Müller Hinton ágar (A); Fotomicrografia eletrônica mostrando sua forma de bastonete (B); Infecção na pele humana, Tromboflebite superficial (C). <http://www.picsearch.com/pictures/Science>.

1.10 *Pseudomonas aeruginosa*

Também conhecida como *Pseudomonas pyocyanea* é uma bactéria gram-negativa, aeróbia, baciliforme muito versátil (Figura 2). É um patógeno oportunista, ou seja, que raramente causa doenças em um sistema imunológico saudável, mas explora eventuais fraquezas do organismo para estabelecer um quadro de infecção. Essa característica associada à sua resistência natural a um grande número de antibióticos e antisépticos a torna uma importante causa de infecções hospitalares (FINE *et al*, 1996). Por causa da alta resistência a antibióticos e do grande arsenal de fatores de virulência desta bactéria, as infecções causadas por ela são de difícil controle. Se a infecção ocorrer em áreas vitais ela pode ser fatal (APIDIANAKIS *et al*, 2005).

1.10.1 Mecanismos de resistência da *Pseudomonas aeruginosa*

O principal problema na infecção por *Pseudomonas aeruginosa* é que este micro-organismo apresenta resistência natural e adquirida a diversos antibióticos. A resistência intrínseca de bactérias Gram-negativas tem sido frequentemente atribuída à presença de uma membrana externa, no entanto, essa barreira não pode ser a única responsável pelo perfil de resistência dessas bactérias. Estudos recentes mostraram a existência de uma bomba de efluxo que desempenha o principal papel na resistência das bactérias Gram-negativas (LOMOVSKAYA *et al*, 2001).

Figura 2: Aspecto da colônia de *Pseudomonas aeruginosa* cultivada no meio Müller Hinton ágar (A); Fotomicrografia eletrônica mostrando sua forma baciliforme (B); Infecção na pele humana (C) <http://www.picsearch.com/pictures/Science>.

1.11 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus são bactérias anaeróbias facultativas, Gram-positivas esféricas que ocorrem em aglomerados microscópicos que se assemelham a uvas (Figura 3) (ROSENBACH, 1884). O *S. aureus* é um agente patogênico de sucesso, importante devido à sua virulência, resistência aos antibióticos e associação a várias doenças, incluindo enfermidades sistêmicas potencialmente fatais, infecções cutâneas, infecções oportunistas e intoxicação alimentar (LOWY, 1998). É ainda uma das cinco causas mais comum de infecções nosocomiais e, frequentemente a causa de infecções em feridas pós-cirúrgicas (BOWERSOX, 1999). *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) é uma

linhagem temida, usualmente encontrada em hospitais, entretanto estão se tornando cada vez mais prevalentes na comunidade.

S. aureus é espécie catalase-positivo, ou seja, pode produzir a enzima catalase, sendo capaz de converter o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio (RYAN & RAY, 2004). Desta forma, podem causar uma série de doenças e infecções de pele como (impetigo, furúnculos, celulite, foliculite, carbúnculos, síndrome da pele escaldada e abscesso) como também doenças potencialmente fatais como pneumonia, meningite, osteomielite, endocardite, bacteremia e sepse (BOWERSOX, 1999).

Figura 3: Aspecto da colônia de *Staphylococcus aureus* cultivada no meio Müller Hinton ágar (A); Fotomicrografia eletrônica mostrando sua forma esférica (B); Infecção na pele humana (C). <http://www.picsearch.com/pictures/Science>.

1.12 *Candida albicans*

Candida albicans é uma levedura comensal nas superfícies das mucosas, na maioria dos indivíduos saudáveis, mas torna-se um patógeno oportunista em condições que lhe permitam aderir e colonizar tecidos epiteliais, causando risco de vida e infecções disseminadas (Figura 4) (PFALLER & DIEKEMA, 2007). Estas infecções fúngicas estão se tornando mais prevalentes em todo o mundo porque o tamanho da população de pacientes imunocomprometidos é crescente e, apesar das terapias antifúngicas apropriadas, a mortalidade por candidemia é superior a 30% (MORGAN *et al*, 2005).

A patogenicidade da *Candida albicans* não pode ser atribuída a apenas um fator isolado, mas da produção concomitante dos diversos fatores que este organismo se transforma numa célula adaptada à invasão dos tecidos de um hospedeiro imunodeprimido (LO *et al*, 1997). Como forma de resistência, tem capacidade de se multiplicar unicelularmente por gemulação. Na presença de compostos que induzem à sua patogenicidade, a *Candida albicans* expressa os seus fatores de virulência, tal como a formação de hifas, estas capacitam a célula para exercer força mecânica, ajudando na sua penetração nas superfícies epiteliais, e uma vez na corrente sanguínea, têm uma ação danosa sobre o endotélio, o que permite que a *Candida albicans* invada os tecidos profundos do organismo. Devido a estes fatores, a *Candida albicans* tem despertado grande interesse das pesquisas na área de saúde e da medicina. (KUMAMOTO *et al*, 2005).

Figura 4: Aspecto da colônia de *Candida albicans* cultivada no meio Müller Hinton ágar (A); Fotomicrografia eletrônica mostrando sua forma baciliforme (B); Infecção na pele humana (C). <http://www.picsearch.com/pictures/Science>.

1.13 *Trichophyton rubrum*

O fungo *T. rubrum* é um dermatófito de espécie antropofílica, cosmopolita e responsável por cerca de 70% das dermatofitoses em humanos (LENG *et al*, 2008), sendo que infecções em animais têm sido raramente descritas (WHITE *et al*, 2008). *T. rubrum* cresce lentamente sendo que suas colônias têm uma pigmentação avermelhada,

o que dá origem ao nome da espécie (*rubrum*). Entretanto, variedades sem pigmentação também podem ocorrer. Os macroconídios, quando presentes, apresentam clavas alongadas, quase com um aspecto cilíndrico, enquanto que os microconídios são mais abundantes, pequenos em forma de pêra (Figura 5) (LARONE, 1996).

Os dermatófitos, em vida parasitária, têm a capacidade de invadir tecidos queratinizados, ocasionando infecções denominadas dermatofitoses. Essas infecções envolvem as camadas superficiais da pele, cabelo e unhas (ELLIS *et al*, 2000).

Figura 5: Característica da colônia de *Trichophyton rubrum* cultivada em meio Sabouraud ágar (A); e seus macroconídios e microconídios (B); Infecção do tipo *tinea unguium* (C). <http://www.mycology.adelaide.edu.au>.

Embora as dermatofitoses profundas sejam incomuns, algumas espécies de fungos vêm ocasionando infecções em regiões não usuais do corpo, agindo de modo invasivo em pacientes submetidos a transplantes de órgãos, tratamento quimioterápico ou pacientes com

síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (NIR-PAZ *et al*, 2003; SMITH *et al*, 2001; GROSSMAN *et al*, 1995).

A elevada incidência de infecções por dermatófitos é um relevante problema de saúde pública, o qual acarreta um impacto econômico no sistema de saúde de vários países (WHITE *et al*, 2008). As onicomicoses (infecções na unha) são provavelmente as infecções mais refratárias ao tratamento (EVANS, 1998), devido à resistência fúngica

(ROBERTS & EVANS, 1998) e presença de esporos dormentes (artroconídios) (HASHIMOTO & BLUMENTHAL, 1978).

Objetivos

2. Objetivos

✓ Avaliar a presença e a variação da atividade antimicrobiana *in vitro* de diferentes tipos de meis do Brasil, tanto de abelhas africanizadas, (*Apis mellifera*) quanto de Meliponíneos, contra a patogenicidade das bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* e dos fungos *Trichophyton rubrum* e *Candida albicans*.

✓ Comparar os níveis de atividade com o mel de manuka (UMF 18+), reconhecido mundialmente como altamente medicinal, com o intuito de se descobrir um mel que apresente altos níveis de ação antimicrobiana.

✓ Testar a resistência das linhagens bacterianas frente aos antibióticos comerciais, frequentemente utilizados, e comparar os níveis de resistência apresentados com a eficiência das amostras de mel.

✓ Determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM), concentrações bactericidas mínimas (CBM) e as concentrações fungicidas mínimas (CFM), usando critérios de acordo com o Comitê Nacional de Laboratório Clínico Padrão (CLSI), a partir do método de microdiluições.

✓ Detectar e determinar a constituição química das amostras de mel através da análise por espectrometria de massas *Fingerprint* ESI(-)-EM, na tentativa de identificar os elementos associados com a atividade antimicrobiana do mel.

✓ Determinar a acidez das amostras de mel através da análise do pH e a origem botânica dos méis das abelhas sem ferrão, através da análise polínica das amostras a partir do método de acetólise, uma vez que a acidez e a origem floral estão diretamente ligadas ao nível de atividade antimicrobiana dos meis.

Material e Métodos

3. Material e Métodos

3.1 Mel de *Apis mellifera*

Foram avaliadas 25 amostras de mel não pasteurizadas de *Apis mellifera*, com o intuito de observar a presença e a variação da atividade antimicrobiana.

As amostras foram obtidas de apicultores comerciais de duas regiões distintas do Brasil, sendo de localidades pertencentes ao estado de São Paulo (SP) e, cidades do estado do Rio Grande do Norte (RN) (Tabela 1). Os meis foram identificados como sendo monoflorais, com predominância de pólen de assa-peixe, cipó-uva, angico, romã, eucalipto, algaroba, laranjeira, cana-de-açúcar e caju, exceto o mel silvestre, considerado como sendo multifloral. O mel de manuka (UMF 18+) Comvita®, Nova Zelândia, conhecido comercialmente como mel terapêutico com alta atividade antimicrobiana, foi utilizado para comparar a taxa de atividade antimicrobiana.

Tabela 1: Identificação floral e origem das mostras de mel produzidas por *Apis mellifera*.

<i>Apis mellifera</i> (Flor predominate)	Quantidade de amostra	Origem das amostras
Angico	1	Mossoró (RN)
Cana-de-açúcar	1	Caxingui (SP)
Caju	1	Caxingui (SP)
Algaroba	1	Mossoró (RN)
Eucalipto	1	Caxingui (SP)
Laranjeira	5	Caxingui, Bebedouro, Candido Rodrigues (SP)
Cipó-uva	3	Altinópolis, São Carlos, Caxingui (SP)
Assa-peixe	3	Altinópolis, São Carlos, São Simão (SP)
Romã	1	Mossoró (RN)
Silvestre	8	Caxingui, São Simão, Candido Rodrigues (SP), Mossoró e Vale do Mel (RN)

3.2 Mel das abelhas sem ferrão

As amostras dos méis das abelhas sem ferrão (Tabela 2) foram obtidas entre setembro e outubro de 2010, a partir de colmeias não alimentadas artificialmente, mantidas no meliponário do Departamento de Ecologia da FFCLRP/USP, campus de Ribeirão Preto, SP, além das amostras obtidas em Mossoró e São José de Mipibú, municípios do estado do RN e, Uberlândia, MG. Essas amostras de cerca de 40 mL, foram coletadas diretamente de potes fechados e conservados dentro das colmeias com o auxílio de pipetadores estéreis (Figura 6). Todas as amostras foram armazenadas em tubos tipo falcon envolto em papel alumínio e mantidos no escuro para a proteção dos compostos sensíveis à luz.

Tabela 2: Relação das espécies de abelhas sem ferrão e origem das amostras de mel coletas.

Amostras	Espécies	Número de colmeias	Origem das amostras
Ms	<i>Melipona subnitida</i>	2	Mossoró (RN)
Mq	<i>Melipona quadrifasciata</i>	2	Meliponário FFCLRP/USP
Mb	<i>Melipona bicolor</i>	2	Meliponário FFCLRP/USP
Mr	<i>Melipona rufiventris</i>	2	Meliponário FFCLRP/USP
Msc	<i>Melipona scutellaris</i>	3	São José de Mipibú (RN)
Sd	<i>Scaptotrigona depilis</i>	2	Meliponário FFCLRP/USP
Nt	<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	3	Meliponário FFCLRP/USP
Fv	<i>Frieseomellita varia</i>	3	Meliponário FFCLRP/USP
Tc	<i>Tetragona clavipes</i>	2	Meliponário FFCLRP/USP
Ta1	<i>Tetragonisca angustula</i> (SP)	4	Meliponário FFCLRP/USP
Ta2	<i>Tetragonisca angustula</i> (MG)	4	Uberlândia (MG)
Pd	<i>Plebeia droryana</i>	4	Meliponário FFCLRP/USP
Pr	<i>Plebeia remota</i>	5	Meliponário FFCLRP/USP

Figura 6: Coleta de mel dos pots conservados dentro dos ninhos de abelhas sem ferrão.

3.3 Mel artificial

O mel artificial com [80% (m/v) de açúcar], o qual serviu como controle, foi preparado dissolvendo 40 g de frutose, 30 g de glucose, 8 g de maltose e 2 g de sucrose em 100 mL de água (KHOSRAVI *et al*, 2008).

3.4 Micro-organismos utilizados

3.4.1 Linhagens Fúngicas

As linhagens fúngicas utilizadas neste trabalho foram o fungo filamentoso *Trichophyton rubrum* CBS118892, doado pelo **Centraalbureau voor Schimmelcultures** (CBS - Holanda), ao Laboratório de Biologia Molecular de Fungos do departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto FMRP-USP, cultivada a 30°C por 15 dias, em meio ágar extrato de malte (MEA), e a levedura *Candida albicans* ATCC 64548 sendo esta, uma linhagem padrão obtida de isolados clínicos e são mantidas no laboratório de Bacteriologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP.

3.4.2 Linhagens bacterianas

As bactérias utilizadas neste trabalho foram as Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, e Gram-positivas *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* coagulase negativo ATCC 43300. Estas linhagens foram obtidas de isolados clínicos e são mantidas no laboratório de Bacteriologia do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP.

3.5 Meios de cultura

3.5.1 Meio Sabouraud (Atlas, 1993)

Glicose	20 g
Peptona	10 g
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

O pH foi ajustado para 5,7 com NaOH e o meio autoclavado a 1 atm de pressão e 120°C por 20 minutos. Para meio sólido, adicionou-se 1,5% (m/v) de ágar.

3.5.2 Meio Malt Extract Agar (MEA)

Glicose	20 g
Extrato de malte	20 g
Peptona	1 g
Água destilada (q.s.p.)	1000 mL

O pH foi ajustado para 5,7 com NaOH e o meio autoclavado a 1 atm de pressão e 120°C por 20 minutos. Para meio sólido, adicionou-se 2% (m/v) de ágar.

3.5.3 Meio RPMI

Foram dissolvidos 10,4 g do meio RPMI 1640 (Gibco, USA) (Tabela 3) em 900 mL de água destilada. Em seguida, adicionou-se MOPS (3-N-morpholino propanesulphonic acid) a uma concentração de 0,165 M. O pH da solução foi ajustado para 7,0 e o volume final completado para 1000 mL com água destilada. O meio foi

esterilizado através de um sistema de filtração Millipore (MA, USA) com membrana de náilon de 22 µm e estocado a -20°C.

Tabela 3: Constituintes do meio RPMI-1640.

Constituinte	g/L de água	Constituinte	g/L de água
L- arginina	0,200	Biotina	0,0002
L-asparagina (anidro)	0,050	D-pantotênico	0,00025
Ácido L-aspartíco	0,020	Cloreto de colina	0,003
L-cisteína. 2HCL	0,0652	Ácido fólico	0,001
Ácido L-glutâmico	0,020	Mio-inositol	0,035
L-glutamina	0,300	Niacinamida	0,001
Glicina	0,010	PABA	0,001
L-histidina	0,015	Piridoxina HCL	0,001
L-hidroxiprolina	0,020	Riboflavina	0,0002
L-isoleucina	0,050	Tiamina HCL	0,001
L-leucina	0,050	Vitamina B ₁₂	0,000005
L-lisina HCL	0,040	Nitrato de cálcio. H ₂ O	0,100
L-metionina	0,015	Cloreto de potássio	0,400
L-fenilalanina	0,015	Sulfato de magnésio (anidro)	0,04884
L-prolina	0,020	Cloreto de sódio	6,000
L-serina	0,030	Fosfato de sódio, dibásico (anidro)	0,800
L-treonina	0,020	D-glicose	2,000
L-tripitofano	0,005	Glutathiona reduzida	0,001
L-tirosina.2Na	0,02883	Vermelho de fenol, Na	0,0053
L-valina	0,020		

3.6 Reagentes

Os solventes utilizados para o preparo das soluções, fases móveis e procedimentos de extração foram: metanol (MeOH) de grau HPLC (JT Backer Reagent Chemicals, NJ, USA), água ultrapura purificada em sistema Milli-Q, Millipore® (MA, USA), e ácido fórmico (Sigma Aldrich, Inc, USA).

3.7 Preparo da suspensão de conídios

3.7.1 Linhagem de *Trichophyton rubrum*

A linhagem de *Trichophyton rubrum* foi cultivada por 10 a 15 dias em placas de petri contendo meio MEA sólido pH 5,7 a 28°C. Após este período, a massa micelial foi coletada com o auxílio de uma espátula estéril e colocada em 15 mL de solução salina 0,9% (m/v) contendo 0,01% Tween 80 (v/v). Em seguida, a mistura foi agitada vigorosamente no *vortex* para desagregar os conídios, filtrada em lã de vidro para remover as hifas e centrifugada a 4000 x g por 10 minutos. O precipitado foi ressuspensionado em solução salina (0,9%) esterilizada. A concentração de 2×10^6 conídios/mL da solução foi ajustada utilizando-se uma câmara de Neubauer.

3.7.2 Teste de inibição pelo método de difusão em ágar

O método de difusão em ágar (SOMMEIJER *et al*, 1995) foi empregado para verificar a presença e a variação da atividade antimicrobiana dos méis de *Apis mellifera* e meliponíneos. Para isso, 100 µL da solução de conídios foram semeados sobre o ágar em placas de petri 20 x 150 mm contendo cerca de 40 mL do meio de cultura Sabouraud, com uma espessura de aproximadamente 4 mm (SHADOMY & SPNEL-INGROF, 1980). Após a semeadura e secagem do inóculo, foram confeccionados 10 poços pela remoção do ágar, com canudos plásticos com cerca de 4 mm de diâmetro equidistantes entre si, cada um recebendo 0,05 mL de cada amostra de mel não diluído. Os testes foram feitos em triplicatas e as placas foram incubadas a 28°C por 5 dias.

A quantificação da atividade antimicrobiana foi determinada pela medida do diâmetro em milímetros dos halos de inibição formados ao redor do poço, incluindo o poço. As medidas foram comparadas com as obtidas com mel de manuka (*Leptospermum scoparium*) e com o mel artificial (xarope), sendo este utilizado como

controle negativo. Os dados foram analisados pela análise de variância de um único fator ANOVA e posteriormente pelo teste T utilizando o programa PRISMA (versão 4.0) para comparações múltiplas entre as médias, sendo o valor de $p < 0.05$ considerado estatisticamente significativo.

3.7.3 Determinações da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A susceptibilidade *in vitro* da linhagem de *Trichophyton rubrum* frente às amostras de méis testadas também foi determinada pela técnica de microdiluição descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) previamente denominado *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS). Aliquotas de 10 μL de uma suspensão de 3×10^4 conídios/mL correspondente a uma transmitância de 70-75% a 530 nm, foram inoculadas em placas de “ELISA” de 96 poços contendo RPMI 1640. O teste foi feito usando um poço de controle do crescimento contendo somente o meio RPMI 1640 e um segundo poço controle com RPMI 1640 e inóculo. Foram adicionados nos demais poços 100 μL da solução de mel preparada com água ultrapura purificada em sistema Milli-Q, Millipore® (MA, USA), nas respectivas concentrações: 975, 910, 845, 780, 715, 650, 585, 520, 455, 390, 325, 260, 195, 130, 65 mg/mL e o ensaio foi realizado em triplicata. Após a incubação a 28°C por 5 dias, o crescimento do fungo foi avaliado pelo grau de turvação do meio de cultivo comparando com o poço controle e a concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de mel com a qual não foi visível o crescimento do fungo. A concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada em triplicata pela subcultura de uma alíquota de 100 μL de todos os poços onde não foi visível o crescimento, em placas de petri contendo o meio de cultura Sabouraud incubadas a 28°C por 5 dias. A concentração mínima fungicida foi definida como a menor

concentração onde não houve o crescimento de nenhuma colônia por poço, significando 100% de morte.

Como controle do inóculo, a suspensão de 3×10^4 conídios/mL foi diluída serialmente por três vezes. Alíquotas de 0,1 mL de cada diluição de conídios foram inoculadas em meio MEA sólido e incubadas a 28°C por 5 dias. O número de colônias obtidas foi calculado e a concentração de conídios na suspensão original foi estimada, multiplicando-se o valor da contagem de cada placa pela diluição para confirmação da concentração de conídios usada na determinação da CIM.

3.8 Preparação do inóculo bacteriano

As linhagens bacterianas descritas no item 2.2 foram crescidas em meio Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Himedia, USA) a 25°C por 24 horas. Após foram semeadas em tubos com ágar Mueller-Hinton (Himedia, USA) e incubadas a 25°C por 24 horas, posteriormente foi feita uma suspensão das linhagens em solução salina 0,9% até que atingissem a escala 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL) a qual foi medida em espectrofotômetro com uma densidade óptica (D.O.) de 540 nm e absorbância de 0,05 (SNOW & MANLEY-HARRIS, 2004).

3.8.1 Teste de susceptibilidade pelo método de difusão em ágar

Com um *swab*, a suspensão das linhagens bacterianas foi semeada em placas de petri de 25 x 150 mm contendo cerca de 40 mL do meio ágar Mueller-Hinton, incubadas a 25°C por 24 horas. O teste de susceptibilidade das linhagens bacterianas frente às amostras de mel seguiu a mesma metodologia descrita no item 5.2 seguindo o método (SOMMEIJER *et al*, 1995).

3.8.2 Teste de sensibilidade

Para determinar a resistência das linhagens bacterianas frente aos antibióticos mais frequentemente usados, foram utilizados discos de papel com 6 mm de diâmetro (Cefar, SP, Brasil) impregnados com os seguintes antibióticos, nas respectivas concentrações: ampicilina 10 mcg (AMP), cefalotina 30 mcg (CFL), ciprofloxacina 5 mcg (CIP), eritromicina 15 mcg (ERI), penicilina 10 mcg (PEN), gentamicina 10 mcg (GEN), cefepime 30 mcg (CPM), ceftriaxona 30 mcg (CRO), amicacina 30 mcg (AMI), aztreonam 30 mcg (ATM), ceftazidima 30 mcg (CAZ), oxacilina 10 mcg (OXA), clindamicina 2 mcg (CLI), tobramicina 10 mcg (TOB), doxiciclina 30 mcg (DOX), piperacilina + tazobactam 110 mcg (PPT), cefazolina 30 mcg (CFZ), claritromicina 15 mcg (CLA), sulbactam + ampicilina 10 mcg (SBA), azitromicina 15 mcg (AZI), ácido clavulânico + amoxicilina 30 mcg (AMC). Os discos contendo os antibióticos foram distribuídos e levemente pressionados sobre o ágar, as placas foram incubadas a 25°C por 24 horas seguindo-se a leitura dos halos de inibição, que se procedeu seguindo as normas de procedimento do (CLSI).

3.8.3 Determinações da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A susceptibilidade *in vitro* das linhagens bacterianas frente às amostras de mel foi também determinada pela técnica de microdiluição descrita por (CLSI). Para isso, após o preparo do inóculo descrito no item 6, a suspensão de 1×10^8 UFC/mL foi diluída até obter-se uma solução de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL (ou 5×10^4 UFC/poço). Aliquotas de 10 µL desta suspensão foram colocadas em placas de 96 poços contendo meio Mueller-Hinton Broth (Difco) pH 7.3. O teste foi feito usando um poço de controle do crescimento contendo somente o meio Mueller-Hinton e um

segundo poço controle com Mueller-Hinton e inóculo. Foram adicionados nos demais poços 100 µL da solução de mel preparada com água ultrapura purificada em sistema Milli-Q, Millipore® (MA, USA), nas respectivas concentrações: 975, 910, 845, 780, 715, 650, 585, 520, 455, 390, 325, 260, 195, 130, 65 mg/mL e o ensaio foi realizado em triplicata. Após a incubação a 37°C por 24 horas, o crescimento das linhagens bacterianas foi avaliado pelo grau de turvação do meio de cultivo comparando com o poço controle, e a concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de mel a qual não foi visível o crescimento. A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada em triplicata pela subcultura de uma alíquota de 100 µL de todos os poços onde não foi visível o crescimento, em placas de petri contendo o meio de cultura Mueller-Hinton ágar, incubadas a 37°C por 24 horas. A concentração bactericida mínima foi definida como a menor concentração onde não houve o crescimento de nenhuma colônia por poço, significando 100% de morte.

Como controle do inóculo foi retirado uma alíquota de 10 µL do poço de controle de crescimento imediatamente após inoculação, foi feita uma diluição na proporção de (1:1000). Posteriormente uma alíquota de 100 µL foi espalhada sobre o meio ágar Mueller-Hinton e incubada a 37°C por 24 horas. A presença de aproximadamente 50 colônias indicou uma densidade de inóculo de 5×10^5 UFC/mL (CLSI).

3.9 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida foi realizada empregando cartuchos de 1cc/30 mg da Oasis® HLB Waters (Massachusetts, USA) com fase estacionária. O procedimento adotado para a extração dos méis no cartucho de 1cc/30 mg é detalhado a seguir: os cartuchos de extração foram previamente lavados com 1 mL de MeOH e condicionados com 1 mL de H₂O. Posteriormente, procedeu-se a adição da amostra de interesse (500

mg Mel diluída em 2 mL H₂O destilada). Finalmente, os cartuchos foram lavados com 5 mL de H₂O e foi realizada a extração de compostos apolares com 1 mL de MeOH (Figura 7), resultando em uma concentração teórica de 50 mg/mL, a qual foi diluída e submetida às análises por espectrometria de massas.

Figura 7: Esquema ilustrativo do procedimento de extração em fase sólida.

3.9.1 Análise de *Fingerprinting* por espectrometria de massas

Análise por espectrometria de massas (EM) que consiste na geração de íons com base em compostos orgânicos, foram realizadas no sistema AcquityTM UPLC acoplado ao espectrômetro de massas Xevo TQ-S com fonte de ionização *electrospray Ionization* (ESI) (Waters Corp., Milford, MA, USA) empregada em análise de misturas complexas devido a capacidade de ionização de ampla faixa de compostos polares solúveis em água e termicamente instáveis. Os íons são separados por meio de sua relação massa-carga (m/z) em um analisador de massas e detectados qualitativamente e quantitativamente por meio de um detector de íons (GROSS, 2004).

Para a aquisição e processamento dos dados foi utilizado o software Masslynx 4.1 (Micromass, Manchester, UK). A fonte de ionização foi operada em modo negativo e os parâmetros empregados nas análises foram tempo de scan de 0,5 s; gás de

dessolvatação N₂ a 300 °C; gás de colisão Argônio 3,9 x 10⁻³ mbar. A temperatura da fonte de ionização utilizada foi 120° C, voltagem do capilar 3,2 kV e voltagem do cone 60 V.

Os espectros de *full scan* foram obtidos por inserção direta das amostras de méis extraídas com MeOH em cartuchos de extração em fase sólida SPE (*Solid Phase Extraction*) na concentração final de 10 µg/mL. Como fase móvel foi empregada H₂O (Fase Móvel A) e MeOH (Fase Móvel B) no modo isocrático: H₂O/MeOH (2:8) + 0,1% ácido fórmico em ambas as fases móveis e fluxo de 0,150 mL/minuto. Para as análises foram injetados um volume de 5 µL de amostra. O diagnostico de íons nas diferentes amostras de mel foram identificados por comparação dos seus padrões em modo negativo de ionização ESI(-)-EM, caracterizado por íons desprotonados [simbolizados (M – H)⁻], adquiridos em uma faixa de *m/z* 200 – 1300. Os íons abaixo de 200 ou superior a 1300 não foram incluídos na análise.

3.9.2 Análise quimiométrica dos dados

Para avaliação quimiométrica foi empregado o método de Análise do Componente Principal, *Principal component analysis* (PCA), realizada utilizando a versão 2.6 Pirouette software da Infometrix, Woodinville, WA, USA, que tem por finalidade a redução de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais, determinado as diferenças na quantidade de cada constituinte presente nas amostras. O espectro das massas foi expresso com intensidades individuais para íons [(M – H)⁻].

3.10 Análise de pH

Para as análises de pH foi utilizado um pHmetro de bancada Phtek PHS-3B (Curitiba, PR, Brasil) diluindo-se 10 g de cada amostra de mel em 75 ml de água livre de CO₂.

3.11 Análise polínica pelo método de acetólise

Para análise polínica 5 mL de cada amostra dos méis das abelhas sem ferrão foram colocados em tubos tipo Falcon (Corning, NY, USA) e adicionado 10 mL de água destilada, agitados vigorosamente e centrifugados por 10 minutos a 2000 x g. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foram adicionados 4 mL de ácido acético em cada amostra, os tubos foram fechados, agitados manualmente e deixados em repouso por 24 horas. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 2000 x g e o sobrenadante descartado conforme normas do Laboratório de Resíduos Químicos (LRQ) do campus da USP de Ribeirão Preto, SP.

3.11.1 Preparação da mistura de acetólise

Foram adicionados 5 mL em cada amostra de uma mistura de anidrido acético e ácido sulfúrico na proporção de (9:1). Para preparar a acetólise, o anidrido acético foi colocado na proveta, e em seguida passado para um balão de vidro mantido em gelo. O ácido sulfúrico foi pipetado vagarosamente e adicionado juntamente ao anidrido acético, homogeneizado com bastão de vidro.

3.11.2 Aplicação da mistura de acetólise no material polínico

Foram aplicados 4 mL da solução de acetólise em cada amostra e misturados com um bastão de vidro. Posteriormente, as amostras foram colocadas em banho-maria por cerca de 4 minutos a 100°C, os tubos foram fechados, agitados manualmente e centrifugados por 3 minutos a 3000 x g. O sobrenadante foi descartado e 10 mL de água destilada foram adicionados às amostras.

As espumas formadas em algumas amostras foram retiradas com aplicação de gotas de álcool absoluto usando um pipetador, seguindo-se nova centrifugação a 3000 x g por 3 minutos. A água foi descartada e foi adicionado 2 ml de glicerina 50% ao

precipitado. As amostras com glicerina foram centrifugadas por 3 minutos a 3000 x g, a glicerina foi descartada e os tubos foram virados com a boca sobre papel absorvente para que o excesso de glicerina pudesse escorrer.

3.11.3 Preparação das lâminas

Para o preparo das lâminas, pedaços pequenos de gelatina glicerinada com cerca de aproximadamente 4 mm cortados com auxílio de uma espátula, foram utilizados para coletar o material depositado no fundo dos tubos que continham as amostras. Em seguida, o material foi colocado no centro da lâmina e a lamínula por cima, com parafina em volta, para vedação do material. As lâminas foram aquecidas rapidamente, sem deixar a gelatina ferver. Então, a gelatina e a parafina derretem, de modo que a lâmina fica pronta e vedada de uma vez. O excesso de parafina foi retirado com gilete, a lâmina limpa, etiquetada e pronta para análise. A análise e identificação procedeu-se em microscópio óptico, Zeiss (Carl Zeiss, Inc, Deutschland) utilizando o programa Axiocam HR Rev 3 (Carl Zeiss, Inc, Deutschland) para a obtenção de fotografias.

Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1 Atividade antimicrobiana a partir da análise do método de difusão em ágar

Os resultados obtidos pelo método de difusão em ágar indicam uma nítida atividade antimicrobiana e uma diferença significativa na susceptibilidade dos micro-organismos frente ao mel das abelhas sem ferrão e *Apis mellifera* testados (Figura 8), mostrando que a maioria das amostras (93%) tiveram efeito inibitório sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Staphylococcus aureus* coagulase negativo. Dentre as treze amostras de mel de abelhas sem ferrão, oito inibiram o crescimento do fungo *Trichophyton rubrum* (Figura 14), entretanto, os meis de *Apis mellifera* não tiveram efeito inibitório sobre o mesmo (Figura 20). A levedura *Candida albicans* não foi inibida por nenhum dos meis testados. A solução concentrada de açúcar contendo os açúcares similares encontrados no mel não inibiu nenhum dos microrganismos, igualmente aos meis de *Melipona rufiventris*, *Melipona subnitida* e o mel de Laranjeira (*Apis mellifera*). Algumas amostras produziram halos de inibição maiores quando comparados com o mel terapêutico de manuka (*Leptospermum scoparium*) UMF 18+, podendo esta diferença entre o diâmetro dos halos formados ser atribuída a maior atividade antimicrobiana destas amostras frente aos micro-organismos (Figura 8).

Figura 8: Halos de inibição formados pelo método de difusão em ágar, demonstrando os diferentes níveis de atividade antimicrobiana dos meis.

Contra *E. coli* o efeito inibitório do mel de *N. testaceicornis* e de *P. remota* foi significativamente superior ao mel de manuka, com uma Diferença Média (DM) de 5,0 – $P < 0,001$ e 2,9 – $P < 0,01$, respectivamente. Os meis de *M. scutellaris* e *M. quadrifasciata* tiveram menor efeito inibitório com uma DM de 2,8 e 2,9 - $P < 0,01$, respectivamente quando comparados com o mel de manuka (Figura 9).

Contra *K. pneumoniae* os meis de *N. testaceicornis* e *T. clavipes* foram significativamente mais eficientes que o mel de manuka, com uma Diferença Média de 3,7 - $P < 0,001$, entretanto o efeito inibitório produzido pelos meis de *T. angustula* 2 e *P. remota* não se diferenciaram significativamente dos efeitos produzidos pelos meis de *N. testaceicornis* e *T. clavipes* ($P < 0,05$) (Figura 10).

Figura 9: Diferentes níveis de inibição do crescimento da bactéria *E. coli* causados pelos meis das abelhas sem ferrão, comparado com atividade do mel de manuka da Nova Zelândia e com xarope.

“*” = meis que foram mais eficientes que manuka; Mka = manuka; Cn = Controle negativo - xarope com 80% açúcar.

Figura 10: Diferentes níveis de inibição do crescimento da bactéria *K. pneumoniae* causados pelos meis das abelhas sem ferrão, comparado com atividade do mel de manuka da Nova Zelândia e com xarope.

Contra *S. aureus* ATCC 25923, os meis de *P. remota*, *N. testaceicornis* e *T. clavipes* apresentaram maior atividade antibacteriana, entretanto não se diferenciaram significativamente do mel de manuka ($P > 0,05$) (Figura 11). Os mesmos resultados foram obtidos contra *S. aureus* ATCC 43300 e *P. aeruginosa*, onde os meis de *T. angustula* 2, *P. remota*, *P. droryana* e *N. testaceicornis*, tiveram atividade antibacteriana equivalente ao mel de manuka, não se diferenciando significativamente da atividade deste mel ($P > 0,05$) (Figura 12 e 13).

Os meis de *T. clavipes* e *S. depilis* tiveram uma atividade antifúngica frente *T. rubrum* significativamente superior ao mel de manuka, com uma DM de 13,5 e 10,2 - $P < 0,001$, respectivamente (Figura 14). As amostras de mel de *T. angustula* 1 (SP) e *T. angustula* 2 (MG) se diferiram entre si quanto à atividade antimicrobiana, quando testadas contra *K. pneumoniae* (DM 4,7 - $P < 0,001$) (Figura 10) e *T. rubrum* (DM 8,9 - $P < 0,001$) (Figura 14).

Figura 11: Diferentes níveis de inibição do crescimento da bactéria *S. aureus* 25923 causados pelos meis das abelhas sem ferrão, comparado com atividade do mel de manuka da Nova Zelândia e com xarope.

Figura 12: Diferentes níveis de inibição do crescimento da bactéria *S. aureus* 43300 causados pelos meis das abelhas sem ferrão, comparado com atividade do mel de manuka da Nova Zelândia e com xarope.

Figura 13: Diferentes níveis de inibição do crescimento da bactéria *P. aeruginosa* causados pelos meis das abelhas sem ferrão, comparado com atividade do mel de manuka da Nova Zelândia e com xarope.

Figura 14: Diferentes níveis de inibição de crescimento do fungo patogênico *T. rubrum* causados pelos meis das abelhas sem ferrão, comparado com atividade do mel de manuka da Nova Zelândia e com xarope.

Como isso constatamos uma alta atividade antimicrobiana do mel obtido de abelhas sem ferrão contra o fungo (*T. rubrum*) e contra bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*), as quais nos testes de antibiose com antibióticos comerciais mostraram-se resistentes, respectivamente à (AMC, CFZ, CFL); (COM, CRO, ATM, CAZ) e (AMP). Também constatamos a sensibilidade dos Gram-positivos *S. aureus* MRSA e *S. aureus* coagulase-negativo que se mostraram resistentes respectivamente à (ATM, CAZ) e (ERI, PPT, TOB, AMP, CLI, CIP, AZI, CRO, AMC, ATM, CLA, CAZ). Os resultados de sensibilidade e resistência das linhagens bacterianas estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Teste de sensibilidade das linhagens bacterianas frente aos antibióticos comerciais frequentemente utilizados.

Micro-organismos	Resistente	Sensível *
<i>Escherichia coli</i>	AMC, CFZ, CFL	PPT, TOB, AMP, CPM, GEN, CIP, CRO, ATM, CAZ, DOX
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CPM, CRO, ATM, CAZ	PPT, TOB, GEN, CIP
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP	DOX, PPT, TOB, CPM, CRO, AMC, ATM, CFZ, CFL, CAZ
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	ATM, CAZ	ERI, DOX, PPT, OXA, TOB, PEN, AMP, CLI, CPM, GEN, CIP, AZI, CRO, AMC, CFZ, CLA
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300	ERI, PPT, TOB, AMP, CLI, CIP, AZI, CRO, AMC, ATM, CLA, CAZ	DOX, OXA, CPM, CFZ

ampicilina (AMP), cefalotina (CFL), profloxacina (CIP), eritromicina (ERI), penicilina (PEN), gentamicina (GEN), cefepime (CPM), ceftriaxona (CRO), amicacina (AMI), aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ), oxacilina (OXA), clindamicina (CLI), tobramicina (TOB), doxiciclina (DOX), piperacilina + tazobactam (PPT), cefazolina (CFZ), claritromicina (CLA), sulbactam + ampicilina (SBA), azitromicina (AZI), ácido clavulânico + amoxicilina (AMC). Resistente = não houve desenvolvimento do halo de inibição; Sensível = medida do halo de inibição em mm, incluindo o próprio disco. *Medidas padrões em mm dos halos de inibição de antibióticos comerciais (CLSI, 2010), para *E. coli* e *K. pneumoniae*: AMP (17), TOB (15), CPM (18), CAZ, PPT, ATM e CIP (21), GEN (15), CRO (23), DOX (14); *P. aeruginosa*: PPT (18), TOB e GEN (15), CIP (21); *S. aureus*: AMP e PEN (29), OXA (13), PPT, CPM, AZI, CLA e CFZ (18), DOX (16), ERI (23), TOB e GEN (15), CLI, CIP e CRO (21), AMC (20).

Estes resultados nos permitem concluir ainda que os melis de *N. testaceicornis* e *T. clavipes* tiveram efeito inibitório similar a 10 mcg de ampicilina e superior a 10 mcg de tobramicina, gentamicina e 30 mcg de doxiciclina para *E. coli* e *K. pneumoniae*, respectivamente. Para *S. aureus*, o mel de *N. testaceicornis* teve efeito inibitório superior a 10 mcg de tobramicina, gentamicina e oxacilina e, 30 mcg de doxiciclina, formando halos de inibição maiores quando comparados com os mesmos (Tabela 4).

Em *P. aeruginosa*, pode-se observar que os melis de *N. testceicornis* e *P. droryana* (Figura 13) apresentaram halos de inibição superiores a 10 mcg de tobramicina e gentamicina, demonstrando uma maior eficiência no controle de *P. aeruginosa* (Tabela 4).

Em relação ao mel das abelhas *A. mellifera*, não foi observado diferença na atividade antimicrobiana entre os meis obtidos das diferentes regiões do Brasil. Entretanto, houve uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre as diferentes fontes florais, como pode ser observado nas figuras abaixo. Allen, Molan & Reid (1991) também encontraram diferenças na atividade antimicrobiana entre meis de diferentes origens florais.

Contra *E. coli*, os meis de *A. mellifera* que demonstraram maior atividade antimicrobiana foram romã e caju, entretanto tiveram atividade equivalente ao mel de manuka, não se diferenciando significativamente da atividade deste mel ($P > 0,05$) (Figura 15).

Figura 15: Inibição do crescimento da bactéria *E. coli* causada pelos meis de diferentes floradas produzidas pelas abelhas *Apis mellifera* no Brasil, comparando a atividade das amostras com a atividade do mel de manuka da Nova Zelândia e com xarope 80% de açúcar.

Os meis com maior atividade antimicrobiana frente a *K. pneumoniae* foram romã, caju, eucalipto e assa-peixe, entretanto não se diferenciaram significativamente quando comparados com o mel de manuka ($P > 0,05$) (Figura 16).

Contra *S. aureus* 25923 os meis de romã, cana, eucalipto, algaroba e assa-peixe tiveram uma taxa de inibição inferior ao mel de manuka, somente o mel de caju teve atividade

equivalente ao mel de manuka, não se diferenciando significativamente da atividade deste mel ($P > 0,05$) (Figura 17). Frente à linhagem de *S. aureus* 43300 os meis de *A. mellifera* com maior atividade antimicrobiana tiveram taxa de inibição inferior ao mel de manuka, com valores que variaram de 5,4 para o mel de romã a 7,3 para o mel de caju $P < 0,001$ (Figura 18).

Para *P. aeruginosa* os meis de *A. Mellifera* que apresentaram maior atividade antimicrobiana tiveram a taxa de inibição inferior ao mel de manuka, com valores que variaram de 7,4 $P < 0,01$ para o mel de caju a 13,0 $P < 0,001$ para o mel de cipó-uva (Figura 19).

Figura 16: Inibição do crescimento da bactéria *K. pneumoniae* causada pelos meis de diferentes floradas produzidas pelas abelhas *Apis mellifera* no Brasil, comparando a atividade das amostras com a atividade do mel de manuka e com xarope.

Figura 17: Inibição de crescimento da bactéria *S. aureus* 25923 causada pelos meis de diferentes floradas produzidas pelas abelhas *Apis mellifera* no Brasil, comparando a atividade das amostras com a atividade do mel de manuka e com xarope.

Figura 18: Inibição do crescimento da bactéria *S. aureus* 43300 causada pelos meis de diferentes floradas produzidas pelas abelhas *Apis mellifera* no Brasil, comparando a atividade das amostras com a atividade do mel de manuka e com xarope.

Figura 19: Inibição do crescimento da bactéria *P. aeruginosa* causada pelos meis de diferentes floradas produzidas pelas abelhas *Apis mellifera* no Brasil, comparando a atividade das amostras com a atividade do mel de manuka e com xarope.

Figura 20: Ausência da atividade antifúngica apresentada pelos meis das diferentes floradas produzidas pelas abelhas *Apis mellifera* no Brasil.

Em relação ao fungo *T. rubrum* podemos observar que nenhuma das amostras de *A. mellifera* testadas teve efeito inibitório frente ao mesmo, somente o mel de manuka apresentou atividade antifúngica.

Os meis que tiveram maior efeito foram: caju, romã e cana. Porém, os halos de inibição formados foram menores que os halos formados pelo mel das abelhas sem ferrão. A partir dos resultados obtidos, observamos que o mel das abelhas sem ferrão obteve maior espectro de inibição frente ao fungo *T. rubrum*. As medidas dos diâmetros dos halos formados variaram de 10.9 ± 0.8 a 31.6 ± 2.2 mm, diferentemente dos meis de *A. mellifera* onde não foi observada a formação dos halos de inibição frente ao mesmo micro-organismo, com exceção do mel de manuka (Figura 20). Assim, constatamos que o mel elaborado pelas abelhas: *T. clavipes*, *N. testaceicornis*, *P. droryana*, *P. remota*, *S. depilis*, *T. angustula*, *M. bicolor*, apresentam um grande potencial antifúngico, em particular o mel das abelhas *T. clavipes* e *S. depilis*, as quais apresentaram os maiores diâmetros entre os halos.

O estudo também demonstrou que ambos os meis de abelhas sem ferrão "*in natura*" e de *A. mellifera* tem atividade antimicrobiana contra os micro-organismos testados. Somente a levedura *C. albicans* apresentou resistência aos meis. Este resultado também foi observado nos estudos de Lusby *et al*, 2005 nos quais nenhuma das seis amostras de meis testadas, incluindo manuka e Medihoney[®] inibiram *C. albicans*. Os meis das abelhas sem ferrão foram significativamente mais eficientes na inibição das bactérias, em comparação com o mel das abelhas *A. mellifera*, mostrando que o mel dos Meliponíneos é muito mais efetivo no combate aos micro-organismos patogênicos.

Em contraste com o presente estudo, Nzeako & Hamdi (2000) constataram que as seis amostras de mel utilizadas em seus estudos inibiram *C. albicans*, embora com uma zona de inibição menor quando comparado com a inibição dos outros micro-organismos. Ainda que estes dados sejam geralmente compatíveis com outros relatos

mostrando que o mel de manuka tem boa atividade antibacteriana (ALLEN, MOLAN & REID, 1991;. WESTON, MITCHELL e ALLEN, 1999; MOLAN, 1999; SHONA, 2006), nós também demonstramos que o mel de abelha sem ferrão tem atividade equivalente para alguns micro-organismos e superior ao mel de manuka para outros.

Os diferentes níveis de inibição demonstrados em nosso estudo e os demonstrados por outros pesquisadores (WILKINSON & CAVANAGH, 2005; MERCAN *et al*, 2007) são provavelmente devido aos fatores presentes nas diferentes espécies de plantas nas quais o néctar é coletado (DU TOIT *et al*, 1995). Em adição, a diferença na atividade antimicrobiana entre os meis de diferentes flores pode ser, em parte, devido à quantidade dos componentes catalase e peróxido de hidrogênio, e ainda devido à presença dos fatores não-peróxidos como a lisozima, ácidos fenólicos e flavonoides (SNOWDON & CLIVER, 1996; WESTON *et al*, 2000). Allen, Molan & Reid (1991) em seu estudo, testaram a atividade antibacteriana de 26 amostras de mel de diferentes fontes florais contra *S. aureus*, observando que a diferença na atividade antimicrobiana dependendo das fontes florais é altamente significativa. Segundo Shona (2006), um fator envolvido na atividade antimicrobiana do mel é a alta concentração de açúcar presente. O uso de soluções concentradas de açúcar em feridas também produz um ambiente adverso para os micro-organismos patogênicos (SHONA, 2006). Entretanto, em nosso estudo a solução concentrada de açúcares (frutose, glucose, maltose e sucrose), utilizada nos testes, não teve efeito inibitório contra nenhum dos micro-organismos testados, portanto o resultado observado não foi atribuído ao efeito osmótico, uma vez que o mel produzido pelas espécies de abelhas sem ferrão apresenta diferenças em alguns parâmetros físico-químicos quando comparados ao mel produzido por *A. mellifera*, principalmente com relação a sua umidade, que é bastante elevada, tornando-o menos denso (BEZERRA & SOUZA, 2002). Hiromi & Kazuhiro (2008)

testaram a atividade antimicrobiana do mel de 18 espécies de abelha sem ferrão contra *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Staphylococcus*. Os resultados mostraram que atividade parece ser linhagem-específica e não espécie-específica. Neste estudo foi observado que as duas linhagens de *S. aureus* exibiram diferentes níveis de sensibilidade frente às amostras de meis, estes resultados corroboram os resultados mostrados por Hiromi & Kazuhiro (2008).

O método de difusão em ágar (SOMMEIJER *et al*, 1995) tem sido considerado de baixa sensibilidade (JAMES *et al*, 1972), pois a substância testada se difunde no ágar sofrendo diluição. No entanto, é considerado como o método mais apropriado para testar agentes antibióticos tópicos, pois avalia a difusibilidade (ALLEN, MOLAN & REID, 1991), característica importante para a avaliação do mel, uma vez que este é utilizado como agente tópico no tratamento de infecções cirúrgicas, queimaduras e feridas infecciosas (EFEM *et al*, 1992).

4.2 Teste de Microdiluição para determinação da CIM, CBM e CFM

Os resultados do teste de microdiluição para determinação da Concentração Inibitória Mínima, Concentração Bactericida e Fungicida Mínimas para o mel das abelhas sem ferrão, apresentados nas tabelas 5 e 6, permitem confirmar e concluir que a maioria das amostras de mel testadas, com exceção dos meis de *M. rufiventris* e *M. subnitida*, apresentou atividade bactericida e fungicida e não somente atividade inibitória como demonstradas pelo método de difusão em ágar (Figura 8).

A Concentração Bactericida Mínima e Concentração Inibitória Mínima variaram de 975 a 520 e 975 a 455 mg/mL, respectivamente (Tabela 5). Os menores valores das Concentrações Inibitórias Mínimas determinadas para *E. coli* foram de 715 mg/mL para o mel de *N. testaceicornis* a qual promoveu 99,1% de morte e 845 mg/mL para o mel de *T. angustula* 2, promovendo 91,4% de morte (Tabela 5). Os meis de *P. remota* e *T.*

angustula 1 produziram maior porcentagem de morte quando comparados ao mel de *T. angustula* 2, entretanto apresentaram-se mais concentrados (Tabela 5).

Com relação a *K. pneumoniae*, o mel de *N. testaceicornis* apresentou melhor atividade, promovendo 98,3% de morte a uma concentração de 455 mg/mL, seguido do mel de *T. clavipes*, *T. angustula* 2 e *P. remota*, os quais apresentaram bastante eficiência no controle de *K. pneumoniae*, porém em concentrações maiores (Tabela 5). Podemos concluir ainda que os meis de *M. scutellaris*, *M. quadrifasciata* e *S. depilis* não apresentaram atividade bactericida contra *K. pneumoniae* (Tabela 5), demonstrando baixa atividade antibacteriana para este micro-organismo.

Com relação a *S. aureus* 25923 pode-se afirmar que o mel de *N. testaceicornis* apresentou melhor atividade antibacteriana comparado com as demais amostras (Tabela 5). O mel de *T. angustula* 1, *M. scutellaris*, *M. quadrifasciata*, *F. varia*, *M. bicolor* e *S. depilis* não apresentaram atividade bactericida contra esta espécie (Tabela 5). Portanto, a eficácia ocorreu na seguinte ordem: *N. testaceicornis* > *P. remota* > *T. clavipes* > *P. droryana* > *T. angustula* 2 > *T. angustula* 1 > *F. varia* > *M. bicolor* > *S. depilis* > *M. quadrifasciata* (Tabela 5).

Em *S. aureus* 43300, a eficácia bactericida ocorreu na seguinte ordem: *N. testaceicornis* > *T. angustula* 2 > *P. remota* > *T. angustula* 1 > *P. droryana* > *T. clavipes* > *F. varia* > *S. depilis* > *M. bicolor* (Tabela 6). Os meis de *M. scutellaris*, *M. quadrifasciata*, *M. rufiventris* e *M. subnitida* não apresentaram atividade antibacteriana contra este micro-organismo (Tabela 6). Os menores valores das Concentrações Inibitórias Mínimas foram de 715 mg/mL para o mel de *N. testaceicornis* e 845 para o mel de *T. angustula* 2 (Tabela 6).

Tabela 5: Determinação das concentrações CBM e CIM dos meis das abelhas sem ferrão.

Amostras	<i>Escherichia coli</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>Staphylococcus aureus</i> 25923		
	CBM mg/mL	CIM mg/mL	% de morte	CBM mg/mL	CIM mg/mL	% de morte	CBM mg/mL	CIM mg/mL	% de morte
Ta1	975	910	94,6	975	910	90,9	–	975	99,5
Ta2	910	845	98,3	845	780	98	975	910	76
Pr	845	780	91,3	910	845	99,6	715	650	92,9
Pd	975	910	94,5	975	910	86,7	975	910	81
Nt	715	650	99,6	520	455	98,3	585	520	99,5
Tc	910	845	93,7	650	585	99,2	715	650	92
Msc	975	910	89,5	–	975	77,4	–	975	77
Mq	975	910	85,2	–	975	82	–	975	57
Fv	975	910	89,8	–	–	–	–	975	97,7
Mb	975	910	92	975	910	89,8	–	975	96
Mr	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Ms	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Sd	975	910	96	–	975	99,2	–	975	90

”–” Significa que o mel não apresentou atividade antimicrobiana e houve o crescimento do micro-organismo. CBM = Concentração Bactericida Mínima; CIM Concentração Inibitória Mínima.

Contra *P. aeruginosa*, ambos os meis de *N. testaceicornis* e *T. angustula* 2 obtiveram a menor concentração inibitória mínima de 715 mg/mL, promovendo 99,7 % e 97,9 % de morte, respectivamente (Tabela 6). Algumas amostras também produziram porcentagens altas de morte, porém em soluções mais concentradas de mel quando comparadas com *N. testaceicornis* e *T. angustula* 2. A eficácia se deu na seguinte ordem: *N. testaceicornis* > *T. angustula* 2 > *P. droryana* > *T. clavipes* > *P. remota* > *M. bicolor* > *T. angustula* 1 > *M. quadrifasciata* > *S. depilis* > *M. scutellaris* (Tabela 6).

Tabela 6: Determinação das concentrações CIM, CBM e CFM dos meis das abelhas sem ferrão.

Amostras	<i>Staphylococcus aureus</i> 43300			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Trichophyton rubrum</i>		
	CBM mg/mL	CIM mg/mL	% de morte	CBM mg/mL	CIM mg/mL	% de morte	CFM mg/mL	CIM mg/mL	% de morte
Ta1	975	910	92,5	—	975	89	650	585	81,5
Ta2	910	845	91,4	780	715	97,9	520	455	97,8
Pr	975	910	97,5	975	910	99,7	650	585	99,7
Pd	975	910	85	845	780	96,4	585	520	99,8
Nt	780	715	99,1	780	715	99,7	585	520	98,5
Tc	975	910	78	845	780	95,8	325	260	99,8
Msc	—	—	—	—	975	48	—	—	—
Mq	—	—	—	—	975	82,8	—	—	—
Fv	975	910	62,3	—	—	—	—	—	—
Mb	—	975	72,5	—	975	97	715	650	94,7
Mr	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Ms	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sd	—	975	79,5	—	975	79,5	455	390	97,7

”—” Significa que o mel não apresentou atividade antimicrobiana e houve o crescimento do micro-organismo. CBM = Concentração Bactericida Mínima; CIM Concentração Inibitória Mínima e CFM = Concentração Fungicida Mínima.

Nem todas as amostras foram eficazes contra o fungo *T. rubrum*, entretanto as concentrações inibitórias foram as mais baixas obtidas entre os micro-organismos, o fungo *T. rubrum* parece ser uma espécie bastante susceptível ao mel de algumas espécies de abelhas sem ferrão, como pode ser observado na figura 21. A partir destes resultados podemos afirmar que a eficácia ocorreu na seguinte ordem: *T. clavipes* > *S. depilis* > *T. angustula* 2 > *P. droryana* > *N. testaceicornis* > *P. remota* > *T. angustula* 1 > *M. bicolor* (Tabela 6). Podemos concluir ainda que o mel de *M. scutellaris*, *M. quadrifasciata*, *F. varia*, *M. rufiventris* e *M. subnitida*, não apresentaram atividade antifúngica (Tabela 6).

Figura 21: Atividade fungicida do mel de *T. clavipes* na concentração de 325 mg/mL promovendo 100% de morte e atividade inibitória na concentração de 260 mg/mL promovendo 99,8% de morte (A); atividade fungicida do mel de *S. depilis* na concentração de 455 mg/mL promovendo 100% de morte e atividade inibitória na concentração de 390 mg/mL promovendo 97,7% de morte (B).

Em relação ao mel das abelhas *A. mellifera*, os resultados do teste de microdiluição nos permite confirmar os resultados obtidos pelo método de difusão em ágar onde foi possível observar que o mel produzido pela abelha *A. mellifera* no Brasil tem menor eficiência de controle frente aos micro-organismos testados comparado ao mel das abelhas sem ferrão.

Os resultados do teste para determinação da Concentração Inibitória Mínima, Concentração Bactericida e Fungicida Mínimas para o mel das abelhas *A. mellifera*, apresentados nas tabelas 7 e 8 permitem confirmar que a maioria das amostras de mel testadas, com exceção do mel de laranjeira, apresentou alguma atividade bacteriostática e, somente os meis de romã, cana-de-açúcar, caju e eucalipto apresentaram atividade bactericida. Estes resultados permitem ainda concluir que nenhuma amostra apresentou atividade frente ao fungo *T. rubrum* (Tabela 8). Sendo assim, podemos observar nas tabelas 7 e 8 que a Concentração Bactericida Mínima e Concentração Inibitória Mínima variou de 975 a 780 mg/mL e 975 a 715 mg/mL, respectivamente.

Contra *E. coli* somente o mel de caju teve atividade bactericida a uma concentração de 975 mg/mL. Os meis de cana, laranjeira, angico, cipó-uva e assa-peixe

não apresentaram atividade antibacteriana (Tabela 7). As Concentrações Inibitórias Mínimas foram de 910 mg/mL para o mel de caju e de 975 mg/mL para os meis de romã, eucalipto, algaroba e silvestre. Entretanto, houve uma diferença na porcentagem de morte de bactérias entre estas amostras, ficando a eficácia na seguinte ordem: caju > romã > eucalipto > silvestre > algaroba (Tabela 7).

Somente os meis de romã, cana, caju e eucalipto, apresentaram atividade bactericida contra *K. pneumoniae* mostrando-se mais eficazes quando comparados com as demais amostras (Tabela 7). O mel de laranjeira e silvestre não apresentaram atividade antimicrobiana contra este micro-organismo. Portanto, a eficácia se deu na ordem a seguir: romã > caju > cana > eucalipto > algaroba > cipó-uva > angico > assa-peixe (Tabela 7).

Para a linhagem de *S. aureus* 25923, somente os meis de caju, romã e cana apresentaram atividade bactericida (Tabela 7). A menor Concentração Inibitória Mínima foi 780 mg/mL para o mel de caju a qual provocou 83% de morte. Os meis de cana, eucalipto e algaroba provocaram porcentagens altas de morte, porém encontram-se mais concentrados comparados ao mel de caju (Tabela 7).

A linhagem de *S. aureus* 43300, a qual mostrou resistência a 12 dos 21 antibióticos avaliados no teste de sensibilidade (Tabela 4), apresentou susceptibilidade somente para o mel de cana, caju, e romã. Sendo a Concentração Inibitória Mínima de 715 mg/mL para o mel de cana e caju e 780 mg/mL para o mel de romã, promovendo 99; 98,5 e 97,5% de morte, respectivamente (Tabela 8). Segundo Lowbury (1974), *S. aureus* é um bactéria excepcionalmente osmotolerante, para a inibição completa de seu crescimento a atividade de água (A_w) deve ser reduzida abaixo de 0,86, o que seria um mel típico diluído aproximadamente 29% (v/v). Os resultados obtidos nos permitem

concluir que a concentração de 715 mg/mL, correspondente a aproximadamente 55% (v/v) começa a diminuir sua eficácia de controle perdendo muito do seu efeito osmótico.

Contra *P. aeruginosa*, nenhuma amostra de mel apresentou atividade bactericida. Entretanto, a maioria das amostras teve atividade bacteriostática a 975 mg/mL, podendo-se observar uma variação na porcentagem de morte entre as amostras (Tabela 8). Portanto, a eficácia ocorreu na seguinte ordem: caju > angico > romã > eucalipto > cana > assa-peixe > cipó-uva (Tabela 8). Os meis de algaroba, silvestre e laranjeira não apresentaram nenhum tipo de atividade.

Tabela 7: Determinação das concentrações CIM, CBM dos meis de *Apis mellifera*.

Amostras	<i>Escherichia coli</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>Staphylococcus aureus</i> 25923		
	CBM mg/mL	CIM mg/mL	% de morte	CBM mg/mL	CIM mg/mL	% de morte	CBM mg/mL	CIM mg/mL	% de morte
Roma	—	975	91,4	910	845	91,8	910	845	71,5
Cana	—	—		975	910	85	975	910	95,3
Caju	975	910	93	910	845	82,3	845	780	83
Laranja	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Eucalipto	—	975	69	975	910	84,3	—	975	90,5
Angico	—	—	—	—	975	81,6	—	—	—
algaroba	—	975	61,6	—	975	87,4	—	975	86
Cipó-uva	—	—	—	—	975	82,7	—	—	—
Assa-peixe	—	—	—	—	975	77,89	—	975	79,2
Silvestre	—	975	64,7	—	—	—	—	—	—

”—” Significa que o mel não apresentou atividade antimicrobiana e houve o crescimento do micro-organismo. CBM = Concentração Bactericida Mínima; CIM Concentração Inibitória Mínima.

Contra o fungo *T. rubrum*, nenhuma das amostras dos meis de *A. mellifera* apresentaram atividade antifúngica (Tabela 8). Estes resultados confirmam os resultados obtidos pelo método de difusão em ágar (Figura 20).

Tabela 8: Determinação das concentrações CIM, CBM e CFM dos meis de *Apis mellifera*.

Amostras	<i>Staphylococcus aureus</i> 43300			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Trichophyton rubrum</i>		
	CBM mg/mL	CIM mg/mL	% de morte	CBM mg/mL	CIM mg/mL	% de morte	CBM mg/mL	CIM mg/mL	% de morte
Romã	845	780	97,5	—	975	83,5	—	—	—
Cana	780	715	99	—	975	73,7	—	—	—
Caju	780	715	98,5	—	975	99,4	—	—	—
Laranja	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Eucalipto	—	—	—	—	975	82	—	—	—
Angico	—	—	—	—	975	92,1	—	—	—
algaroba	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Cipó-uva	—	—	—	—	975	37	—	—	—
Assa-peixe	—	—	—	—	975	43,5	—	—	—
Silvestre	—	—	—	—	—	—	—	—	—

”—” Significa que o mel não apresentou atividade antimicrobiana e houve o crescimento do micro-organismo. CBM = Concentração Bactericida Mínima; CIM Concentração Inibitória Mínima e CFM = Concentração Fungicida Mínima.

Nem todas as amostras de mel mostraram-se eficazes contra os micro-organismos testados, resultado que também foi observado por Mullai & Menon (2005); Mercan *et al*, (2007) e Wilkinson & Cavanagh (2005). Outros pesquisadores também constatarem diferenças na susceptibilidade dos micro-organismos frente à atividade

antimicrobiana do mel (NZEAKO & HAMDI 2000; CEYHAN & UGAR, 2001; TAORMINA *et al*, 2001).

As abelhas sem ferrão armazenam seu mel em potes de cerúmen, construídos a partir de uma mistura de cera secretada das glândulas abdominais das operarias e própolis, derivado da resina das plantas coletada pelas abelhas. O mel produzido pelas abelhas sem ferrão pode assim ser influenciado pela infiltração de substâncias da própolis. Segundo Bankova *et al*, (2000), a própolis tem mostrado possuir propriedades antimicrobianas. Em contraste, o mel de *A. mellifera* é estocado em células hexagonais construídas com cera pura, com isso há uma ausência total de própolis, embora em favos velhos, um pouco de própolis pode ser incorporado na cera. Esta diferença pode explicar o motivo pelo qual o mel das abelhas sem ferrão tem uma atividade antimicrobiana diferenciada quando comparado ao mel de *A. mellifera* e pode explicar a variação regional das propriedades antimicrobiana do mel (HIROMI & KAZUHIRO, 2008).

4.3 Análise do nível de atividade antimicrobiana do mel a partir das variações de pH

Os valores de pH obtidos variaram de 3,05 a 4,10 ($3,4 \pm 0,3$) para os meis das abelhas sem ferrão e de 3,49 a 4,16 ($3,79 \pm 0,2$) para os meis de *A. mellifera* (Tabela 9). Em geral todos os meis apresentam pH baixo, sendo influenciados por ácidos orgânicos, alguns voláteis e outros inorgânicos (SIMAL & HUIDOBRO, 1984). Os valores de pH para o mel das abelhas sem ferrão não foram estabelecidos pela legislação nacional ou internacional, mas para os meis de *A. mellifera* o pH foi estipulado em uma faixa de 3,2 a 4,6 (CORTOPASSI-LAURINO & GELLI, 1991). Esta característica ácida do mel pode ser influenciada pela sua origem floral. Souza (2003), estudando diferentes meis e origens, encontrou para o pH do mel de algaroba o valor de 5,26 e para o mel de flores

silvestres o valor de 3,65. Neste estudo, o valor de pH encontrado para o mel de algaroba foi de 3,83 e de flores silvestre 3,82 (Tabela 9). Marchini *et al*, (1998) obtiveram valor médio de pH de 3,15 para meis de *M. scutellaris*. Em contra partida, Silva *et al*, (2002) obtiveram o valor médio de 4,66 para a mesma. Segundo Crane (1983) o valor do pH está diretamente relacionado com a composição florística dos locais de coleta, uma vez que o pH do mel pode ser influenciado pelo pH do néctar.

Os meis das abelhas sem ferrão: *N. testaceicornis*, *T. clavipes*, *T. angustula* 1, *S. depilis* e *F. varia*, os quais apresentaram atividade antimicrobiana nos testes de difusão em ágar e microdiluição, tiveram valores de pH acima de 3,21, valor este apresentado pelo de mel de *M. subnitida* (Tabela 9) que não teve nenhuma atividade antimicrobiana.

O mel de romã e angico produzidos pela abelha *A. mellifera* tinham os mesmos valores de pH 3,49 (Tabela 9). Entretanto, tiveram uma diferença significativa em relação à atividade antimicrobiana. O mel de cana foi eficaz no controle dos micro-organismos pelo teste de difusão em ágar e microdiluição, apresentando um valor de pH alto, 4,11 comparado com as demais amostras, com exceção do mel de laranjeira que apresentou um valor de pH 4,16 (Tabela 9).

Os resultados obtidos nos permitem concluir que houve uma diferença entre os valores de pH apresentados pelos meis das diferentes espécies de abelhas (*A. mellifera* e abelhas sem ferrão), entretanto esta diferença não demonstrou uma relação direta quanto ao nível de atividade antimicrobiana apresentada por algumas amostras. Este resultado leva-nos a concluir que outros fatores estão envolvidos na atividade antimicrobiana desses meis.

Os valores de pH das amostras são suficientemente baixos para inibir a maioria dos agentes patogênicos, pois o pH necessário para o crescimento desses micro-organismos, normalmente se dá entre 7,2 e 7,4. Entretanto, algumas espécies de

bactérias encontradas em feridas infectadas como: *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pyogenes* podem crescer em valores mínimos de pH que podem variar de 4,0 a 4,5 (MOLAN, 1992). A acidez do mel pode ser um fator antibacteriano significativo, porém, se o mel é diluído, especialmente por fluidos corporais que são bem tamponados, o pH pode não ser baixo o suficiente e a acidez do mel pode não ser um inibidor eficaz para muitas espécies de bactérias.

Tabela 9: Valores de pH encontrado nas amostras de mel

Espécies (abelhas sem ferrão)	pH
<i>Tetragonisca angustula</i> (SP)	3.72
<i>Tetragonisca angustula</i> (MG)	3.20
<i>Plebeia remota</i>	3.07
<i>Plebeia droryana</i>	3.05
<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	3.62
<i>Tetragona clavipes</i>	3.24
<i>Melipona scutellaris</i>	3.13
<i>Melipona quadrifasciata</i>	3.09
<i>Frieseomellita varia</i>	4.09
<i>Melipona bicolor</i>	3.09
<i>Melipona rufiventris</i>	4.10
<i>Melipona subnitida</i>	3,21
<i>Scaptotrigona depilis</i>	3.65
<i>Apis mellifera</i>	pH
Romã	3.49
Cana-de-açúcar	4.11
Caju	3.60
Laranjeira	4.16
Eucalipto	3.83
Angico	3,49
Algaroba	3.83
Cipó-uva	3.79
Assa-peixe	3.81
Silvestre	3.82

4.4 Análise por espectrometria de massas e análise quimiométrica do mel das abelhas sem ferrão

O perfil químico de cada uma das amostras de mel gerados pela análise de espectrometria de massas *fingerprint* ESI(-)-EM foram coletados e os dados submetidos a análise quimiométrica pelo método de PCA. A figura 22 mostra a análise de PCA através dos dados obtidos pelo *fingerprint* ESI(-)-EM de todas as amostras de mel de abelhas sem ferrão nativas do Brasil coletadas. Devido ao conjunto de características polares e a alta sensibilidade desta técnica analítica, as amostras foram divididas em três grupos principais (Figura 22). As análises de *fingerprint* ESI(-)-ME (Figura 23) mostram o perfil químico típico das amostras dentro de cada grupo e as principais diferenças encontradas entre os grupos.

O grupo 1 é composto pelas amostras de mel de *F. varia*, *N. testaceicornis* e *T. angustula* (MG). As amostras de mel de *T. angustula* (MG) (Figura 23 A) e *N. testaceicornis* (Figura 23 B), representam as características de *fingerprint* do grupo 1, onde pode ser observada a presença de íons de m/z 225, 301, 387, 455, 549.

Sawaya *et al*, (2006), em estudos com amostras de própolis de *T. angustula* obtidas de regiões distintas do Brasil encontraram íons de m/z 453, 455 e 471 que foram diagnosticados como sendo íons derivados da resina de *Schinus terebenthifolius* - Família Anacardiaceae, conhecida no Brasil como “aroeira vermelha”. Os íons de m/z 455 e 471 também foram observados nas amostras de mel de *T. angustula* (MG) e *N. testaceicornis* (Figura 23 A e 23 B), respectivamente, e o íon de m/z 453 foi observado nas amostras de mel de *T. clavipes* (Figura 23 C), *M. bicolor* (Figura 23 D), *T. angustula* (SP) (Figura 23 E) e *S. depilis* (Figura 23 F). Fato que pode ser explicado devido à presença de polens de *S. terebenthifolius* encontrado nas amostras de mel.

Segundo Ramalho *et al*, (1990) algumas espécies de abelhas nativas costumam visitar esta espécie de planta no estado São Paulo.

O grupo 2 é composto pelas amostras de mel de *M. bicolor* e *T. angustula* (SP). As figuras 23 D e E, representam as características de *fingerprint* do grupo 2, onde pode ser observada a presença de íons de m/z 249, 339, 385, 453 e diferença entre a intensidade de sinais dos íons de m/z 385 e 453. A amostra de mel *T. clavipes* ficou localizada pela análise de PCA entre os grupos 1 e 2 (Figura 23 C) por apresentar íons de m/z 301 e 387 característicos do grupo 1 e os íons de m/z 249, 453 característicos do grupo 2.

O grupo 3 é composto pelas amostras de mel de *P. remota*, *M. scutellaris* e *M. subnitida*. As figuras 23 G e H representam as características de *fingerprint* do grupo 3, onde pode ser observada a presença de íons de m/z 341, 431, 477, 683 e a nítida diferença na intensidade de sinais dos íons de m/z 431 e 477, sugerindo estes íons estar relacionados com a maior atividade antimicrobiana do mel de *P. remota* em relação ao mel de *M. subnitida* e *M. scutellaris*. A amostra de mel de *S. depilis* ficou localizada pela análise de PCA mais próxima ao grupo 2 (Figura 23 F) por apresentar os íons de m/z 249 e 543, entretanto o íon de m/z 249 se apresentou com menor intensidade comparado com as demais amostras deste grupo.

A amostra do mel de *P. droryana* se distanciou dos três grupos formados pela análise de PCA (Figura 22), apresentado um perfil químico bastante distinto em relação ao perfil das demais amostras (Figura 23 I).

A diferença na composição química das amostras de mel das abelhas sem ferrão e diferença na intensidade dos sinais de alguns íons demonstradas através dos resultados da análise de espectrometria de massas *fingerprint* ESI(-)-EM podem estar relacionados

com os diferentes níveis de atividade antimicrobiana apresentados pelas amostras frente aos micro-organismos testados.

Figura 22. PCA da análise dos dados de *fingerprints* ESI(-)-EM para as amostras dos meis de abelhas sem ferrão nativas do Brasil, (para abreviação das espécies, consultar Tabela 2).

Figura 23. Análise por espectrometria de massa *fingerprints* ESI(-)-EM dos meis de abelhas sem ferrão nativas do Brasil. (A) *T. angustula* de Minas Gerais – Grupo 1; (B) *F. varia* – Grupo 1; (C) *T. clavipes* – intermediária Grupos 1 e 2; (D) *M. bicolor* – Grupo 2; (E) *T. angustula* de São Paulo – Grupo 2; (F) *S. depilis* – intermediária Grupos 2 e 3; (G) *P. remota* – Grupo; (H) *M. subnitida* – Grupo 3; (I) *P. droryana* – não se assemelhou a nenhum das amostras.

O íon de m/z 301 encontrado no mel de *T. angustula* (MG) (Figura 23 A), *N. testaceicornis* (Figura 23 B), *T. clavipes* (Figura 23 C) juntamente com íon de m/z 315 (Figura 23 C); o íon de m/z 287 encontrado no mel de *M. bicolor* (Figura 23 D) e o íon de m/z 271 encontrado na amostra de *S. depilis* (Figura 23 F), foram identificados como sendo flavonóides (JUSTESEN, 2000; PETRUS, 2001). Cada vez mais os flavonóides estão se tornando alvos de pesquisas medicas. Muitas propriedades medicinais são atribuídas aos flavonóides, incluindo atividade anti-inflamatória, atividade antimicrobiana (HAVSTEEN, 1983; HARBORNE & BAXTER, 1999), atividade antialérgica, atividade antioxidante (MIDDLETON & CHITHAN, 1993) e atividade antifúngica (HARBORNE & WILLIAMS, 1992).

O íon de m/z 453 encontrado na amostra de *T. clavipes* (figura 23 C) apresentou-se com maior intensidade comparando com as amostras de *M. bicolor* (Figura 23 D), *T. angustula* (SP) (Figura 23 E) e *S. depilis* (Figura 23 F) onde o mesmo íon foi encontrado. No caso da amostra de mel de *N. testaceicornis* a qual se destacou entre as demais amostras no teste de difusão em ágar pela alta atividade antimicrobiana, o íon de m/z 471 apresentou-se com uma alta intensidade, sugerindo estes dois elementos estar associados com a maior atividade antimicrobiana apresentada pelo mel de *T. clavipes* e

N. testaceicornis, uma vez que as folhas e frutos de *S. terebenthifolius* são popularmente usados com propósitos medicinais e contém substâncias com propriedades medicinais conhecidas (JAIN *et al*, 1995; SCHMOURLO *et al*, 1997).

Sete das onze amostras de mel das abelhas sem ferrão apresentaram *fingerprint* ESI(-)-EM com íons característicos de *S. terebenthifolius* as quais demonstraram possuir atividade antimicrobiana significativa nos testes de difusão em ágar e microdiluição. Estes resultados indicam que *S. terebenthifolius* é planta importante como fonte de néctar e pólen para as abelhas ferrão nativas do Brasil.

4.5 Análise por espectrometria de massas e análise quimiométrica dos meis de *Apis mellifera*

O perfil químico das amostras de mel de *A. mellifera* gerados pela análise de espectrometria de massas *fingerprint* ESI(-)-EM foram coletados e os dados foram submetidos a análise quimiométrica pelo método de PCA. A figura 24 mostra o agrupamento das amostras de mel de *A. mellifera* devido as suas características polares, formando um grupo principal (grupo 1). As análises de *fingerprint* ESI(-)-ME (Figura 25) mostram o perfil químico típico obtido para o grupo 1 e as principais diferenças obtidas entre as demais amostras que não foram agrupadas.

O grupo 1 é compostos pelos meis de caju, cipó-uva, angico, laranjeira, silvestre, assa-peixe e eucalipto. As amostras de mel de eucalipto (Figura 25 J) e caju (Figura 25 K), representam as características de *fingerprint* do grupo 1, onde pode ser observada a presença de íons de m/z 311, 339, 341, 387 e 477. A amostra de mel de algaroba ficou localizada próximo ao grupo 1 pela análise de PCA (Figura 25 L) por apresentar íons de m/z 341 e 387 característicos do grupo 1.

O íon de m/z 250 encontrado na amostra de mel de caju (*Anacardium occidentale*) (Figura 25 K) apresentou-se mais intenso quando comparado ao mel de

algaroba (Figura 25 L). Estas amostras de mel de *A. mellifera* que apresentaram este íon podem sugerir uma participação deste elemento na atividade antimicrobiana deste mel em relação às demais amostras de mel de *A. mellifera*, uma vez que o cajueiro também pertence à Família Anacardiaceae como *S. terebenthifolius*.

A melhor eficácia apresentada pelo mel de caju no controle dos micro-organismos, pode em parte ser devido a taninos e a atividade antimicrobiana do ácido anacárdico encontrados nas plantas de *A. occidentales*. As atividades biológicas dos derivados do ácido anacárdico têm atraído considerável atenção por agir como agentes antitumorais (ITOKAWA *et al*, 1987; ITOKAWA *et al*, 1989), antimicrobianos (HIMEJIMA & KUBO, 1991; MUROI & KUBO, 1993) e antioxidantes (AMORATI *et al*, 2001). Os diferentes compostos produzidos a partir desta árvore oferecem uma vasta gama de aplicações. A casca e as folhas de cajueiro são uma rica fonte de taninos, um grupo de fitoquímicos com documentadas atividades biológicas, incluindo efeitos anti-inflamatórios (AKINPELU, 2001).

As amostras de mel de romã (Figura 25 M) e de cana de açúcar (Figura 25 N) se distanciaram do grupo 1 formado pela análise de PCA (Figura 25), apresentando perfis químicos distintos em relação as demais amostras. Entretanto, o mel de romã se localizou mais próximo do grupo 1 por apresentar o íon de m/z 387, característico deste grupo. Os resultados nos mostram ainda uma alta intensidade de sinal dos íons de m/z 563 e 209 encontrados somente nas amostras de mel de romã e cana, respectivamente.

ESI(-)-EM do mel das abelhas *Apis mellifera*

Figura 24. Agrupamento das amostras dos meis de *Apis mellifera* do Sudeste e Nordeste do Brasil pela análise de PCA do *fingerprint* ESI(-)-EM.

Figura 25. Análise por espectrometria de massa *fingerprints* ESI(-)-EM dos meis de *Apis mellifera* (J) mel de eucalipto – Grupo 1; (K) mel de caju – Grupo 1; (L) mel de algaroba localizado próximo ao Grupo 1; (M) mel de romã e (N) mel de cana-de-açúcar – não se assemelharam com nenhuma das amostras.

No Brasil é comum o uso de plantas medicinais no tratamento de diversas infecções (SEPTIMIO, 1994). Destacando-se no amplo contexto da etnofarmacologia, a utilização da romã para o tratamento de processos infecciosos internos e externos (LANSKY *et al*, 2004). O extrato da casca do fruto apresenta atividade antimicrobiana contra *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, foram ainda observadas atividades contra cocos Gram-positivos e leveduras (DINIZ *et al*, 1997; NASCIMENTO *et al*, 2000; HOLETZ *et al*, 2002; VASCONCELOS *et al*, 2003).

Navarro *et al*, (1996) realizaram um estudo de atividade antimicrobiana “*in vitro*” com varias espécies de plantas, com o intuito de fazer uma triagem de plantas potencialmente ativas contra micro-organismos patogênicos, dentre eles *S. aureus*, *E.*

coli, *P. aeruginosa*. O estudo mostrou que romã (*Punica granatum*) possui efeito antimicrobiano contra todas as linhagens microbianas testadas. Jiménez Misas *et al*, (2002) analisaram extratos das folhas e caule das plantas de várias famílias para avaliar as propriedades antimicrobianas e verificaram que o extrato de *P. granatum* apresentou o melhores resultados, inibindo mais de 50% do crescimento microbiano.

Rodrigues (1996) cita diversas árvores nativas conhecidas pela etnofarmacologia por terem propriedades antimicrobianas dentre elas estão: *Anacardium occidentale* (cajeeiro), *Anadenanthera colubrina* (angico), *Psidium guajava* (goiabeira), *Mimosa tenuiflora* (tepezcuíte), *Hymenaea courbaril* (jatobá), *Schinus terebinthifolia* (aroeira) e *Tabebuia avellanedae* (ipê-roxo).

Os resultados nos permitem concluir que a diferença na atividade antimicrobiana apresentada entre os meis de *A. mellifera* está diretamente relacionada com a fonte floral, indicando ainda que *A. occidentale* (caju) e *P. granatum* (romã) são plantas importantes como fonte de néctar e pólen para as abelhas *A. mellifera*.

4.6 Análise dos grãos de pólen nas amostras de mel

As abelhas sem ferrão (Meliponíneos) e *Apis mellifera* são de grande importância econômica como agentes polinizadores, visando à manutenção de espécies vegetais, o equilíbrio ecológico nos ecossistemas e a produção de mel e própolis (KERR 1987). Dessa forma, conhecer as espécies vegetais utilizadas como fontes de néctar e pólen é de suma importância. As plantas visitadas para a coleta de néctar podem ser identificadas a partir da análise do pólen contido no mel (BARTH, 1970; LOUVEAUX *et al*, 1970), permitindo também a caracterização dos nectários e sua origem geográfica (CARVALHO *et al*, 2001).

Os grãos de pólen possuem formas variáveis e típicas para cada espécie vegetal. Portanto, o trabalho de identificação do pólen no mel se baseia na análise de sua

morfologia utilizando-se de microscópio óptico com aumentos entre 400 e 1000 vezes. A identificação dos tipos polínicos para análise qualitativa foi realizada por comparação com as lâminas de referência confeccionadas a partir de botões florais das espécies de plantas que se encontram próximas ao meliponário do Departamento de Ecologia FFCLRP-USP e com a literatura especializada. Foi identificado um total de setenta tipos polínicos distribuídos em dezoito famílias constituídas por espécies arbóreas, arbustivas e herbáceas. Dentre elas, sete foram identificados até o nível de gênero. A família Fabaceae foi representada por cinco gêneros, as famílias Asteraceae e Myrtaceae por um gênero. Os demais tipos polínicos foram identificados somente até a família botânica. A identificação de espécies através da análise polínica é bastante dificultada em alguns gêneros, devido à grande semelhança entre os grãos de pólen dessas espécies.

Os tipos polínicos dominantes foram representados pelas seguintes famílias: Fabaceae, presente no mel de onze das doze espécies de abelhas estudadas; Myrtaceae (gênero *Eucalyptus*) e Anacardiaceae presente no mel de oito das doze espécies de abelhas sem ferrão.

As famílias de plantas menos representadas foram: Rubiaceae, Burseraceae, Bignoniaceae, Boraginaceae, e Amaryllidaceae, sendo visitadas somente pelas abelhas *P. droryana*, *M. bicolor*, *M. subnitida*, *M. scutellaris*, respectivamente.

Para a amostra de mel de *T. angustula* (SP) foram identificados pólenes pertencentes às famílias Anacardiaceae, Poaceae, Rutaceae e Fabaceae, onde foram encontrados dois gêneros da família Fabaceae: *Mimosa* e *Caesalpinia* (Figura 26). Entretanto, para o mel de *T. angustula* (MG) foram identificados pólenes pertencentes às famílias Asteraceae (gênero *Aspilia*), Poaceae, Anacardiaceae e Fabaceae (gênero *Adenanthera*) (Figura 27). *Tetragonisca angustula* é considerada uma espécie generalista por visitar diversas fontes de recursos tróficos (CORTOPASSI-LAURINO,

1982), embora algumas famílias botânicas podem se destacar na sua dieta, como a Euphorbiaceae (KNOLL, 1990). Contudo, representantes de diversas famílias podem ser visitados para coleta de alimentos como Anacardiaceae, Caesalpiniaceae, Oxalidaceae, Rutaceae e Sapotaceae (CARVALHO *et al*, 1995).

As fontes de pólen e néctar para a espécie *P. remota* foram Fabaceae (gênero *Mimosa*), Poaceae, Araceae, Solanaceae, Rutaceae, Arecaceae (Figura 28). Segundo Ramalho *et al*, (1990) muitas das espécies do gênero *Mimosa* são fontes de pólen e néctar para os meliponíneos. Para o mel de *P. droryana* foram identificados pólenes pertencentes às famílias: Anacardiaceae, Malpighiaceae, Myrtaceae, Sapindaceae, Araceae e Rubiaceae (Figura 29). As famílias de plantas visitadas pela abelha *N. testaceicornis* foram: Melastomataceae, Amaranthaceae, Asteraceae e Fabaceae (gêneros *Delonix* e *Caesalpinia*), (Figura 30). Os resultados nos permitem concluir ainda que essas possam ser fontes promissoras de néctar, refletindo em meis com atividade antimicrobiana.

Segundo Carvalho e Marchini, (1999) as famílias de plantas, Fabaceae, Liliaceae, Mimosaceae e Myrtaceae são frequentemente visitadas por *N. testaceicornis*.

O mel de *T. angustula* (MG) foi bactericida contra as cinco linhagens de bactérias, sendo esta atividade produzida em menores concentrações comparadas ao mel de *T. angustula* (SP) (Tabela 5 e 6). Pela análise quimiométrica estas duas amostras foram agrupadas separadamente (Figura 22), podendo este resultado ser atribuído a diferenças na composição química destas amostras (Figura 23). Estas diferenças podem ser em função da coleta de pólen de Asteraceae, Amaranthaceae e Fabaceae (gênero *adenanthera*) (Figura 27).

Figura 26: Pólen encontrados na amostra de mel de *Tetragonisca angustula* (SP). (A) Rutaceae; (B) Anacardiaceae; (C) Poaceae; (D) Fabaceae (gênero *Mimosa*); (E) Fabaceae (gênero *Caesalpinia*); (F) Anacardiaceae.

Figura 27: Pólen encontrados na amostra de mel de *Tetragonisca angustula* (MG). (A) Asteraceae (gênero *Aspilia*); (B) Amaranthaceae; (C) Anacardiaceae; (D) Poaceae; (E) Fabaceae (gênero *Adenanthera*); (F) Asteraceae.

Figura 28: Pólen encontrados na amostra de mel de *Plebeia remota*. (A) Fabaceae (gênero *Mimosa*); (B) Poaceae; (C) Araceae; (D) Solanaceae; (E) Rutaceae; (F) Arecaceae.

Figura 29: Pólen encontrados na amostra de mel de *Plebeia droryana*. (A) Anacardiaceae; (B) Malpighiaceae; (C) Myrtaceae; (D) Sapindaceae; (E) Araceae; (F) Rubiaceae.

Figura 30: Pólen encontrados na amostra de mel de *Nannotrigona testaceicornis*. (A) Melastomataceae; (B) Fabaceae (gênero *Delonix*); (C) Fabaceae (gênero *Caesalpinia*); (D) Amaranthaceae; (E) Fabaceae (gênero *Caesalpinia*); (F) Asteraceae.

A presença de pólen de Poaceae, Myrtaceae, Anacardiaceae, Fabaceae (gênero *Delonix*), Asteraceae, Malpighiaceae identificados na amostra de *T. clavipes* (Figura 31), nos permite concluir que esta espécie de abelha utiliza essas plantas como fonte de néctar e pólen. Extratos de hidro-alcoólicos de folhas e frutos de *Eugenia uniflora*, *Psidium guajava* (Myrtaceae); *Pterodon emarginatus*, *Myroxylon peruiferum* (Fabaceae); *Schinus terebenthifolius* (Anacardiaceae) apresentam atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *S. pyogenes*, *S. aureus* (GONÇALVES, 2005). As substâncias com propriedades medicinais que algumas árvores conhecidas pela etnofarmacologia possuem, pode em parte ser transferidas para o mel por intermédio do néctar e pólen coletados pelas abelhas forrageadoras. A presença do pólen de Anacardiaceae na amostra de *T. clavipes* pode confirmar os resultados obtidas pela análise de espectrometria de massas ESI(-)-EM onde o íons de m/z 453 e 455 de *S. terebenthifolius* (Anacardiaceae) foram encontrados. Portanto, este pólen pode ser de *S. terebenthifolius*.

As plantas nectaríferas são de grande importância na produção de mel e para fornecer carboidratos e energia para as abelhas. Compreendem um vasto número de espécies variando de região para região (BARTH, 1989). No Sudeste brasileiro, salientam-se para a produção de mel as flores das plantas cítricas (*Citrus sp.*), Asteraceae, Brassicaceae, Polygonaceae entre outras (BARTH, 1989; CORTOPASSI-LAURINO & RAMALHO, 1988; MORETI *et al*, 2002).

Na amostra de mel de *M. scutellaris* foram identificados pólenes pertencentes às famílias: Myrtaceae, Fabaceae (gênero *Mimosa*), Poaceae, Amaryllidaceae (presente somente na amostra de *M. scutellaris*) (Figura 32).

Figura 31: Pólen encontrado na amostra de mel de *Tetragona clavipes*. (A) Poaceae; (B) Myrtaceae; (C) Anacardiaceae; (D) Fabaceae (gênero *Delonix*); (E) Asteraceae; (F) Malpighiaceae.

Figura 32: Pólen encontrados na amostra de mel de *Melipona scutellaris*. (A) Amaryllidaceae; (B) Myrtaceae; (C) Fabaceae (gênero *Mimosa*); (D) Poaceae.

Os pólen predominantes identificados na amostra de mel de *M. quadrifasciata* foram da família Solanaceae, Anacardiaceae e Fabaceae (gênero *Mimosa*) (Figura 33). Segundo Absy *et al* (1984), *M. quadrifasciata* faz a coleta de pólen de mais de dezenove espécies de plantas podendo ser considerando como sendo generalista. Em contraste, segundo Antonini *et al* (2006), *M. quadrifasciata* pode se especializar em determinadas famílias, relatando um elevado número de visitas a poucos recursos florais, incluindo algumas famílias bem representadas como Solanaceae e Myrtaceae indicando que suas flores são importantes fontes de pólen para *M. quadrifasciata*.

Figura 33: Pólen encontrados na amostra de mel de *Melipona quadrifasciata*. (A) Solanaceae; (B) Anacardiaceae; (C) Fabaceae (gênero *Mimosa*).

A amostra de mel de *F. varia* apresentou pólen das famílias Fabaceae (gêneros *Piptadenia*, *Caesalpinia*, *Delonix*, *Mimosa*), Amaranthaceae, Rutaceae, Melastomataceae, Myrtaceae (*Eucalyptus*) (Figura 34).

Os pólenes identificados na amostra de mel de *M. bicolor* foram Anacardiaceae, Myrtaceae (*Eucalyptus*), Solanaceae, Fabaceae (*Caesalpinia*), Burseraceae e Bignoniaceae. Embora as forrageiras de *M. bicolor* prefiram o pólen das Myrtaceae, Melastomataceae e Solanaceae (RAMALHO *et al*, 1989;. WILMS & WIECHERS, 1997). Neste estudo pudemos observar pólen de Burseraceae (família de plantas angiospermas, pertencente à ordem Sapindales que inclui 18 gêneros e 550 espécies dentre elas a mirra e o incenso) e Bignoniaceae (apresenta aproximadamente 110 gêneros e 800 espécies, entre elas podemos citar os ipês do Brasil e Jacarandá), presente somente na amostra de mel de *M. bicolor* (Figura 35).

A presença de pólen de Arecaceae, Poaceae, Fabaceae (gênero *Mimosa*), Myrtaceae, Anacardiaceae, Boraginaceae, Amaranthaceae identificados na amostra de *Melipona subnitida* (Figura 36), nos permite concluir que esta espécie de abelha, embora seja de Mossoró RN, utiliza-se das mesmas famílias de plantas que as abelhas do sudeste como fonte de néctar e pólen.

Em relação à amostra de mel de *S. depilis* foram identificados pólenes pertencentes às famílias Sapindaceae, Myrtaceae (*Eucalyptus*), Fabaceae (*Caesalpinia*) e Anacardiaceae (Figura 37). Segundo Imperatriz-Fonseca *et al* (1989) e Ramalho *et al* (1989), os gêneros *Mimosa* (Fabaceae) e *Eucalyptus* (Myrtaceae) estão presentes na maioria dos levantamentos de flora visitada por meliponíneos no sudeste do Brasil. A frequência do pólen de Myrtaceae na dieta de *S. depilis* corrobora resultados de estudo de hábito alimentar com várias espécies de meliponíneos em diferentes regiões do Brasil (ABSY *et al*, 1984; KLEINERT-GIOVANINI & IMPERATRIZ-FONSECA 1987; RAMALHO 1990; RAMALHO *et al*, 1991, 2007; WILMS & WIECHERS 1997).

Figura 34: Pólens encontrados na amostra de mel de *Frieseomelitta varia*. (A) Fabacea (gênero *Piptadenia*); (B) Amaranthaceae; (C) Rutaceae; (D) Fabaceae (gênero *Mimosa*); (E) Melastomataceae (F) Myrtaceae (gênero *Eucalyptus*); (G) Fabaceae (gênero *Caesalpinia*); (H) Fabaceae (gênero *Delonix*); (I) Fabaceae.

Figura 35: Pólen encontrados na amostra de mel de *Melipona bicolor*. (A) Anacardiaceae; (B) Myrtaceae (gênero *Eucalyptus*); (C) Solanaceae; (D) Fabaceae (gênero *Caesalpinia*); (E) Burseraceae; (F) Bignoniaceae.

Figura 36: Pólen encontrados na amostra de mel de *Melipona subnitida*. (A) Arecaceae; (B) Poaceae e Fabaceae; (C) Anacardiaceae; (D) Boraginaceae; (E) Fabaceae (gênero *Mimosa*); (F) Amaranthaceae.

Figura 37: Pólen encontrados na amostra de mel de *Scaptotrigona depilis*. (A) Sapindaceae; (B) Myrtaceae (gênero *Eucalyptus*); (C) Fabaceae (gênero *Caesalpinia*) ; (D) Fabaceae; (E) Fabaceae (gênero *Caesalpinia* sp2); (F) Anacardiaceae.

O conhecimento da flora local é importante para conhecer as principais fontes de néctar e pólen, sua abundância e sazonalidade. A abundância das floradas e a sua distribuição durante o ano faz com que este seja um item importante neste estudo do meio ambiente. A diversidade de plantas é um dos fatores que favorecem a manutenção de comunidades de abelhas em áreas urbanizadas como parques e jardins (TAURA & LAROCA, 1991). As espécies estudadas apresentaram hábitos generalistas de coleta de pólen visitando várias espécies botânicas comumente encontradas em jardins, parques e fragmentos florestais. Essa vegetação, assim como outras devem ser mantidas em áreas apropriadas que tem por objetivo a preservação dessas espécies.

Os resultados obtidos através da análise melissopalínológica ainda sugerem espécies vegetais nectaríferas e poliníferas como algumas espécies pertencente as famílias Myrtaceae, Anacardiaceae e Fabaceae que podem compor uma flora apícola mais rica favorecendo a qualidade dos produtos derivados da apicultura.

Conclusões

5. Conclusões

- A atividade antimicrobiana do mel de *N. testaceicornis*, *P. remota*, *T. clavipes* e *S. depilis* foram mais eficientes do que atividade antimicrobiana do mel de manuka que é consagrado internacionalmente como mel terapêutico.

- A maioria das amostras de mel das 12 espécies de abelhas sem ferrão apresentou atividade bactericida e fungicida, em particular os meis de *N. testaceicornis*, *P. droryana*, *P. remota* e *T. clavipes*, mostrando-se eficazes no controle dos micro-organismos. Portanto, estes meis têm potencial para uso tópico em terapias de tratamento alternativo no combate as infecções cutâneas.

- Entre os 10 tipos de meis produzidos pelas abelhas *Apis mellifera*, somente os meis de caju, cana, romã e eucalipto apresentaram atividade bactericida.

- Os meis elaborados pelas abelhas sem ferrão *T. clavipes* e *S. depilis*, apresentam maior atividade antifúngica contra *T. rubrum*, em comparação com os meis das outras quatro espécies de abelhas sem ferrão e todas as 25 amostras de mel de *Apis mellifera*. Em particular os meis das abelhas *T. clavipes* e *S. depilis* produziram os maiores halos de inibição.

- Nenhuma amostra de mel de *Apis mellifera* apresentou atividade antifúngica contra *T. rubrum*.

- Os meis das abelhas sem ferrão *M. rufiventris*, *M. subnitida* e o mel de Laranjeira (*Apis mellifera*) não produziram atividade antimicrobiana contra qualquer dos micro-organismos testados.

- A linhagem da levedura *Candida albicans* mostrou-se resistente a todas as amostras de mel.

- O presente estudo demonstrou o potencial antimicrobiano do mel das abelhas sem ferrão *in vitro*, sendo capaz de inibir bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e

também o fungo patogênico *T. rubrum*. Estas propriedades fazem do mel um bom medicamento para ser aplicado sobre feridas infectadas devido a sua atividade antimicrobiana e a inocuidade para as células do corpo, facilitando a cicatrização. Esperamos que esta informação permita um aumento do uso terapêutico do mel para pacientes e para sociedade como um todo.

Referências bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

- ABSY, M., CAMARGO, M. F., KERR, W. E., & MIRANDA, I. P., (1984). Espécies de plantas visitadas por Meliponinae (Hymenoptera: Apoidea), para coleta de pólen na região do Médio Amazonas. *Rev Bras Bio* 44, 227-237.
- ADCOCK, D. (1962). The effect of catalase on the inhibine and peroxide values of various honeys. *J Apicultural Res* 38-40.
- AHMED, A. K., HOESKSTRA, M. J., HAGE, J. J., KARIM, R. B. (2003). Honey-medicated dressing: transformation of an ancient remedy into modern therapy. *Ann Plast Surg* 50, 143-147; discussion 147-148.
- AKINPELU, D. A. (2001). "Antimicrobial activity of Anacardium occidentale bark." *Fitoterapia* 72 (3), 286-87.
- ALLEN, K. L., MOLAN, P. C., REID, G. M. (1991). A survey of the antibacterial activity of some New-Zealand honeys. *J Pharmacy & Pharmacology* 43, 817-822.
- AMORATI, R., PEDULLI, G. F., VALGIMGLI, L., ATTANASI, O. A., FILIPPONE, P., FIORUCCI, C., SALADINO, R. (2001). Absolute Rate Constants for the Reaction of Peroxyl Radicals with Cardanol Derivatives. *J Chem Soc* 2, 2142-2146.
- ANTONINI, Y., COSTA, R. G. & MARTINS, R. P. (2006). Floral preferences of a neotropical stingless bee, *Melipona quadrifasciata* Lepeletier (Apidae: Meliponina) in a urban forest fragment. *Braz J Biol* 66, 463 471.
- APIDIANAKIS, Y., MINDRINOS, M. N., XIAO, M., LAU, G. W., BALDINI, R. L., DAVIS, R. W., RAHME, L. G. (2005). Profiling early infection responses: *Pseudomonas aeruginosa* eludes host defenses by suppressing antimicrobial peptide gene expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. *PNAS* 102 (7), 2573-2578.
- ARISTÓTELES (1910). Natural History. 350 B. C., Thompson, D. A., Ed. Oxford University Press: Oxford.
- AZEREDO, M. A. A. & AZEREDO, L. C. (1999). Características físico-químicas dos méis do município de São Fidélis-RJ. *Ciência e Tecnologia de Alimento* 19, 3-7.
- BANKOVA, V. B., DE CASTRO, S. L., MARCUCCI, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31, 3-15.
- BARTH, O. M. (1970). Microscopic analysis of some samples of honey. 1. Dominant pollen. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 42, 351-366.
- BARTH, O. M. (1989). The pollen in the Brazilian honey. Editora Luxor, Rio de Janeiro. 150 p.

- BERGMAN, A., YANAI, J., WEISS, J., BELL, D. & DAVID, M. P. (1983). Acceleration of wound healing by topical application of honey. *J Am of Surgery* 145, 374-376.
- BEZERRA, J. A., SOUZA, E. (2002). A rainha do sertão, *Revista Globo Rural* 17, n. 202, 62-69.
- BOGDANOV, S. (1989). Characterisation of antibacterial substaces in honey. *Lebensm Wiss Technol* 17, 74-76.
- BOGDANOV S. (1997). Nature and origin of the antibacterial substances in Honey. *Lebensm Wiss Technol* 30, 748-753.
- BRUIJN, L. L. M., SOMMEIJER, M. J. (1995). The composition and properties of honeys of stingless bees (*Melipona*), in: Perspectives for Honey Production in the Tropics Proc. Vth Int. Conf. on apiculture in tropical climates IBRA, 149-168.
- BURLANDO, F. (1978). Sull'azione terapeutica del miele nelle ustioni. *Minerva Dermatologica* 113, 699-706.
- CAMPOS, R. G. M. (1987). Contribuição para o estudo do mel, pólen, geléia real e própolis. *Boletim da Faculdade de Farmacia de Coimbra* 11 (2), 17-47.
- CARVALHO, C. A. L., MARQUES, O. M., SAMPAIO, H. S. (1995). Abelhas (Hymenoptera, Apoidea) em Cruz das Almas-Bahia: 1. espécies coletadas em fruteiras. *Insecta* 4, 11-17.
- CARVALHO, C. A. L.; MARCHINI, L. C. (1999). Plantas visitadas por *Apis mellifera* L. no vale do rio Paraguaçu, Município de Castro Alves, Bahia. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo. 22, 333-338.
- CARVALHO, C. A. L., MORET, I A. C. C. C., MARCHINI, L. C., ALVES, R. M. O., OLIVEIRA, P. C. F. (2001). Pollen spectrum of honey of “uruçu” bee (*Melipona scutellaris* Latreille, 1811). *Revista Brasileira de Biologia* 61, 63-67.
- CEYHAN, N., UGAR, A. (2001). Investigation of in vitro antimicrobial of honey. *Rivista Di Biologia-Biology Forum* 94, 363-372.
- CHIRIFE, J., SCARMATO, G., HERSZAGE, L., (1982). Scientific basic for use of granulated sugar in treatment of infected wounds. *Lancer* 560-561.
- collision activation mass spectrometry for the characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs. *J of Chromatography* 902, 369-379.
- COOPER, R. A., MOLAN, P. C., HARDING, K. G. (1999). Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds, *J. R. Soc. Med* 92, 283-285.
- COOPER, R. A., HALAS, E., MOLAN, P. C. (2002). The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *J Burns Care Rehab* 23 (6), 366-370.

- CORTOPASSI-LAURINO, M. (1982). Divisão de recursos tróficos entre abelhas sociais principalmente em *Apis mellifera* Linné e *Trigona (Trigona) spinipes Fabricius* (Apidae, Hymenoptera). Tese (Doutorado) IB-USP, São Paulo, 180 p.
- CORTOPASSI-LAURINO, M., RAMALHO, M. (1988). Pollen harvest by africanized *Apis mellifera* and *Trigona spinipes* in São Paulo: botanical and ecological views. *Apidologie* 19, 1-24
- CORTOPASSI-LAURINO, M. & GELLI, D. S. (1991). Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action antibactérienne des mieis d'abellies africanisées *Apis mellifera* et de Méliponinés du Brésil. *Apidologie* 22, 61-73.
- COSTA, L. S. M. (1999). Determination of votatile compounds of different botanical origin brazilian honeys. *Food Chem* 65, 347-352.
- COUTO, R. H. N., & COUTO, L. A. (2006). Apicultura: Manejo e Produtos. 3 ed. Jaboticabal: Funep. 49-52.
- CRANE, E. (1983). *O livro do mel*. São Paulo: Livraria e Editora Nobel S.A, 225 p.
- CRANE, E. (1987). *O livro do mel* 2 ed. São Paulo: Nobel. 226 p
- CRANE, E. (1990). Bees and beekeeping: science, practice and world resources, Heinemann Newnes, Oxford. 614 p.
- CULLINEY, T. W. (1983). Origin and evolutionary history of the honeybees. *Apis Bee World* 64, 29-37.
- DINIZ, M. F. F. M., Oliveira, R. A. G., Medeiros, A. C. D., Malta-Junior, A. (1997). Memento fitoterápico: *As plantas como alternativa terapêutica*: conhecimentos populares e científicos. João Pessoa: Universidade/UFPB 148-153.
- DOLD, H., DU, D. H., DZIAO, S. T. (1937). Nachweis antibakterielller, hitzeund lichtempfindilicher Hemmungsstoffe (Inhibine) im Naturhonig Blütenhonig. *Z. Hyg. Infektionskr* 120, 155-167.
- DU TOIT, I. J., GROBLER, S. R., KOTZE, V. W. T. J., BASSON, N. J. (1995). Fluoride, calcium and phosphorus levels in bee honey and water. *S Afr J Sci* 91, 391-392.
- DUMRONGLERT, E. (1983). A follow-up study of chronic wound healing dressing with pure natural honey. Council Thailand. *J Natl Res* 15 (2), 39-66.
- DUNFORD, C., COOPER, R., MOLAN, P., WHITE, R. (2000). The use of honey in wound management, *Nurs Stand* 15, 63-68.
- DUSTMAN, J. H. (1979). Antibacterial effect of honey. *Apiacta*. 14, 7-11.
- EFEM, S. E. E. (1988). Clinical observations on the wound healing properties of honey. *British J Surgery* 75, 679-681.

- EFEM, S. E. E.; UDOH, K. T. & IWARA, C. I. (1992). The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance. *Infection* 20, 227-229.
- EFEM, S. E. E. (1993). Recent advances in the management of Fournier's gangrene: Preliminary observations, *Surgery* 113 (2), 200-204.
- ELLIS, D., MARRIOTT, D., HAJJEH, R. A., WARNOCK, D., MEYER, W. & BARTON, R. (2000). Epidemiology: surveillance of fungal infections. *Med Mycol* 38 suppl. 1, 173-182.
- EVANS, E. G. (1998). Causative pathogens in onychomycosis and the possibility of treatment resistance: a review. *J Am Acad Dermatol* 38, 32-36.
- FARIA, J. A. F. (1993) Embalagens e conservação de mel de abelhas. *Informe Agropecuário*. 106, 61-66. *J. Food Microbiol.* 31, 1-26
- FINE, M. D., MICHAEL, J., MELANIE, A., SMITH, M. P. I.A., CATHERINE, A., CARSON, P. H. D., SUNITA, S., MUTHA, M. D., STEADMAN, S. (1996). Prognosis and Outcomes of Patients With Community-Acquired Pneumonia *JAMA* 275 (2), 134-141.
- FRANKEL, S., ROBINSON, G. E., BERENBAUM, M. R. (1998). Antioxidant capacity and correlated characteristics of 14 unifloral honeys. *J Apicultural Res* 37, 27-31.
- GHELDOLF, N. & ENGESETH, N. J. (2002). Antioxidant capacity of honeys 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* 50, 3050-3055.
- GHELDOLF, N., WANG, X., ENGESETH, N. J. (2002). Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *J. Agric Food chem* 50, 5870-5877.
- GHELDOLF, N., WANG, X. H., ENGESETH, N. J. (2003). Buckwheat honey increases serum antioxidant capacity in humans. *J. Agric Food chem* 51, 1500-1505.
- GONÇALVES, A. L., ALVES FILHO, A., MENEZES, H. (2005). Hymenoptera em uma área urbana (23° 33'S; 46° 43'W). *Arq Inst. Biol* 72 (3), 353-358.
- GREEN, A. E. (1988). Wound healing properties of honey. *British J. Surgery* 75, p: 1278.
- GROSS, J. H. (2004). Mass spectrometry: a textbook. Heidelberg, Germany: *Springer Verlag*. p: 518.
- GROSSMAN, M. E., PAPPER, A. S., GARZON, M. C. & SILVERS, D. N. (1995). Invasive *Trichophyton rubrum* infection in the immunocompromised host: report of three cases. *J Am Acad Dermatol* 33, 315-318.

- GUPTA, S. K., SINGH, H. VARSHNEY, A. C., PRAKASH, P. (1992). Therapeutic efficacy of honey in infected wounds in buffaloes. *Indian J Animal Sciences* 62 (6), 521-523.
- GUPTA, S. K., SINCH, H., VARSHNEY, A. C., PRAKASH, P. & SINGH, S. P. (1993). Biochemical alterations during wound healing under influence of natural honey and ampicillin in buffaloes. *J. Indian Veterinary* 70, 45-47.
- HARBORNE, J. B. & BAXTER, H. (1999). The handbook of natural flavonoids. Chichester UK. v. 1 and 2.
- HASHIMOTO, T. & BLUMENTHAL, H. J. (1978). Survival and resistance of *Trichophyton rubrum* arthrospores. *Appl Environ Microbiol* 35, 274-277.
- HAVSTEEN, B. (1983). Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*;32,1141-1148.
- HAYDAK, M. H., PALMER, L. S., TANQUARY, M. C. & VIVINO, A. E. (1943). The effect of comercial clarification on the vitamin content of honey. *J. of Nutricion* 26, 319-321.
- HEJANE, M. J., BIHRLE, R., COOGAN, C. L. (1996). Genial Fournier's gangrene: experience with 38 patients. *Urology* 47 (5), 734-739.
- HIMEJIMA, M., KUBO, I. (1991). Antibacterial agents from the cashew *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae) nut shell oil. *J. Agric. Food Chem* 39 418.
- HIROMI, K. N. & KAZUHIRO, A. (2008). Antimicrobial activity of honey produced by stingless honey bees. *J. Apicultural Res* 47 (4), 325-328.
- HOLETZ, F. B., PESSINI, G. L., SANCHES, N. R., CORTEZ, D. A. G., NAKAMURA, C. V., DIAS-FILHO, B. P. (2002). Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97, 1027-1031.
- HUIDOBRO, J. F., SANTANA, F. J., SANCHES, M. P., SANCHO, M. T., MUNIATEGUI, S. & SIMAL-LOZANO, J. (1995). Diastase, invertase and β -glucosidase activities in fresh honey from north-west Spain. *J. Apicultural Res* 34, 39-44.
- ITOKAWA, H., TOTSUKA, N., NAKAHARA, K., TAKEYA, K., LEPOITTEVIN, J. P. & ASAKAWA, Y. (1987). Antitumor principles from Ginkgo biloba L. *Chem Pharm Bull* 35, 3016-3020.
- ITOKAWA, H., TOTSUKA, N., NAKAHARA, K., MAEZURU, M., TAKEYA, K., KONDO, M., INAMATSU, M. & MORITA, H. (1989). A quantitative structure-activity relationship for antitumor activity of long chain phenols from Ginkgo biloba L. *Chem Pharm Bull* 37, 1619-1621.

- JAIN, M. K., YU, B., RODGERS, J. M., SMITH, A. E., BOGER, E. T. A., OSTANDER, R. L., RHEINGOLD, L. (1995). Specific competitive inhibitor of secreted Phospholipase A₂ from berries of *schinus terebenthifolius*. *Phytochemistry* 39, 537-547.
- JAMES, O. B. O. L., EGROE, S. W., ENTURA, V. A. K. (1972). Some antibacterial properties of Jamaican honey. *J. West Indian Medical* 21, 7-17.
- JIMÉNEZ MISAS, C., ROJAS HERNANDEZ, N. M., LOPEZ ABRAHAM, A. M. (2002). Biological evaluation of Cuban plants. IV. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 31 (1), 29-35.
- JUSTESEN, U. (2000). Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy KERR W.E. (1987). Abelhas indígenas brasileiras (meliponíneos) na polinização e na produção de mel, pólen, geoprópolis e cera, *Informe Agropecuário* 13, n.149, 15-22.
- KHOSRAVI A.R. HOJJATOLLAH S., FARZAD K., TAHEREH Z., MOHAMMAD F. (2008). *Fungicidal potential of different Iranian honeys against some pathogenic Candida species* 47 (4), 256-260.
- KITZES, G., SCHUETTE, H. A. & ELVEHJEM, C. A. (1943). The B vitamin in honey. *J. of Nutrition* 26, 241-250.
- KLEINERT-GIOVANNINI, A. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (1987). Aspects of the trophic niche of *Melipona marginata marginata* Lepeletier (Apidae, Meliponinae). *Apidologie* 18 (1), 69-100.
- KNOLL, F., DO, R. N. (1990). Abundância relativa, sazonalidade e preferências florais de Apidae (Hymenoptera) em uma área urbana. PHD Thesis. *Departamento de Zoologia*, Universidade de São Paulo, São Paulo, 127 p.
- KUMAMOTO, C. A. & VINCES, M. D. (2005). Contribution of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cell Microbiol* 7, 1546-1554.
- KUMAR, S., TOMURA, K., NEI, M. (1993). MEGA: molecular evolutionary genetics analysis, version 1.0. *Pennsylvania State University*, University Park.
- LANSKY, E., SHUBERT, S., NEEMAN, I. (2004). Pharmacological and therapeutic properties of pomegranate. Israel: *CIHEAM-Options Mediterraneennes* 231-235.
- LARONE, D. H. (1996). Culture and Identification of Dermatophytes. *Clin Microbiol Newsletter* 18, 33-38.
- LENG, W., LIU, T., LI, R., YANG, J., WEI, C., ZHANG, W. & JIN, Q. (2008). Proteomic profile of dormant *Trichophyton rubrum* conidia. *BMC Genomics* 9, 303 p.
- LO, H. J., KÖHLER, J. R., DI DOMENICO, B., LOEBENBERG, D., CACCIAPUOTI, A., & FINK, G., LOUVEAUX, J., MAURIZIO, A., VORWOHL, G. (1970). Methodik der melissopalynologie. *Apidologie* 1, 193-209.

- LOMOVSKAYA O., WARREN M., LEE A., GALAZZO J., FRONKO R., LEE M., BLAIS, J., CHO, D., CHAMBERLAND S., RENAU, T., LEGER, R., HECKER, S., WATKINS, W., HOSHINO, K., ISHIDA H. & LEE, V.J. (2001). Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 105-116.
- LOWY, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine*. 339, 520-532.
- LUSBY P., COOMBES A.L., WILKINSON J.M. (2005). Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria, *Arch. Med. Res* 36, 464–467.
- MARCHINI, L. C., CARVALHO, C. A. L. O., ALVES, R. M. O. (1998). Caracterização físico-química de amostras de méis da abelha urucu (*Melípona scutellaris*). In: *Congresso Brasileiro de Apicultura* Salvador. Anais Salvador -BA: CBA/FAABA 12, p: 201.
- MARCHINI, L. C. (2001). Caracterização de amostras de méis de *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera-Apidae) do Estado de São Paulo, baseada em aspectos físico-químicos e biológicos. Livre Docência, Piracicaba-SP, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MCINERNEY, R. J. F. (1990). Honey – a remedy rediscovered. *J. R. Soc Med* 83, p: 127.
- Mendes, B. A. & Coelho, E. M. (1983). Considerações sobre características de mel de abelhas – Análises e critérios de inspeção. *Informe Agropecuário* 106, 56-67.
- MERCAN, N., GUVENSEN, A., CELIK, A., KATIRCIOGLU, H. (2007). Antimicrobial activity and pollen composition of honey samples collected from different provinces in Turkey. *Natural Products Res* 21, 187-195.
- MIDDLETON, J. E., CHITHAN, K. (1993). The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne J.B., editor. *The flavonoids: advances in research since 1986*. London, UK: Chapman and Hall.
- MOLAN, P. C. (1992). The antibacterial activity of honey. The nature of the antibacterial activity. *Bee World* 73, 5-28.
- MOLAN, P. C. (1997). The antibacterial activity of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. *Bee World* 73, 5–28.
- MOLAN, P. C. & RUSSELL, K. M. (1999). Non-peroxide antibacterial activity in some New Zealand honeys. *J. Apicultural Res* 27, 62-67.
- MOLAN, P. C. (2002). Re-introducing honey in the management of wounds and ulcers – theory and practice. *Ostomy Wound Manage* 48, 28–40.

- MOLAN, P. C., BETTS, J. A. (2004). Clinical usage of honey as a wound dressing: na update. *J. Wound Care*. 13, 353-356.
- MOLAN, P. C. (2005). Mode of action. In: White, R., Cooper, R., Molan, P. (2005). Honey: A Modern Wound Management Product. *Wounds UK Publications*, Aberdeen.
- MOLAN, P. C. (2006). The evidence supporting the use of honey as a wound dressing. Int: *J Low Extrem Wounds* 5, 40-54.
- MORETI, A. C. C. C., MARCHINI, L. C., SOUZA, V. C., RODRIGUES, R. R. (2002). Atlas do pólen de plantas apícolas. Papel Virtual Editora, Rio de Janeiro 89 p.
- MORGAN, J., MELTZER, M. I., PLIKAYTIS, B. D., SOFAIR, A. N., HUIE-WHITE, S., WILCOX, S. (2005). Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a casecontrol study using data from population-based candidemia surveillance. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 26, 540–547.
- MULLAI, V. & MENON, T. (2005). T. Bactericidal activity of different types of honey against clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian J of Pharmacology* 37, p: 403.
- MUROI, H., KUBO, I. (1993). Bactericidal activity of anacardic acids against *Streptococcus mutans* and their potentiation. *J. Agric. Food Chem* 41 (10), 1780-1783.
- NASCIMENTO, G. G. F. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian . of Microbiol* 31, 247- 56.
- NATARAJAN, S., WILLIAMSON, D., GREY, J., HARDING, K. G., COOPER, R. A. (2001). Healing of an MRSA-colonised, hydroxyurea-induced leg ulcer with honey. *J Dermatol Treatment* 12, 33-36.
- NAVARRO, V. (1996). .Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *J. of Ethnopharmacology* 53, 143-147.
- NIR-PAZ, R., ELINAV, H., PIERARD, G. E., WALKER, D., MALY, A., SHAPIRO, M., BARTON, R. C. & POLACHECK, I. (2003). Deep infection by *Trichophyton rubrum* in an immunocompromised patient. *J Clin Microbial* 41, 5298-5301.
- NYCHAS, G. J., DILLON, V. M., BOARD, R. G. (1988). Glucose, the key substrate in the microbiological changes in meat and certain meat products. *Biotechnol appl biochem* 10, 203-231.
- NZEAKO, B. C., HAMDI, J. (2000). Antimicrobial potential of honey on some microbial isolates, *J Sci Res Med* 2, 75–79.
- PETRUS, K., SCHWARTZ, H., SONTAG, G. (2011). Analysis of flavonoids in honey by HPLC coupled with coulometric electrode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 400 (8), 2555-2563.

- PFALLER, M. A. & DIEKEMA, D. J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Reviews* 20, 133–163.
- RAMALHO, M., KLEINERT-GIOVANNINI A. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (1989). Utilization of floral resources by species of *Melipona* (Apidae:Meliponinae): floral preferences. *Apidologie* 20, 185-195.
- RAMALHO, M., KLEINERT-GIOVANNINI, A., IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (1990). Important bee plants for stingless bees (*Melipona* and *Trigonini*) and Africanized honeybees (*Apis mellifera*) in neotropical habitats: a review. *Apidologie* 21, 469-488.
- RAMALHO, M., GUIBU, L. S., GIANNINI, T. C., KLEINERT-GIOVANNINI, A. & IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. (1991). Characterization of some southern Brazilian honey and bee plants through pollen analysis. *J Apicultural Res* 30 (2), 81-86.
- RANSOME, H. M. (1986). *The sacred bee in ancient times and folklore*, Burrowbridge Somerset, England. 308 p.
- RASHID, T. & EBRINGER, A. (2007). Ankylosing Spondylitis is Linked to *Klebsiella*-The evidence. *Clin Rheumatol* 26, 858–864.
- ROBERTS, D. T. & EVANS, E. G. (1998). Subungual dermatophytom complicating dermatophyte onychomycosis. *Br J Dermatol* 138, 189-190.
- ROBSON, V. (2000). Personal communication. University Hospital Aintree, Liverpool, UK.
- RODRIGUES, R. R. (1996). Trilhas do parque da Esalq. Árvores medicinais. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, *Departamento de Botânica* 28 p.
- ROSENBACH, F. G. (1884). Mikro-Organismen bei den Wund-Infections - Krankheiten des Menschen. Wiesbaden *J F Bergmann's Verlag*.
- RYAN, K. J., RAY, C. G. (2004). Sherris Microbiologia Médica (4^a ed.). McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9. *Pré-teste, Cirurgia* p: 88.
- SABATIER, S., AMIOT, M. J., TACCHINI, M. & AUBERT, S. (1992). Identification of flavonoids in sunflower honey. *J Food Sci off. Publ. Inst. Food. Technol* Chicago The Institute 57, 773-774.
- SACKETT, W. G. (1919). Honey as a Carrier of Intestinal Diseases. *Bulletin of the Colorado State University Agricultural Experimental Station* N. 252.
- SATO, T. & MIYATA, G. (2000). The nutraceutical benefit, Part III: Honey. *Nutrition* 16, 468-469.

- SAWAYA, A. C. H. F., CUNHA, I. B. S., MARCUCCI, M. C., OLIVEIRA-RODRIGUES, R. F., EBERLIN, M. (2006). Brazilian propolis of *Tetragonisca angustula* and *Apis mellifera*. *Apidologie* 37, 398-407.
- SCHEPARTZ, A. I. & SUBERS, M. H. (1966). Catalase in honey. *J Apicultural Res* 5, 37-43.
- SCHMOURLO, G., MENDONÇA-FILHO, R. R., ALVIANO, C. S., COSTA, S. S. (2005). Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *J Ethnopharm* 96, 563-568.
- SCHRAMM, D. D., KARIM, M., SCHRADER, H. R., HOLT, R. R., CARDETTI, M., KEEN, C. L. (2003). Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. *J Agric Food chem* 51, 1732-1735.
- SEELEY, T. D. (1985). Honeybee ecology. Princeton, *Princeton Univ. Press*.
- SENAI/DN (1999). Elementos de apoio de para o sistema, APPCC “Série Qualidade e Segurança alimentar.” Brasília, Senai/DN: Projeto APPCC, Convenio CNI/Senai/Sebrae 317 p.
- SEPTIMIO, L. R. (1994). Fototerapia baseada em ervas medicinais do cerrado. SI-PE. *Ministério da Agricultura*, Brasília.
- SHADOMY, S. & SPINEL-INGROF, (1980). A. Susceptibility testing: with antifungal drugs. In: LENNETTE, E. (Ed.). *Manual of clinical microbiology*. 3.ed. Washington: *Am. Society for Microbiology* Cap. 62, 647-653.
- SHMUELI, A., SHUVAL, J. (2007). Are users of complementary and alternative medicine sicker than non-users. *Evid Based Complement Alternat Med* 4, 251-255.
- SHONA, E. B., JULIE, I., DEE A. C., SHOKOHI, T. (2006). Honey has an antifungal effect against *Candida* species. *Medical mycology* 44 (3), 289-291.
- SILVA, E. M. S., EVANGELISTA-RODRIGUES, A., FREITAS, B. M. (2002). Análises físico-químicas dos meis das abelhas melíferas (*Apis mellifera*) e urucu (*Melipona scutellaris*) In: *XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA*, Campo Grande-MS. Anais Campo Grande. p: 61.
- SIMAL, J., HUIDOBRO, J. (1984). Parâmetros de qualidade de la miel III. Acidez (pH, libre, lactónica & total) e índice de formol. *Offarm* 3 (9), p: 532.
- SIMON, A., SOFKA, K., WISZNIEWSKY, G. (2007). Wound care with antibacterial honey (Medihoney) in pediatric hematology-oncology. *Support Care Cancer* 14, 91-97.
- Simon, A., Traynor, K., Santos, K., Blaser, G., Bode, U. & Molan, P. (2007). Medical Honey for Wound Care – Still the “Latest Resort” *eCAM*. 1-9.
- SMITH, K. J., WELSH, M. & SKELTON, H. (2001). *Trichophyton rubrum* showing deep dermal invasion directly from the epidermis in immunosuppressed patients. *Br J Dermatol* 145, 344-348.

SNOWDON, J. A., CLIVER, D. O. (1996). Review article, Microorganisms in honey. *Int J of Food Microbiol* 31, 1–26.

SODRÉ, G. S. (2000). Características físico-químicas e análises polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera:Apidae) da região do litoral norte do Estado da Bahia. Piracicaba-SP, Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. 83 p.

SOMMEIJER, M. J., BEETSMA, J., BOOT, W. J., ROBERTS, E. J., DE VRIES, R. (1995). Perspectives for Honey Production in the Tropics, Proc. Symp. organized by the Netherlands Expertise Centre for Tropical Apicultural Res (NECTAR), Utrecht, Netherlands.

SOUSA, P. H. M., SOUSA, N. M. A., MAIA, G. A. (2003). Componentes funcionais nos alimentos. *Bol. Soc Bras Cienc Tecnol Alim* 37 (2), 127-135.

STANDIFER, L. N. (1967). Honey-bee nutrition. Beekeeping in the United States. U.S. Dept. Agr. *Handbook* 335, 147 p.

STEWART, J. (2002). Therapeutic honey used to reduce pain and bleeding associated with dressing changes. 4th *Australian Wound Management Association Conference*, Adelaide, Australia.

STINSON, E. E., SUBES, M. H., PETTY, J., WHITE, J. W., (1960). The composition of honey. V. Separation and identification of the organic acids. *Arch. Biochem Biophys* 89, 6-12.

STONOGA, V. I., FREITAS, R. J. S. D. (1991). Conteúdo de água e açúcares em mel de abelhas. *Bd. Ceppa Curitiba*. 9, 9-16.

SUBRAHMANYAM, (1991). M. Topical application of honey in treatment of burns. *Br J Surg* 78, 497-498.

SUGUNA, L., CHANDRAKASAN, G., THOMAZ JOSEPH, K. (1992). Influence of honey on collagen metabolism during wound healing in rats. *J Clin Biochem Nutrition* 13, 4-12.

TAN, S. T., HOLLAND, P. T., WILKINS, A. L. & MOLAN, P. C. (1988). Extractives from New Zealand Honeys. 1. White clover, manuka and kanuka unifloral honeys. *J. Agric Food Chem* 36, 453-460.

TAORMINA, P. J., NIEMIRA, B. A., BEUCHAT, L. R. (2001). Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. *J Food Microbiol* 69 (3), 217– 225.

TAURA, H. M. & LAROCA, S. (1991). Abelhas altamente sociais (Apidae) de uma área restrita em Curitiba (Brasil): distribuição dos ninhos e abundância relativa. *Acta Biologica Paranaense*, Curitiba, 20, 85-101.

- TONKS, A. J., COOPER, R. A., JONES, K. P., BLAIR, S., PARTON, J., TONKS, A. (2003). Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. *Cytokine* 21, 242-247.
- TONKS, A. A. (2007). 5.8kDa component of manuka honey stimulates immune cells via TLR4. *J Leukocyte Biology* 82.
- VASCOCELOS, L. C. S., SAMPAIO, M. C. C., SAMPAIO, F. C., HIGINO, J. S. (2003). Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. *Mycoses* 46, 192-196.
- VERISSIMO, M. T. L. (1987). Porque o mel cristaliza. *Apicultura no Brasil* 18 (3), p: 14.
- VIDAL, A. (2003) .Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. *J Eh nopharmacology* 89, (2-3), 295-300.
- VIT OLIVIER, P., RIOS DE SELGRAD, A. M., NOVOA, M. L., REINOSA-FULLER, J., CAMARGO, J. (1994). Antibacterial activity and mineral content of Venezuelan stingless bee honeys, Proc. Vth Int. Conf. on apiculture in tropical climates IBRA 254–258.
- VIT P., TOMÁS-BARBERÁN F.A. (1998a). Flavonoids in Meliponinae honeys from Venezuela related to their botanical, geographical, and entomological origin to assess their putative anticataract activity. *Z Lebensm Unters-Forsch* 206, 288–293.
- VON DER OHER, W., DUSTMANN, J. H. & VON DER OHE, K. (1991). Prolin als Kriterium der reif des honigs. *Dtsch. Lebensm. Rdsch* 87, 383-386.
- WAHDAN, H. (1998). Causes of the antimicrobial activity of honey. *Infection* 26, p: 26.
- WESTON, R. J., MITCHELL, K. R., ALLEN, K. L. (1999). Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. *J Food Chem* 64, 295– 301.
- WESTON, R. J., BROCKLEBANK, K. L., LU, Y. (2000). Identification and quantitative levels of antibacterial componentes of some New Zealand honeys. *J Food Chem* 70, 427-435.
- WHITE, J. W. & SUBERS, M. H. & SHEPARTZ, A. I. (1963). The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hudrogen peroxide and its origin in a honey glucose oxidase system. *Biochimica et Biophysica Acta* 73, 57-70.
- WHITE, J. W., SUBERS, M. H., SHEPARTZ, A. (1962). The Identification of Inhibine. *J Am Bee* 102, 430-431.
- WHITE, J. W. & SUBERS, M. H. (1963). Studies on Honey Inhibine. A Chemical Assay. *J Apicultural Res* 2, 93-100.

- WHITE, J. W. & KUSHINIR, I. (1967). The enzymes of honey: examination by ion-exchange chromatography, gel filtration, and starch-gel electrophoresis. *J Apicultural Res* 6 (2), 69-89.
- WHITE, J. W. (1967). Honey, its composition and properties. Beekeeping in the United States. U.S. Dept. Agr. *Handbook* 335, 147 p.
- WHITE, J. W. (1975). Physical characteristics of honey. In: CRANE, E. *Honey a comprehensive survey*. London: Heinemann, Cap.6, 207-239,
- WHITE, J. W. & RUDYJ, O. N. (1978). The protein conten in honey. *J Apicultural Res* 1784, 234-238.
- WHITE, T. C., OLIVER, B. G., GRASER, Y. & HENN, M. R. (2008). Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. *Eukaryot Cell* 7, 1238-1245.
- WIESE, H. (1985). Ed. *Nova apicultura*. 6.ed. Porto Alegre, Agropecuária 491 p.
- WILKINS, A. L., LU, Y. & MOLAN, P. C. (1983). Extractable organic substances from New Zealand unifloral manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *J Apicultural Res* 32 (1), 3-9.
- WILKINSON, J. M., CAVANAGH, H. M. (2005). Antibacterial activity of 13 honeys against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J of Medicinal Food* 8 (1), 100-103.
- WILMS, W., WENDEL L., ZILLIKENS, A., BLOCHTEIN, B., & ENGELS, W., (1997). Bees and other insects recorded on flowering trees in a subtropical Araucaria Forest in southern Brazil. *Stud on Neotrop Fauna & Environm* 32, 220-226.
- WOOTTON, M., EDWARDS, R. A. & FARAJI-HAREMI, R. (1976). Effect of accelerated storage conditions on the chemical compostion and properties of australian honeys. 2. Changes in sugar and free amino acid contents. *J Apicultural Res* 15 (1), 29-34.
- YANIV. Z., RUDICH, M. (1996). *Bee Products* Plenum Press, New York. 232 p.

**Antimicrobial potential of honey produced by native Brazilian stingless bees
against some pathogenic microorganisms**

Bazoni Matheus de oliveira ^{1*}, De Jong David¹, Campioni Fabio ², Falcão Juliana
Pfrimer, ² Rossi Nilce M. Martinez¹

¹Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, Depto. de Genética, CEP 14040-901
Ribeirão Preto, SP, Brazil phone: 55 (16) 36024578, e-mails: bazonibee@usp.br,
ddjong@fmrp.usp.br, nmmrossi@fmrp.usp.br

²Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Depto. de Análises
Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, CEP 14040-901 Ribeirão Preto, SP, Brazil e-
mails: fabiocampioni@yahoo.com, jufalcão@fcfrp.usp.br

ABSTRACT Honey bee honey has long been used in popular medicine, especially for treating wounds and burns. Stingless bee honeys are widely used for similar purposes locally in Brazil and other tropical regions; however, there has been little objective research comparing their antimicrobial properties with those of honey bee honey. We assess the presence and variation of tested the antimicrobial activity of honey of 12 species of native stingless bees commonly found in Brazil, against five species of bacteria and two fungal species, comparing this activity with that of therapeutic manuka honey, produced by honey bees in New Zealand from the nectar of *Leptospermum scoparium* (Myrtaceae). Pathogens exhibited different sensitivities towards the honey samples. Ten of the 12 stingless bee honey samples inhibited bacteria tested and sete inhibited the fungal pathogeni *Trichophyton rubrum*. Only *Candida albicans* showed resistance to all honey samples. The honeys obtained from *Nannotrigona testaceicornis*, *Tetragona clavipes* and *Scaptotrigona depilis* exibited high antimicrobial activity, showing a significant difference when compared with the manuka honey ($P<0.05$), proving to be more effective particularly against *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *T. rubrum*.

Key words: Stingless bees / activity antimicrobial / honey / manuka / Brazil

1. Introduction

The honey produced by bees is a nutritious food that has different therapeutic properties, among them the ability to stimulate wound healing and inhibit growth of microorganisms (Cooper 1999). In Brazil, besides the exotic *Apis mellifera*, native bees are also found, which are known by the Indians and local communities as producers of medicinal honey (Cortopassi-Laurino & Gelli, 1991). These bees, belong to the subfamily Meliponinae (Hymenoptera, Apidae), popularly known as "indigenous stingless honey bees. The rational creation of stingless honey bees, the Meliponiculture has gone through a new cycle of appreciation and rediscovery of this activity has prompted to the development of a large number of studies into the knowledge of the biology and behavior, as well as those aimed at characterization of the products of the colonies in relation to their nutritional and pharmacological constituents. In some regions where meliponiculture is successful, such as the Yucatan Peninsula, Mexico, indigenous people believe that honey from stingless honey bees has more powerful medicinal effects than honey from *Apis mellifera*. However there have, been few reports on the antimicrobial activity of honey from stingless bees (DeMera & Angert, 2004), despite a substantial literature for *Apis mellifera* (Molan, 2006).

Honey is produced by bees from the nectar collected from flowers and/or saccharin exudate living parts of plants (Mendes & Coelho, 1983), its coloration, viscosity and medicinal properties are directly related to the source of nectar that originated and also to the species of bee that produced it (Allen et al., 1991). Honeybees concentrate the sugar solution collected from plants by evaporation, and add enzymes that "mature" honey in the combs causing changes in their composition, preventing microbial growth in the stored food (Molan 2006). The

same properties that were developed by the bees to preserve this food resource against microorganisms, work on medical applications of honey.

The increase in consumer use of complementary medicines has prompted an increasing interest in their use in medical treatments. One treatment that has received much interest is honey. It has been used as a medicine since ancient times in many cultures (Dunford et al. 2000) for various therapeutic purposes, including treatment of infected wounds (Mullai & Menon, 2005), and over the past decades several research groups have focused their attention on this product (Moore et al., 2001). Honey works differently from antibiotics, which attack the bacterial cell wall and inhibit intracellular metabolic pathways, being hygroscopic, honey reduces the environment humidity, dehydrating the bacteria (Molan, 2004) and promoting healing of wounds. Its high viscosity helps to provide a protective barrier preventing infection, in addition the mild acidity and low-level of hydrogen peroxide release assist both tissue repair and contribute to the antimicrobial activity of honey. This antibacterial activity is a major factor in promoting wound healing where infection is present (Lusby et al., 2005).

The development of many organisms associated with disease and infection is inhibited by honey (Molan, 1992). There are already honeys in the world market that have exceptional medicinal properties and great market value as manuka (*Leptospermum scoparium*, Family Myrtaceae), (Allen et al., 1991). Studies in manuka honey have suggested that these honeys have specific antibacterial activity due to a non-hydrogen peroxide mechanism (Weston et al., 2000) the so-called unique manuka factor (UMF). The therapeutic effects of honey have been rediscovered, including its effect on organisms that are highly resistant to antibiotics (Molan, 2000). Much “folklore” has been attached to the putative medicinal effects

of honey (Crane, 1990) and studies have been conducted to confirm these effects for honey produced by *A. mellifera* (Bogdanov, 1997). However, few researchers have investigated the same for stingless bee honey (Vit et al., 1994, Sommeijer et al., 1995). The purpose of this study was to evaluate the presence and variation of the antimicrobial activity of honey samples of stingless bees commonly found in Brazil, comparing them with the manuka honey (UMF 18 +), but also to test the resistance of bacterial strains against the antibiotics available on the market.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Origins of honey

The samples were collected between September and October 2010 from hives kept in Ribeirão Preto SP and Uberlândia, MG, Brazil. The samples were collected directly from pots kept within nests using sterile syringes, the species are: *Melipona quadrifasciata*, *Melipona subnitida*, *Melipona rufiventris*, *Melipona scutellaris*, *Melipona bicolor*, *Tetragona clavipes*, *Scaptotrigona depilis*, *Nannotrigona testaceicornis*, *Frieseomellita varia*, *Plebeia remote*, *Plebeia droryana* and *Tetragonisca angustula* (I) the region of Ribeirão Preto - SP and a hive of *Tetragonisca angustula* (II) the region of Uberlândia, all samples were stored in the dark in order to protect light-sensitive compounds. Manuka honey (*Leptospermum scoparium*) of New Zealand, UMF 18 + honey commercially known as therapeutic antimicrobial high activity, was used to compare the rate of antimicrobial activity, and artificial honey [80% (w/v) sugar], which served as a negative control test was prepared by dissolving 40g of fructose, 30g of glucose, 8g of maltose and 2g of sucrose in 100 mL of water (Khosravi et al., 2008).

2.2. Strains and preparation of inocula

Five bacteria *Escherichia coli* (G-, ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (G-, ATCC 10031), *Pseudomonas aeruginosa* (G-, ATCC 27853), *Staphyococcus aureus* MRSA (G +, ATCC 25923, *Staphyococcus aureus* coagulase negative (G +, ATCC 43300), the fungi *Trichophyton rubrum* (CBS118892) and the yeast *Candida albicans* (ATCC 64548) were used to test the antimicrobial activity of honey samples. the bacteria were grown according to the rules of procedures of the CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) where after growth in BHI (Oxoid), were seeded in tubes with Müeller-Hinton agar (Himedia) and incubated at 37°C for 24 hours. After that, a suspension of the strains in saline 0.9% was done to obtain a turbidity standard equivalent to 0.5 McFarland scale except for *C. albicans*, that was 1.0 standard, with a swab, were distributed in plates 20 x 150mm containing of about 40 mL the Müeller-Hinton agar with a thickness of about 4mm (Shadomy & Spnel-Ingrof, 1980). *T. rubrum* was cultivated in Sabouraud Dextrose agar (Difco) for 10 to 15 days in petri dishes, after this period of time, it was removed from the surface of the medium with saline solution 0.9%, with the aid of a sterile spatula. The solution was stirred by vortex to break up the conidia, filtered in glass wool and centrifuged at 6000 xg for 10 minutes. Then the conidia was resuspended in saline and the concentration of 2.0×10^6 conidia/mL was estimated in a Neubauer chamber. 100 µL of this suspension were inoculated in plates containing Sabouraud medium.

2.3. Antibigram

In order to check the resistance of bacterial strains against the antibiotics commercial, it was used 6 mm in diameter (Cefar) paper discs impregnated with the following antibiotics in the respective concentrations: 10 mcg ampicillin (AMP),

cephalothin 30 mcg (CFL), ciprofloxacin 5 mcg (CIP), erythromycin 15 mcg (ERI), 10 mcg penicillin (PEN), 10 mcg gentamicin (GEN), 30 mcg cefepime (CPM), 30 mcg ceftriaxone (CRO), 30 mcg amikacin (AMI), aztreonam 30 mcg (ATM), 30 mcg ceftazidime (CAZ), 10 mcg oxacillin (OXA), 2 mcg clindamycin (CLI), 10 mcg tobramycin (TOB), 30 mcg doxycycline (DOX), piperacillin + tazobactam 110 mcg (PPT), cefazolin 30 mcg (CFZ), 15 mcg clarithromycin (CLA), 10 mcg ampicillin + sulbactam (SBA), 15 mcg azithromycin (AZI), amoxicillin + clavulanic acid 30 mcg (AMC), being tested against *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* MRSA and *S. aureus* coagulase negative. The discs with antibiotics were distributed and gently pressed on the agar.

2.4. Inhibition test and quantification of antimicrobial activity

The agar well diffusion method (Sommeijer et al., 1995) was employed to assess the presence and variation of the antimicrobial activity of honeys of different collected species. For this, after sowing and drying the inocula, wells were made by removing the agar, with plastic straws with about 4 mm in diameter equidistant from each other, each receiving 0.05 ml of each sample of undiluted honey. The tests were done in triplicate and the plates were incubated at 28°C for *T. rubrum*, for 5 days and 37°C for 24 hours for the other microorganisms.

Quantification of antimicrobial activity was determined by measuring the diameter of clear zones of microbial growth around the wells in the agar (including the well). The measurements were compared with manuka honey and the artificial honey (syrup), used as negative control. Data were analyzed by analysis of variance of a single factor ANOVA and then by T test for multiple comparisons between means. A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

3. RESULTS

The results indicate a clear antimicrobial activity and a significant difference in the susceptibility of microorganisms compared to honey from stingless bees (Fig. 1), showing that ten of the 12 stingless bee honey samples had inhibitory effects on *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* MRSA, *S. aureus* coagulase negative, and 7 inhibited the growth of the fungi *T. rubrum*, only the yeast *C. albicans* was not inhibited by any of the honeys tested. The concentrated sugar solution containing similar sugars found in honey did not inhibit any of the microorganisms, the same was observed with the honey of *Melipona rufiventris* and *Melipona subnitida*. Some samples showed a more effective antimicrobial activity when compared with the therapeutic manuka honey. For *E. coli* honey *N. testaceicornis* had greater inhibitory effect (MD 5.00 – $P < 0.001$) followed by honey *P. remota* (MD 2.917 – $P < 0.01$). Honeys *M. scutellaris* and *M. Quadrifasciata* had lower activity (MD -2.833, -2.917 $P < 0.01$) when compared with manuka honey. To *K. pneumoniae* honey of *N. testaceicornis* and *T. clavipes* had a significant difference (MD 3.667 – $P < 0.001$), respectively, however honeys *T. angustula* and *P. remote* did not differ significantly from honeys *N. testaceicornis* and *T. clavipes* ($P < 0.05$). For *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300, *P. aeruginosa*, showed that the honeys had higher antibacterial activity equivalent to manuka honey, not significantly different ($P < 0.05$). The honeys *T. clavipes* and *S. depilis* had greater antifungal activity against *T. rubrum*, with a significant difference (13.5 and 10.17 MD – $P < 0.001$) respectively. The honey samples of *T. angustula* SP and *T. angustula*II MG differed among themselves as to the antimicrobial activity when tested against *K. pneumoniae* (MD 4667 – $P < 0.001$) and *T. rubrum* (MD 8917 – $P < 0.001$).

This study has shown important data, such as the finding of high antimicrobial activity of honey obtained from stingless bees against fungi (*T. rubrum*), Gram-negative bacteria (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*), in the antibiogram tests with commercial antibiotics showed resistance respectively to (AMC, CFZ, CFL) (COM, CRO, ATM, CAZ) and (AMP) and also verified the sensitivity of Gram-positive *S. aureus* MRSA and *S. aureus* coagulase-negative were resistant respectively to (ATM, CAZ) and (ERI, PPT, TOB, AMP, CLI, CIP, AZI, CRO, AMC, ATM, CLA, CAZ), (Table I).

4. DISCUSSION

The antibacterial properties of honey produced by *A. mellifera* have been widely confirmed in several scientific papers (Allen et al. 1991; Cortopassi-Laurino & Gelly, 1991), as well as its fungicidal action (Efem et al., 1992), healing (Gupta et al., 1993) and promotes epithelization of the wound edges (Efem, 1988). This study demonstrated that both honeys of stingless bees "*in nature*" and manuka has some antimicrobial activity against microorganisms. Only *C. albicans* resistant to the honeys. This result was also observed by Lusby et al., 2005. In contrast with this study, Nzeako & Hamdi (2000) found that six honey samples used in their studies, inhibited *C. albicans* with a smaller inhibition zone when compared with other microorganisms. Although this data are consistent with other reports showing that the manuka honey has good antibacterial activity (Shona, 2006). In addition, we also demonstrate that honey from stingless bees has activity equivalent to some microorganisms and higher than the manuka honey for others.

The different degrees of inhibition demonstrated in our study, and those of other researchers (Mercan et al., 2007) is probably due to factors present in the different

species of plants from which the honey is collected (Du Toit et al., 1995). In addition, differences in antimicrobial activity among honeys from various sources may, in part, be a reflection of the two compound quantities including catalase and hydrogen peroxide, whose quantity contained in the honey is dependent on both glucose oxidase, added by bees to honey, and catalase, it originated from flower pollen, destroying hydrogen peroxide, and non-peroxide factors such as lysozyme, phenolic acids, and flavonoids in honey (Weston et al., 2000). Allen et al. (1991) in their study tested the antibacterial activity of 26 honey samples from different floral sources against *Staphylococcus aureus*, and observed that the difference between floral sources in the antibacterial activity was highly significant. When the antibacterial activity was assayed by (Allen et al., 1991), with catalase added to remove hydrogen peroxide in honey monofloral, most of the honeys showed no detectable antibacterial activity. Only some manuka honeys showed this type of activity in many cases due entirely to a specific mechanism non-hydrogen peroxide (Allen et al., 1991; Weston, 2000). According to Shona (2006), one the factors involved in antimicrobial activity of honey is a high sugar content. Honey contains only 15-21% water, and most of the solids are sugars, resulting in a low water activity, with a typical value range from 0.56 to 0.62 (w/a). This is a low level for many species of microorganisms that require a water activity between 0.94 and 0.99 (w/a) to develop (Molan, 1992). The use of a concentrated solution of sugar as a wound dressing would also produces an adverse environment for pathogens microorganism (Shona, 2006). However, in our study, the concentrated sugar solution (80%), used in the tests had no inhibitory effect against any of the microorganisms, so the observed result was not attributed to the osmotic effect, since the honey produced by stingless bee species differs in some physical and

chemical parameters compared to honey produced by *A. mellifera*, particularly with respect to its moisture, which is quite high, making it less dense (Vit et al., 1994). According to Molan, (1992), the osmotic effect, the low pH and the accumulation of certain ions, found by White (1975) and Pamplona (1994) contribute to the antimicrobial activity of honey. Hiromi & Kazuhiro (2008) tested the antimicrobial activity of honey from 18 species of stingless bee against *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* and *Staphyococcus*. The results showed that activity seems to be strain-specific and not species-specific. In this study we observed that the two strains of *S. aureus* showed different levels of sensitivity in the presence the of samples, these results corroborate the results shown by Hiromi & Kazuhiro (2008), the microorganism most sensitive to the honey samples was *T. rubrum*. Other researchers also found differences in the susceptibility of microorganisms against antimicrobial activity of honey (Ceyhan & Ugarte, 2001; Taormina et al., 2001). The method of agar diffusion (Sommeijer et al., 1995) is considered of low sensitivity (James et al., 1972), as the test substance is diluted as it diffuses into the agar. However, it is considered the most appropriate test for topical antibiotics, because it evaluates diffusivity (Allen et al., 1991). This is important for the evaluation of honey, since it is considered a topical agent when it is used for the treatment of surgical and wound infections, and for burns (Efem et al., 1992).

The results encourage future studies to investigate the possible benefit of using the honey of stingless bees in the midst of treatment therapies. Although there are still questions to be answered accurately about the mode of action, choosing the best type of honey to be used in addition to clinical investigations with honey. However the present study demonstrated the antimicrobial potential of honey from stingless bees "*in vitro*" being able to inhibit Gram-negative and gram-positive as well as *T.*

rubrum, these properties of honey make a good medicine to be applied to infected wounds due to their various agents. Promoting a potential benefit for increased therapeutic use of honey for patients and for society as a whole.

Table I: Susceptibility testing of antibiotics against bacterial strains commonly used commercial.

Microorganism	Resistant	Sensitive *
<i>Escherichia coli</i>	AMC, CFZ, CFL	PPT, TOB, AMP, CPM, GEN, CIP, CRO, ATM, CAZ, DOX
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CPM, CRO, ATM, CAZ	PPT, TOB, GEN, CIP
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP	DOX, PPT, TOB, CPM, CRO, AMC, ATM, CFZ, CFL, CAZ
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	ATM, CAZ	ERI, DOX, PPT, OXA, TOB, PEN, AMP, CLI, CPM, GEN, CIP, AZI, CRO, AMC, CFZ, CLA
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300	ERI, PPT, TOB, AMP, CLI, CIP, AZI, CRO, AMC, ATM, CLA, CAZ	DOX, OXA, CPM, CFZ

ampicilina (AMP), cefalotina (CFL), profloxacina (CIP), eritromicina (ERI), penicilina (PEN), gentamicina (GEN), cefepime (CPM), ceftriaxona (CRO), ampicacina (AMI), aztreonam (ATM), ceftazidima (CAZ), oxacilina (OXA), clindamicina (CLI), tobramicina (TOB), doxiciclina (DOX), piperacilina + tazobactam (PPT), cefazolina (CFZ), claritromicina (CLA), sulbactam + ampicilina (SBA), azitromicina (AZI), ácido clavulânico + amoxicilina (AMC). Resistant = no inhibition zone development; Sensitive = extent of inhibition zone in mm, including the disc itself. “*” Measures standards in mm of inhibition zones of antibiotics commercial (CLSI, 2010), to *E. coli* and *K. pneumoniae*: AMP (17), TOB (15), CPM (18), CAZ, PPT, ATM e CIP (21), GEN (15), CRO (23), DOX (14); *P. aeruginosa*: PPT (18), TOB e GEN (15), CIP (21); *S. aureus*: AMP e PEN (29), OXA (13), PPT, CPM, AZI, CLA e CFZ (18), DOX (16), ERI (23), TOB e GEN (15), CLI, CIP e CRO (21), AMC (20).

Figure 1. Inhibition of microbial growth by the honey. The graphs show the score of inhibition of each sample of honey against six microorganisms tested in this study, except for *C. albicans*. The data are presented as mean $\pm$ SD score of inhibition between 0 and 35 with 35 being the highest inhibitory effect, therefore the larger zona of inhibition and zero growth equivalent to controls.

Ta1 – *Tetragonisca angustula* (SP); Ta2 – *Tetragonisca angustula* (MG); Pr – *Plebeia remota*; Pd – *Plebeia droryana*; Nt – *Nannotrigona testaceicornis*; Tc – *Tetragona clavipes*; Msc – *Melipona scutellaris*; Mq – *Melipona quadrifasciata*; Fv – *Friesomellita varia*; Mb – *Melipona bicolor* – *Melipona rufiventris*; Ms – *Melipona subnitida*; Sd – *Scaptotrigona depilis*; Mka – Manuka; Cn – Negative control = 80% sugar syrup.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Sidney Matheus technical department of Ecology and the Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo (FFCLRP-USP) for providing honey samples. Financial support for scholarships and research expenses was provided by CAPES, CNPq and FAPESP.

REFERENCES

- Allen K.L., Molan P.C., Reid G.M. (1991). A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 43, 817-822.
- Bogdanov S. (1997). Nature and origin of the antibacterial substances in Honey, *Lebensm. Wiss. Technol.* 30, 748–753.
- Ceyhan N., Ugar A. (2001). Investigation of in vitro antimicrobial of honey, *Rivista Di Biologia-Biology Forum* 94, 363-372.
- Cooper R.A., Molan P.C., Harding K.G. (1999). Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds, *J. R. Soc. Med.* 92, 283–285.
- Cortopassi-Laurino M. & Gelli D.S. (1991). Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action antibactérienne des miels d'abeilles africanisées *Apis mellifera* et de Méliponinés du Brésil, *Apidologie* 22, 61-73.
- Crane E. (1990). Bees and beekeeping: science, practice and world resources, Comstock Publishing, Ithaca, 640 p.
- Demera J.H., Angert E.R. (2004). Comparison of the antimicrobial activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* from different phytogeographic regions of Cost Rica, *Apidologie* 35 (4), 411-417.
- Dunford C., Cooper R., Molan P., White R. (2000). The use of honey in wound management, *Nurs. Stand.* 15, 63–68.
- Efem S.E.E. (1988). Clinical observations on the wound healing properties of honey. *British Journal Surgery*.75, 679-681.
- Efem S.E.E., Udoh K.T., Iwara, C.I. (1992). The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance, *Infection* 20, 227-229.

- Gupta S.K., Sinch H., Varshney A.C., Prakash P., Singh S.P. (1993.). Biochemical alterations during wound healing under influence of natural honey and ampicillin in buffaloes, *Indian Veterinary Journal* 70, 45-47.
- Hiromi Kimoto-Nira, Kazuhiro Amano (2008). Antimicrobial activity of honey produced by stingless honey bees, *Journal of Apicultural Research* 47, 325-328.
- James O.B.O.L., Egroe S.W., Entura V.A.K. (1972). Some antibacterial properties of Jamaican honey, *West Indian Medical Journal* 21, 7-17.
- Khosravi A.R. Hojjatollah S., Farzad K., Tahereh Z., Mohammad F. (2008). Fungicidal potential of different Iranian honeys against some pathogenic *Candida* species, 47 (4), 256-260.
- Lusby P., Coombes A.L., Wilkinson J.M. (2005). Bactericidal activity of different honeys against pathogenic bacteria, *Arch. Med. Res.* 36, 464–467.
- Mendes B.A. & Coelho E.M. (1983). Considerações sobre características de mel de abelhas – Análises e critérios de inspeção, *Informe Agropecuário* 9, n.106, 56-67.
- Mercan N., Guvensen A., Celik A., Katircioglu H. (2007). Antimicrobial activity and pollen composition of honey samples collected from different provinces in Turkey. *Natural Products Research.* 3, 187-195.
- Molan P.C. (1992). The antibacterial activity of honey. The nature of the antibacterial activity, *Bee World* 73 (1), 5-28.
- Molan P.C. (1997a). The antibacterial activity of honey. 1. The nature of the antibacterial activity, *Bee World* 73, 5–28.
- Molan P. (2000). Using honey dressing: the practical consideration, *Nursing Times* 96, 36-37.
- Molan P.C., Betts J.A. (2004). Clinical usage of honey as a wound dressing: an update. *Journal Wound Care* 13, 353-356.
- Molan P.C. (2006). The evidence supporting the use of honey as a wound dressing, *Int. J. Low Extrem Wounds* 5, 40-54.
- Moore O.A., Smith L.A., Campbell F., Seers K., McQuay H.J., Moore R.A. (2001). Systematic review of the use of honey as wound dressing, *BMC Complementary and Alternative Medicine* <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/1/2>.
- Mullai V., Menon T. (2005). Bactericidal activity of different types of honey against clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian Journal of Pharmacology* 37, 403 p.
- Nzeako B.C., Hamdi J. (2000). Antimicrobial potential of honey on some microbial

- isolates, J. Sci. Res. Med. 2, 75–79.
- Pamplona B. (1994). Comparación entre el miel de melipona y de *Apis mellifera*, In: Congresso Iberoamericano De Apicultura, 4 Foro Expocomercial Internacional De Apicultura, Provincia de Cordoba, Anales, Rio Cuarto 197-200.
- Shadomy S. and Spinel-Ingroff (1980). A. Susceptibility testing: with antifungal drugs. In: Lennette E. (Ed.), Manual of clinical microbiology. Society for Microbiology, Washington, American, 62, 647-653.
- Shona E. B., Julie I., Dee A.C., Shokohi T. (2006). Honey has an antifungal effect against *Candida* species, 44 (3), 289-291.
- Sommeijer M.J., Beetsma J., Boot W.J., Roberts E.J., de Vries R. (1995). Perspectives for Honey Production in the Tropics, Proc. Symp. organized by the Netherlands Expertise Centre for Tropical Apicultural Research (NECTAR), Utrecht, Netherlands, Dec. 18.
- Taormina P.J., Niemira B.A., Beuchat L.R. (2001). Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power, Int. J. Food Microbiol. 69 (3), 217– 225.
- Vit Olivier P., Rios de Selgrad A.M., Novoa M.L., Reinos Fuller J., Camargo J. (1994). Antibacterial activity and mineral content of Venezuelan stingless bee honeys, Proc. Vth Int. Conf. on apiculture in tropical climates IBRA, pp. 254–258.
- Weston R.J., Brocklebank K.L., Lu Y. (2000). Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys, Food Chemistry 70, 427-435.
- White J.W. (1975). Physical characteristics of honey. In: Crane E. (Ed.) Honey a comprehensive survey, London, Heinemann, 6, 207-39.