

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

SENSIBILIDADE *IN-VITRO* DE *ESCHERICHIA COLI* E
STAPHYLOCOCCUS AUREUS AO MEL DE *MELIPONA* SP.
PRODUZIDO ARTESANALMENTE NO MUNICÍPIO DE PARINTINS-
AM.

Bolsista: Cristiane Cunha Guimarães

PARINTINS
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL
PIB-B/0108/2012
SENSIBILIDADE *IN-VITRO* DE *ESCHERICHIA COLI* E
STAPHYLOCOCCUS AUREUS AO MEL DE *MELIPONA* SP.
PRODUZIDO ARTESANALMENTE NO MUNICÍPIO DE PARINTINS-
AM.

Bolsista: Cristiane Cunha Guimarães.
Orientador: Prof^o Msc. Elton Augusto Lemkuhl.

PARINTINS
2014

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Grupo de Pesquisa Água-Solo-Planta-Animal Aliado a Sustentabilidade da Amazônia e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo Grupo de Pesquisa Água-Solo-Planta-Animal Aliado a Sustentabilidade da Amazônia.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo analisar o potencial inibidor do mel de *Melipona sp.* de criações artesanais, contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* visto que o mel não é totalmente conhecido em suas propriedades físico-químicas, mas possui várias propriedades benéficas à saúde e é caracterizado como um suplemento alimentar. O uso caseiro se deve as suas propriedades farmacológicas, cicatrizantes, antioxidantes e atividade antimicrobiana, sendo utilizado na medicina popular dos povos mais antigos da América central, incluindo a Amazônia. O experimento foi desenvolvido no laboratório de Microbiologia, Histologia e Fisiologia, situado no campus do Instituto de Ciências Sociais, Educação e Zootecnia (ICSEZ) localizado em Parintins-Am. Foram coletadas onze amostras de mel diretamente das colméias em diferentes meliponários nas zonas rural do município de Barreirinha e urbana do município de Parintins. Para a avaliação da atividade antimicrobiana do mel foi empregado o método da difusão em ágar Müeller-Hinton, utilizando-se de discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro, na presença das bactérias *Escherichia coli*, e *Staphylococcus aureus* sendo este realizado em triplicata para cada bactéria em cada amostra. A análise estatística consistiu de uma análise descritiva do potencial inibidor do mel através de um gráfico de porcentagem e a comparação das médias das triplicatas em cada bactéria foi submetida ao teste de Tukey a 5% de significância. Verificou-se a formação de halos de inibição nos dois microrganismos utilizados, evidenciando o potencial de inibição de crescimento bacteriano do mel de *Melipona sp.*, tendo maiores resultados de inibição frente à bactéria *S. aureus* com halos de inibição de 18,0mm enquanto que na bactéria *E. coli* foi de 15, 3mm. Os resultados obtidos nesta pesquisa mantiveram informações de que o mel de *mellipona sp.* possui propriedades que inibem o crescimento bacteriano, nas bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

Palavras chave: mel; inibição bacteriana; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*.

ABSTRAC

This work had as objective analyzes the inhibiting potential of the honey of *Melipona sp.* of craft creations, against the bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* that the honey is not totally known in their physiochemical properties, but it possesses several beneficial properties to the health and it is characterized as an alimentary supplement. The home-made use is due their pharmacological properties, cicatrizants, antioxidants and activity antimicrobiana, being used in the popular medicine of the oldest people of central America, including the Amazonian. The experiment was developed in the laboratory of Microbiology, Histologia and Physiology, located in the campus of the Institute of Social sciences, Education and Zootecnia (ICSEZ) located in Parintins-Am. Eleven honey samples were collected directly of the beehives in different meliponários in the areas rural of the municipal of Barreirinha and urban of the municipal district of Parintins. For the evaluation of the activity antimicrobiana of the honey the method of the diffusion was used in ágar Müeller-Hinton, being used of disks of paper filter of 6 diameter mm, in the presence of the bacteria *Escherichia coli*,e *Staphylococcus aureus* being this accomplished in triplicata for each bacterium in each sample. The statistical analysis consisted of a descriptive analysis of the inhibiting potential of the honey through a percentage graph and the comparison of the averages of the triplicatas of each bacterium was submitted to the test of Tukey to 5% of significância. The formation of inhibition halos was verified in the two used microorganisms, evidencing the potential of inhibition of bacterial growth of the honey of *Mellipona sp.*, tends larger results of inhibition front to the bacterium *S. aureus* with halos of inhibition of 18,0mm while in the bacterium *E. coli* it was of 15, 3mm. The results obtained in this research maintained information that the honey of *mellipona sp.* he/she possesses properties that inhibit the bacterial growth, in the bacteria *E. coli* and *S. aureus*.

Words key: honey; bacterial inhibition; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	9
2.1	Característica das abelhas sem ferrão (<i>Hymenoptera, Apidae</i>).....	9
2.2	Aspectos gerais do mel.....	9
2.3	Importâncias Econômicas do mel.....	10
2.4	Conhecimento cultural aplicado a propriedades medicinais do mel.....	11
3	METODOLOGIA	13
3.1	Localização.....	13
3.2	Coletas das amostras.....	14
3.3	Testes de sensibilidade <i>in-vitro</i>	14
3.4	Análise microbiológica.....	15
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5	CONCLUSÃO	24
6	REFERÊNCIAS	25
7	CRONOGRAMA DE ATVIDADES	26

1 INTRODUÇÃO

O mel é um produto resultante do processamento de néctar e outras partes extraflorais, que envolve uma enzima chamada invertase durante a digestão das abelhas e é um alimento amplamente consumido devido ao seu sabor agradável representando uma importante fonte de energia (ALVES *et al.*, 2009), que está associado a uma imagem de produto natural, saudável e limpo, sendo-lhe atribuídas a ele propriedades medicinais decorrente, principalmente, da comprovação científica de suas diversas propriedades benéficas à saúde, sendo estas nutricionais; farmacológicas; atividade antimicrobiana; cicatrizantes e antioxidantes, geralmente relacionadas às suas características físico-químicas (SOUZA *et al.*, 2009). Muitas vezes caracterizado como um suplemento alimentar (GONÇALVES & ALVES FILHO, 2005). A utilização do mel por suas propriedades farmacológicas, cicatrizantes, antioxidantes e atividade antimicrobiana, vem sendo feita com os povos mais antigos da América central, incluindo Amazônia (COLETTI-SILVA, 2005) e atualmente ainda se tem registros de sua utilização na medicina popular. Tais propriedades medicinais têm despertado interesse entre os pesquisadores devido ao seu potencial de aplicabilidade em casos clínicos (GONÇALVES & ALVES FILHO, 2005). Durante as últimas décadas, a utilização indiscriminada de antibióticos vem favorecendo a emergência de linhagens de microrganismos patogênicos apresentando resistência aos mais variados antibióticos. Frente à necessidade de desenvolvimento de novas classes de antibióticos, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas com produtos naturais, seja de origem vegetal como animal, visando a detecção e caracterização de compostos químicos com propriedades terapêuticas, entre elas a antimicrobiana (GONÇALVES e ALVES FILHO, 2005). A primeira menção à presença de antibióticos nos méis de Meliponíneos foi a de Gonnet, Pierre Lavie e Paulo Nogueira-Neto (1964). Em grandes regiões da América Latina e da

África, o mel dos Meliponíneos é de um modo geral considerado por muitas pessoas como possuindo propriedades medicinais e bactericidas capazes de neutralizar a ação de germes e bactérias que normalmente estão ligadas à presença de antibióticos. Contudo, quase sempre faltam trabalhos de investigação médica, realizados com técnica e metodologia científica, seja para comprovar em pessoas e animais os efeitos curativos desse mel, seja para indicar como esse e outros produtos das abelhas devem ser utilizados. Sendo que muitas vezes na própria medicina popular é utilizado de maneira incorreta, de modo que há uma necessidade de conhecer o potencial inibidor do mel contra bactérias que venham a ocasionar possíveis contaminações a saúde humana e animal. Entre estas, *Staphylococcus aureus* um importante patógeno devido a sua virulência, resistência aos antibióticos e associação a várias doenças, incluindo enfermidades sistêmicas potencialmente fatais (XAVIER *et al.*, 2007), e *Escherichia coli* um enteropatógeno responsável por aproximadamente 40% a 50% das bacteremias causadas por germes Gram negativos (TRABULSI *et al.*, 1999).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como finalidade analisar o potencial inibidor do mel de *Melipona* sp. de criações artesanais, contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Característica das abelhas sem ferrão (Hymenoptera, APIDAE)

Os meliponíneos, são os locais onde são encontradas as chamadas abelhas sem ferrão, caracterizam-se por possuírem o ferrão atrofiado e por serem sociais. Constituem um grupo de abelhas formado por mais de 300 espécies conhecidas em todo o mundo. Esse tipo de abelha, não é considerado indefeso pela atrofia do ferrão, elas desenvolveram várias estratégias para defesa. Possuem uma grande importância no ecossistema brasileiro, pois são os principais responsáveis pela polinização da grande maioria das espécies vegetais do nosso país.

Seus produtos, mel, geoprópolis e pólen, são utilizados pela população rural como medicamentos e existe uma forte cultura popular do seu criatório e da apreciação de seus produtos. Infelizmente, quando se fala em abelhas produtoras de mel a espécie mais conhecida é a exótica *Apis mellifera*, apesar de o Brasil possuir uma diversificada fauna de abelhas eussociais. Essas abelhas são produtoras de mel cujo relato de consumo data desde períodos pré-colombianos no continente Americano, ao qual são atribuídas propriedades medicinais e atualmente, o interesse sobre estas espécies foi intensificado após a regulamentação de sua criação pela Resolução 346 do CONAMA e de movimentos de conservação de polinizadores, como a “Iniciativa Brasileira de Polinizadores” (FREITAS, 2003).

2.2 Aspectos gerais do mel

O mel é uma substância natural, elaborada pelas abelhas a partir do néctar das flores ou de exsudações sacarínicas de outras partes vivas das plantas, que são coletadas e transformadas por meio da evaporação da água e da adição de enzimas (HORN *et al.*, 1996). Deve apresentar aspecto líquido, denso, viscoso e translúcido, e cor que poderá variar do amarelo ao amarelo avermelhado, com cheiro próprio, sabor doce e

característico (CATALAN, 1981). É um alimento amplamente consumido devido ao seu sabor agradável e por representar uma importante fonte de energia (ALVES *et al.*, 2009), que está associado a uma imagem de produto natural, saudável e limpo, sendo-lhe atribuídas a ele propriedades medicinais decorrente, principalmente, da comprovação científica de suas diversas propriedades benéficas à saúde, sendo estas nutricionais; farmacológicas; atividade antimicrobiana; cicatrizantes e antioxidantes, geralmente relacionadas às suas características físico-químicas (SOUZA *et al.*, 2009). Tais propriedades tem despertado interesse entre os pesquisadores devido ao seu potencial de aplicabilidade em casos clínicos.(GONÇALVES *et al.*, 2005).

2.3 Importância Econômica do mel

O mel das abelhas indígenas obtém melhor preço no mercado, por se tratar de um produto especial, orgânico e raro, o aroma e sabor desses méis possuem características únicas, dependendo da florada e da espécie da abelha que a produziu. No ecossistema brasileiro, em especial o amazônico, possuem muitas condições que favorecem a criação das abelhas, dentre elas podemos citar: clima quente; flora rica em espécies fornecedoras de néctar, pólen e resina; floração mista distribuída ao longo do ano; diferentes espécies de abelhas produtoras de mel e um grande mercado com boa cotação para esse produto.

A produção brasileira de mel, que saltou de 38 mil toneladas em 2009 para 50 mil toneladas em 2010, colocou o país na 11^a posição no ranking dos produtores mundiais, sendo destaque, como quinto maior exportador do produto. De acordo com o Ministério da Agricultura, programas de incentivo à produção e capacitação de agricultores envolvidos com a cadeia produtiva, são os responsáveis pelo destaque nesse setor.

A produção de mel no estado do Amazonas correspondeu a 21 toneladas, cerca de 0,1% da produção nacional (IBGE, 2012). Ações governamentais e extencionistas têm sido empreendidas a fim de incentivar a produção familiar. O município de Parintins ocupa posição de destaque, pois existem projetos em andamento nas comunidades ribeirinhas, que visam à capacitação de comunitários e a padronização de caixas, tendo em vista o aperfeiçoamento e aumento da produção de mel de abelhas do gênero *Melipona* sp. a produção de mel tem se constituído uma alternativa aos moradores das zonas rurais e urbanas no município. (MATOS *et al.*, 2011).

2.4 Conhecimento cultural aplicado a propriedades medicinais do mel

Durante as últimas décadas, a utilização indiscriminada de antibióticos vem favorecendo a emergência de linhagens de microrganismos patogênicos apresentando resistência aos mais variados antibióticos. Frente à necessidade de desenvolvimento de novas classes de antibióticos, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas com produtos naturais, seja de origem vegetal como animal, visando à detecção e caracterização de compostos químicos com propriedades terapêuticas, entre elas a antimicrobiana (GONÇALVES *et al.*, 2005).

As abelhas (Hymenoptera, APIDAE) representam uma importância cultural significativa, interagindo com o homem de maneira direta, pelo uso de larvas e pupas na alimentação, ou de maneira indireta, pela oferta de produtos como pólen apícola, mel, própolis, geleia real e cera, utilizados para fins alimentícios, religiosos, pajelanças, cosméticos e medicinais. O mel de abelhas é um suplemento alimentar que, ultimamente vêm recebendo um incremento no consumo decorrente, principalmente, da comprovação científica de suas diversas propriedades benéficas à saúde além do seu uso como alimento, é um produto de reconhecidas propriedades bactericidas, capaz de neutralizar a

ação de germes e bactérias. (BARBOSA *et al*, 1994; ALLEN *et al.*, 1991). A primeira menção à presença de antibióticos nos méis de meliponíneos foi a de Gonnet, Pierre Lavie e Paulo Nogueira-Neto (1964). Em grandes regiões da América Latina e da África, o mel dos Meliponíneos é de um modo geral considerado por muitas pessoas como possuindo propriedades medicinais normalmente ligadas à presença de antibióticos. Contudo, quase sempre faltam trabalhos de investigação médica, realizados com técnica e metodologia científica, seja para comprovar em pessoas os efeitos curativos desse mel, seja para indicar como esse e outros produtos das abelhas devem ser utilizados.

Neste contexto os produtores rurais no município de Parintins têm no mel de *Melipona* sp., além de uma fonte alternativa de renda, um implemento da medicina popular, utilizando-o como tratamento à determinadas doenças, muitas vezes levando em consideração o conhecimento cultural repassado de geração a geração. Este produto é coletado e engarrafado artesanalmente, e comercializado pelos produtores em feiras locais sem qualquer tipo de controle sanitário ou análises que comprovem suas propriedades medicinais.

Entretanto, embora seja um produto agrícola com notável aumento de produção e consumo no município ainda hoje não é conhecido em suas propriedades físico-químicas e possíveis particularidades (ABREU *et al.*, 2005). E muitas vezes não existe qualquer tipo de controle ou inspeção sanitária sobre o mel produzido artesanalmente. Considerando a meliponicultura crescente do município e a escassez de estudos abordando o assunto, há necessidade de se compreender e conhecer o produto.

A qualidade microbiológica do mel veio subsidiar nos testes de sensibilidade *in-vitro* verificando se a microbiota do mel influencia na inibição do crescimento bacteriano, tendo em vista uma carência de pesquisas em análise microbiológica, onde apenas um

trabalho científico foi desenvolvido com o mel de abelhas sem ferrão produzido na zona rural de Parintins, objetivando analisar a qualidade microbiológica (MATOS *et al.*, 2011).

3 METODOLOGIA

3.1 Localização

O referido projeto foi desenvolvido no município de Parintins, localizado no extremo leste do estado do Amazonas, fazendo fronteira com o estado do Pará. O marco zero do município localiza-se a 56°73' W e 2°62' S.

O projeto foi realizado em duas etapas sendo coletadas 11 amostras entre outubro de 2012 e março de 2013, e 14 amostras de outubro de 2013 e março de 2014, totalizando 25 amostras durante todo o projeto, o período de outubro a março segundo os produtores, corresponde à safra do mel na região. Dentre as 25 amostras duas foram coletadas dentro do perímetro urbano de Parintins e 23 foram obtidos na comunidade de Cameté zona rural do município de Barreirinha, este vizinho a Parintins, aproximadamente 60Km via fluvial. Foi feito um cadastro das propriedades e quantificados os ninhos em cada uma, todas as amostras foram compostas com a finalidade de representar a produção da propriedade, os pontos de coleta foram georeferenciados com GPS (tabela 1), as áreas de forrageio das abelhas foram avaliadas quanto às espécies florísticas nos locais onde se encontra os ninhos das abelhas, buscando sempre caracterizar o ambiente externo às colônias.

Amostras	Coordenadas geográficas	Localização
1;9	S 02° 50' 18" / W 57° 24' 48,4"	Zona rural – BAE
2;23	S 02°57' 12,4" / W57° 24' 44"	Zona rural - BAE
3;6;10	S 02° 50' 13" / W057° 24' 52,8"	Zona rural – BAE

4;5	S 02° 39' 09,5" / W 056° 044' 55,5"	Zona urbana – PIN
7;24	S 02° 50' 20,2" / W 57° 25' 0,3"	Zona rural – BAE
8;11;15;16	S 02° 50' 23,7" / W 57° 24' 55,4"	Zona rural – BAE
12	S 02° 50' 11,3" / W 57° 24' 55,4"	Zona rural – BAE
13;22	S 02° 50' 14,2" / W 57° 24' 53,2"	Zona rural – BAE
14; 25	S 02° 50' 13,3" / W 57° 24' 54"	Zona rural – BAE
17	S 02° 50' 10,7" / W 57° 24' 48"	Zona rural – BAE
18;19	S 02° 50' 13,6" / W 57° 25' 25"	Zona rural – BAE
20;21	S 02° 50' 20,7" / W 57° 24' 58,8"	Zona rural – BAE

Tabela 1: Número de amostras, coordenadas geográficas e localização dos pontos de coleta.

3.2 Coletas das amostras

O mel foi coletado por aspiração com seringa estéril diretamente dos ninhos de *Melipona* sp., obtendo-se 100 ml para cada amostra composta. Estas foram acondicionadas em frascos esterilizados e mantidas refrigeradas a 4°C até o início das análises. Cada amostra foi identificada por número sequencial, e encaminhadas ao laboratório de Microbiologia, Histologia e Fisiologia, situado no campus do Instituto de Ciências Sociais, Educação e Zootecnia (ICSEZ) localizado em Parintins-Am, para que se procedam as análises.

3.3 Testes de sensibilidade *in-vitro*

Os testes de sensibilidades *in-vitro* foram executados utilizando linhagens puras das bactérias *Escherichia coli* CBAM 0001, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 adquiridas, da Coleção de Culturas DPUA (Departamento de Parasitologia, UFAM). Com o auxílio de um swab as linhagens foram semeadas em placas de Petri contendo Agar Mueller- Hinton, sendo feito um esfregaço, cobrindo toda a superfície do meio. Discos de

papel-filtro (6 mm) impregnados com 25 microlitros de mel foram posicionados no centro da placa, e estas foram incubadas a 37 °C por 24h. A mensuração dos halos de inibição foi feita com o auxílio de paquímetro, os ensaios foram executados em triplicata.

3.4 Análise microbiológica

As amostras foram diluídas à proporção 1:10, adicionando-se 25mL de mel a 225 mL de água peptonada tamponada 0,1%, 1:100 e 1:1000 adicionando-se 1ml da diluição anterior em 9 ml de solução salina 0,9% respectivamente. O teste presuntivo para bactérias do grupo coliformes, foi executado inoculando-se 1 mL da amostra diluída nas três concentrações 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} em tubos contendo 9 ml de Caldo Lauril Sulfato Tripitose estes foram incubados em estufa com temperatura de 36 °C por 24 horas, em todos os tubos foram colocado um tubo de Durhan em posição invertida, no qual indicará o resultado positivo através da retenção de gás. Os testes confirmativos foram executados inoculando-se 1,0 ml do conteúdo dos tubos do teste presuntivo com resultado positivo, em tubos contendo 9,0 mL de Caldo Bile Verde Brilhante para quantificação de coliformes totais, estes foram incubados em estufa a $36\pm 0,5$ °C com leitura de 24-48 horas e em tubos contendo 9,0 ml de Caldo EC para quantificação de coliformes termotolerantes (*Escherichia coli*), estes foram incubados em estufa a $45\pm 0,2$ °C com leitura de 24-48 horas. Foram considerados positivos os tubos que apresentarem retenção de gás nos tubos de Durhan, adicionados aos meios em posição invertida indicando atividade fermentativa. Os resultados foram usados para cálculo do número mais provável (NMP) de unidades formadoras de colônia por ml da amostra (mel), (UFC/ml).

A análise da qualidade micológica, bolores e leveduras, foi realizada, pelo cultivo por técnica *spread-plate*, de 100 µL da amostra diluída na concentração 10^{-2} , em placas

de Petri contendo Agar Batata Dextrose, adicionado cloranfenicol (40 µg/mL), procedendo-se espalhamento com alça de Drigalski, as placas foram incubadas em estufa B.O.D. a 25 °C por de 5 a 7 dias, os ensaios foram realizados em duplicata. Sendo quantificadas por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) nos inoculados.

Todos os testes foram executados segundo as normas estabelecidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

A análise estatística foi realizada a partir de uma análise descritiva do potencial inibidor do mel de *Mellipona sp.* frente as bactérias, através da porcentagem de inibição.

E a comparação das médias das triplicatas em cada bactéria foi submetida ao teste de Tukey a 5% de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante milhares de anos o mel é utilizado como um medicamento natural no tratamento de doenças respiratórias, infecções gastrointestinais, queimaduras, feridas infectadas e úlceras, suas características físicas e químicas conferem-lhe propriedades únicas como um efetivo agente antimicrobiano (PEREIRA, 2008).

No gráfico 01 está representando o percentual de inibição do mel contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, observa-se que o percentual para bactéria *S. aureus* é maior em relação à bactéria *E. coli* com resultados de 57,3% e 33,3%, respectivamente. Pereira (2008) relata que as bactérias exibem diferente sensibilidade ao mel, algumas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus stearothermophilus* são extremamente sensíveis, enquanto outras, *Staphylococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*,

Alcaligenes faecalis, *Lactobacillus acidophilus*, *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis* apenas são moderadamente e por outro lado, o crescimento de *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* parece não ser afetado pelo mel. A atividade antimicrobiana do mel deve-se principalmente às suas propriedades físicas e químicas, tendo como principais indicadores ou substâncias que contribuem para essa atividade a elevada osmolaridade e a acidez do mel, o peróxido de hidrogênio, os compostos voláteis, os ácidos orgânicos, os compostos fenólicos e a lisozima (PEREIRA A. P. 2008). Borsato e colaboradores (2009), ressalta que essa variação na atividade antimicrobiana também pode está relacionada aparentemente, por contribuição de diversos fatores, como diferenças no solo, condições atmosféricas, relacionados ao tipo e fisiologia de cada planta que contribui para a formação do mel, ou mesmo de ser resultado de diferenças na composição química atribuída a diferentes origens florais e condições ambientais.

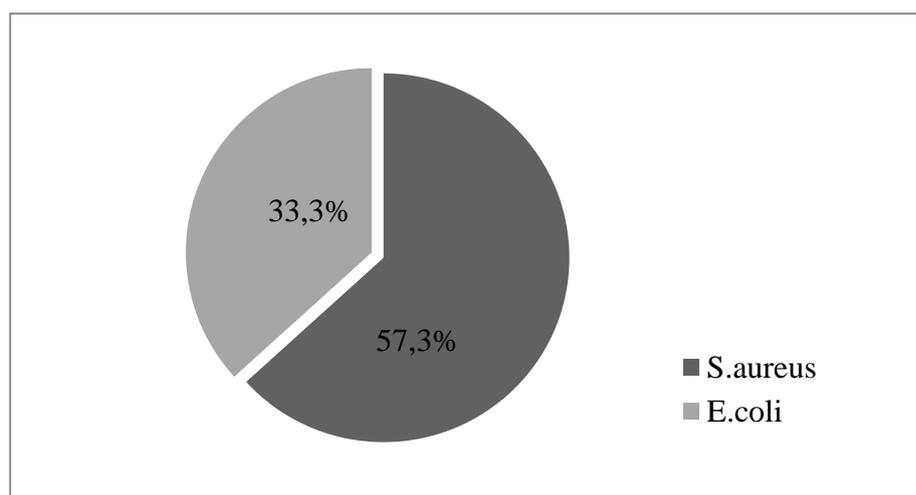


Gráfico 01: Potencial inibidor do mel contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Na tabela 2 são apresentados os valores médios dos halos de inibição do crescimento das bactérias *E. coli* e *S. aureus* em cada amostra, nos diferentes períodos de coleta. Observa-se que no período de 2012/2013 as amostras 5, 6, 7, 9 e 11 foram capazes

de inibir o crescimento das duas bactérias, sendo que a amostra 11 obteve os maiores valores de inibição com 15,3mm e 8,3mm para *E. coli* e *S. aureus*. As amostras 5 e 6 obtiveram valores médios iguais nas duas bactérias, sendo de 3,3mm para *E. coli* e 10,7mm para *S. aureus*, porém a amostra 7 obteve valor médio igual para as duas bactérias com halo de inibição de 7,0mm. Nas amostras 1 e 3 somente houve inibição no crescimento da bactéria *S. aureus*, sendo esta incapaz de impedir o crescimento da bactéria *E. coli*. O inverso aconteceu nas amostras 8 e 10 onde somente ocorreu inibição do crescimento da bactéria *E. coli*, enquanto que *S. aureus* não foi inibida. Nas amostras 2 e 4 não ocorreu inibição no crescimento de nenhuma das duas bactérias. Nas amostras coletadas no período de 2013/2014 observou-se que somente as amostras 14; 18; 23 e 25 foram capazes de inibir o crescimento nas duas bactérias, sendo que a amostra 25 apresentou valor médio de inibição maior para bactéria *E. coli*, e a amostra 14 apresentou valor médio de inibição maior para bactéria *S. aureus*, com valores de 12,3mm e 17mm respectivamente. Nas amostras 13; 16; 17; 21 e 24 observou-se que estas apresentaram halo de inibição somente para bactéria *S. aureus* com valor mínimo de 8,3 mm e máximo de 15,3mm. O inverso ocorreu na amostra 12 apresentando somente halo de inibição para bactéria *E. coli*, com valor de 7mm. As amostras 15; 19; 20 e 22 não apresentaram halo de inibição nas duas bactérias.

De acordo com os resultados apresentados foi possível constatar que o mel de *Mellipona* sp. de criações artesanais possuem uma atividade antibacteriana, e que o potencial inibidor contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus* foram relevantes a pesquisa. Iurlina e Fritz, (2005) ao fazer avaliações de atividades antimicrobianas puderam chegar aos mesmos resultados onde relatam que propriedades intrínsecas do mel afetam o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos por ação bacteriostática ou bactericida prevenindo o crescimento de muitos microrganismos.

Autores como Wahdan (1998) e Molan (1992) apontam a sinergia entre fatores físicos como a alta osmolaridade, e fatores químicos relacionados ao pH, à presença de substâncias inibidoras como o peróxido de hidrogênio e ácidos (BOGDANOV *et al.* 2004), como promotores da atividade biológica do mel podem ser responsáveis pela atividade antimicrobiana do mel. Sato e Miyata (2000), relatam que a atividade antimicrobiana do mel talvez seja o efeito medicinal mais evidente, e que vários fatores associados podem ser responsáveis por tal atividade.

Período de coleta	Amostra	Halo de inibição (mm)	
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
2012/2013	1	0	17
	2	0	0
	3	0	18
	4	0	0
	5	3,3	10,7
	6	3,3	10,7
	7	7	7
	8	8,3	0
	9	14	4,3
	10	10,7	0
	11	15,3	8,3
2013/2014	12	7	0
	13	0	8,3
	14	7	17
	15	0	0
	16	0	15,3
	17	0	14
	18	10,7	12,3
	19	0	0
	20	0	0
	21	0	10,7
	22	0	0
	23	3,7	7
	24	0	12,7
	25	12,3	11,7

Tabela 2: Tamanho do halo de inibição do crescimento das bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, utilizando o mel de *Mellipona* sp. e período das coletas das amostras.

Na análise estatística no teste de Tukey, comparando as médias do tamanho do halo de inibição verificou-se que o tamanho do halo e as bactérias não têm relação significativa. Sendo assim aceito que o mel de *Mellipona* sp. é capaz de inibir o crescimento das bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

Os resultados encontrados para a contagem padrão de bolores e leveduras unidades formadoras de colônia (UFC/ml), número mais provável de coliformes totais a 35°C e termotolerantes a 45°C(NMP/ml) estão apresentados da tabela 03.

Amostras	Coliformes		Fungos UFC/ml
	Totais (NMP/ ml)	Termotolerantes (NMP/ml)	
1	< 0,3 x10 ¹	< 0,3 x10 ¹	1,5 x10 ¹
2	< 0,3 x10 ¹	< 0,3 x10 ¹	2,0 x10 ¹
3	2,0 x10 ¹	2,3 x10 ¹	1,7 x10 ¹
4	< 0,3 x10 ¹	< 0,3 x10 ¹	1,6 x10 ¹
5	< 0,3 x10 ¹	0,74 x10 ¹	0,3 x10 ¹
6	< 0,3 x10 ¹	< 0,3 x10 ¹	0,1 x10 ¹
7	< 0,3 x10 ¹	< 0,3 x10 ¹	1,09 x10 ²
8	1,5 x10 ²	1,1 x10 ³	0,2 x10 ¹
9	< 0,3 x10 ¹	1,1 x10 ³	1,0 x10 ¹
10	< 0,3 x10 ¹	1,1 x10 ³	6,7 x10 ¹
11	< 0,3 x10 ¹	1,1 x10 ³	0,1 x10 ¹
12	2,8 x10 ¹	1,1 x10 ¹	1,2 x10 ¹
13	0,3 x10 ¹	2,7 x10 ¹	0,6 x10 ¹
14	< 0,3 x10 ¹	7,5 x10 ¹	1,8 x10 ¹
15	< 0,3 x10 ¹	2,1 x10 ¹	2,1 x10 ¹
16	0,3 x10 ¹	1,6 x10 ¹	1,1 x10 ¹
17	0,36 x10 ¹	4,6 x10 ²	2,5 x10 ²
18	0,61 x10 ¹	7,4 x10 ¹	2,3 x10 ¹
19	< 0,3 x10 ¹	6,1 x10 ¹	2,7 x10 ¹
20	1,2 x10 ²	4,6 x10 ²	2,7 x10 ²
21	< 0,3 x10 ¹	0,92 x10 ¹	0,4 x10 ¹
22	1,4 x10 ¹	2,1 x10 ²	1,9 x10 ²
23	0,61 x10 ¹	1,4 x10 ¹	0,6 x10 ¹
24	0,61 x10 ¹	1,5x10 ¹	1,1 x10 ¹
25	3,5 x10 ¹	1,5 x10 ¹	2,3 x10 ¹

Tabela 3: Número mais Provável de Unidades Formadoras de Colônia/ml (NMP/UFC/ml).

De acordo com os resultados obtidos para contagem padrão de bolores e leveduras, 4 amostras, correspondendo a 16% do total, apresentam valores acima do máximo estabelecido pela Legislação brasileira (BRASIL, 2001), sendo consideradas impróprias ao consumo humano direto. Os valor máximo foi verificado na amostra 20, e mínimo nas amostras 6 e 11 com valores de $2,7 \times 10^2$ e $0,1 \times 10^1$ UFC/ml respectivamente.

Os resultados encontrados na pesquisa corroboram com o trabalho de Souza (2009) onde na contagem padrão de bolores e leveduras, sete amostras, correspondendo a 50,0% do total, apresentaram valores acima do máximo estabelecido pela regulamentação técnica para alimentos, RDC 012 (BRASIL, 2001), sendo consideradas impróprias para o consumo humano direto. Os valores máximo e mínimo foram de $<1,0 \times 10$ e $4,4 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ respectivamente.

SALES e colaboradores (2006) também encontrou valores para contagem de Bolores e leveduras acima do máximo estabelecido conforme Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel (MAPA, 2000) em três amostras (36%), os valores máximos e mínimos foram $> 1,0 \times 10^3$ e $<1,0 \times 10$ UFC/g, respectivamente.

Segundo Matos e colaboradores (2011) o maior número de unidades formadoras de colônias dos microrganismos são encontrados nos períodos iniciais da safra, quando as flores ainda são escassas, onde é reforçada a hipótese de que ocorre um forrageio e coleta em colônias fúngicas, fezes e argila pelas abelhas durante períodos de escassez de alimentos.

A quantificação de coliformes totais e termotolerantes observou-se que 20 amostras correspondendo a 80% do total apresentaram contaminação por coliformes termotolerantes, à presença de tais microorganismos é um indicativo que este produto possui uma contaminação com matéria orgânica de origem fecal. As amostras 8; 9; 10 e 11 foram consideradas impróprias ao consumo por apresentarem na contagem do número mais provável, valores de $1,1 \times 10^3$ UFC/ml de coliformes termotolerantes. MATOS e colaboradores (2011) afirma que, o consumo de mel que apresente coliformes termotolerantes deve ser evitado, pois o indicativo de contaminação fecal torna este produto um potencial transmissor de enteroparasitas. E Nogueira-Neto (1997) menciona que a qualidade microbiológica do mel não depende apenas da prática higiênica dos manipuladores, mas está correlacionada com os hábitos higiênicos das abelhas produtoras.

Na tabela 4 observa-se que algumas amostras foram coletadas na mesma propriedade nos dois períodos de coleta, e estas apresentaram tamanho do halo de inibição diferenciadas nas duas bactérias o qual nos leva a hipótese de que existem fatores na composição físico-química do mel que influenciam nessa característica. Isso pode ser bem evidenciado nas amostras 2 e 23 onde no primeiro período não houve halo de inibição nas duas bactérias, porém no segundo período apresentou halo de inibição de 3,7mm para *E. coli* e 7mm para *S. aureus*.

Período de coleta	Amostras	Coordenadas geográficas	Halo de inibição (mm)	
			<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
2012/2013	7	S 02° 50' 20,2" / W 57° 25' 0,3"	7	7
2013/2014	24		0	12,7
2012/2013	8	S 02° 50' 23,7" / W 57° 24' 55,4"	8,3	0
	11		15,3	8,3
2013/2014	15		0	0
	16		0	15,3
2012/2013	2	S 02°57'12,4" /	0	0

Tabela 4: Tamanho do halo de inibição das amostras coletadas no mesmo ponto de coleta em diferentes períodos.

Na tabela 5 observa-se a relação do potencial inibidor com a qualidade microbiológica do mel, nas amostras 1; 4 e 6 a contaminação por coliformes e fungos estão em níveis baixos de $< 0,3 \times 10^1$ e $1,5 \times 10^1$, o potencial inibidor do mel contra as bactérias nestas amostras apresentam halo de inibição com valor de 3,3mm para *E. coli* e 17mm para *S. aureus*. A contaminação por coliformes termotolerantes e fungos na amostras 17 e 22 foi de $4,6 \times 10^2/ 2,5 \times 10^2$ e $2,1 \times 10^2/ 1,9 \times 10^2$ respectivamente, no entanto o potencial inibidor somente foi observado na amostra 17 contra a bactéria *S. aureus*. Nas amostras 8; 9; 10 e 11 onde a contaminação por coliformes termotolerantes foi a mais elevada, o potencial inibidor foi maior na bactéria *E. coli*.

Amostras	Halo de inibição (mm)		Coliformes (NMP/ ml)		Fungos UFC/ml
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	Totais	Termotolerantes	
1	0	17	$< 0,3 \times 10^1$	$< 0,3 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$
2	0	0	$< 0,3 \times 10^1$	$< 0,3 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$
3	0	18	$2,0 \times 10^1$	$2,3 \times 10^1$	$1,7 \times 10^1$
4	0	0	$< 0,3 \times 10^1$	$< 0,3 \times 10^1$	$1,6 \times 10^1$
5	3,3	10,7	$< 0,3 \times 10^1$	$0,74 \times 10^1$	$0,3 \times 10^1$
6	3,3	10,7	$< 0,3 \times 10^1$	$< 0,3 \times 10^1$	$0,1 \times 10^1$
7	7	7	$< 0,3 \times 10^1$	$< 0,3 \times 10^1$	$1,09 \times 10^2$
8	8,3	0	$1,5 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$	$0,2 \times 10^1$
9	14	4,3	$< 0,3 \times 10^1$	$1,1 \times 10^3$	$1,0 \times 10^1$
10	10,7	0	$< 0,3 \times 10^1$	$1,1 \times 10^3$	$6,7 \times 10^1$
11	15,3	8,3	$< 0,3 \times 10^1$	$1,1 \times 10^3$	$0,1 \times 10^1$
12	7	0	$2,8 \times 10^1$	$1,1 \times 10^1$	$1,2 \times 10^1$
13	0	8,3	$0,3 \times 10^1$	$2,7 \times 10^1$	$0,6 \times 10^1$
14	7	17	$< 0,3 \times 10^1$	$7,5 \times 10^1$	$1,8 \times 10^1$
15	0	0	$< 0,3 \times 10^1$	$2,1 \times 10^1$	$2,1 \times 10^1$
16	0	15,3	$0,3 \times 10^1$	$1,6 \times 10^1$	$1,1 \times 10^1$
17	0	14	$0,36 \times 10^1$	$4,6 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$

18	10,7	12,3	0,61 x10 ¹	7,4 x10 ¹	2,3 x10 ¹
19	0	0	< 0,3 x10 ¹	6,1 x10 ¹	2,7 x10 ¹
20	0	0	1,2 x10 ²	4,6 x10 ²	2,7 x10 ²
21	0	10,7	< 0,3 x10 ¹	0,92 x10 ¹	0,4 x10 ¹
22	0	0	1,4 x10 ¹	2,1 x10 ²	1,9 x10 ²
23	3,7	7	0,61 x10 ¹	1,4 x10 ¹	0,6 x10 ¹
24	0	12,7	0,61 x10 ¹	1,5x10 ¹	1,1 x10 ¹
25	12,3	11,7	3,5 x10 ¹	1,5 x10 ¹	2,3 x10 ¹

Tabela 5: Relação do potencial inibidor com a qualidade microbiológica do mel.

5 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados foi possível constatar que o mel de *Mellipona* sp. de criações artesanais possuem uma atividade antibacteriana, e que o potencial inibidor contra as bactérias *E. coli* e *S. aureus* foram significativos na maior parte das análises.

A qualidade microbiológica do mel não influencia no potencial inibidor do mel. Sendo assim aceito que o mel de *Mellipona* sp. é capaz de inibir o crescimento das bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

6 REFERÊNCIAS

- ABREU, B.X.; ROMANO, V.P.; RISTOW, A.M.; CAVALLO, E.G. Determinação da umidade em méis não inspecionados comercializados no Estado do Rio de Janeiro. *Higiene Alimentar*, v.19, n.129, p.88-90, 2005.
- ALVES, E.M.; TOLEDO, V.A.A.; MARCHINI, L.C.; SEREIA, M. J.; MOETIA, C.C.C. Presença de coliformes, bolores e leveduras em amostras de mel orgânico de abelhas africanizadas das ilhas do alto rio Paraná. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, n.7, p.2222-2224, 2009.
- BORSATO, D. M.; CRUZ, M. C. R.; ALMEIDA, M. M. Atividade antimicrobiana de méis comercializados na Região dos Campos Gerais- Paraná. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 10, n. 1, jan- jun/ 2009- ISSN. 1518- 5192.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **IBGE Cidades**. Disponível em <<<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>> Acessado em 11 de abril de 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. Brasília; 2001, p. 29.
- CARVALHO, C. A. L. et al . Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico- química. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia/ SEAGRI- BA. 32p. 2005.
- CATALAN, J.M.B. **Relatório de atividades**. Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Piauí. Teresina, 1981. 27p.
- COLETTO-SILVA, A. Captura de Enxames de Abelha Sem Ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) sem Destruição de Árvores. *Acta Amazônica*. Vol. 35(3) 2005.
- FREITAS, B.M. A Vida das Abelhas. Arquivos da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.
- GONÇALVES, A.L.; ALVES FILHO, A.; Atividade antimicrobiana do mel da abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v.72, n.4, p.455-459, 2005.
- HORN, H. Alunos da disciplina análise de mel da Universidade de Hoheinheim, Alemanha. Méis brasileiros: resultados de análises físico-químicas e palinológicas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 11., 1996, Teresina, PI. **Anais**. Teresina: Confederação Brasileira de Apicultura, 1996. p.403-429.
- MATOS, I. T. S. R.; NUNES, M. T.; MOTA, D. A.; LAUREANO, M. M. M.; HOSHIBA, M. A. Qualidade Microbiológica do Mel de *Melipona* sp. Produzido na Amazônia Central (Parintins – AM – Brasil) **Revista Verde** (Mossoró – RN – Brasil) v.6, n.4, p.91 – 95. 2011.

- NOGUEIRA- NETO, P. **Vida e Criação de Abelhas indígenas sem ferrão.** – São Paulo: Editora Nogueirapis, 1997. 445 p.
- PEREIRA, A. P. R. Caracterização de Mel com vista a Produção de Hidromel. 2008. 81f. Dissertação (Mestrado)- Escola Superior Agrária de Bragança,. Bragança.
- SALES D. P.; SOUSA P. B.; BRITO L. B. S.; ALVES L. M. C.; BEZERRA J. M. D. Avaliação da qualidade microbiológica de amostras de mel de *Melipona compressipes* e de *Apis mellifera* no estado do Maranhão, Curso de Medicina Veterinária, UEMA, São Luis, MA, Brasil.
- SOUZA, B.A.; MARCHINI.; L.C.; DIAS, C.T.S.; ODA-SOUZA, M.; CARVALHO, C. A.L.; ALVES, R.M.O. Avaliação microbiológica de amostras de mel de trigoníneos (Apidae: Trigonini) do Estado da Bahia. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 29(4): 798-802, out.-dez. 2009.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; COMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. Microbiologia 3.ed. São Paulo: ed. Ateneu, 1999.
- XAVIER, A. C. C.; OPORTO, C. S. O.; SILVA, M. P.; SILVEIRA, I. A.; ABRANTES, M. R., Prevalência de *Staphylococcus aureus* em manipuladores de alimentos das creches municipais da cidade de natal/RN in RBAC, vol. 39 (3): 165-168, 2007.

