



Universidade do Estado do Amazonas – UEA
Escola Superior De Ciências Da Saúde - ESA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos
Naturais da Amazônia – MBT

**Avaliação da atividade antibacteriana e identificação de
compostos fenólicos do mel de abelhas sem ferrão
(Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) *Melipona compressipes
manaosenses e Melipona seminigra***

Renah Boanerges de Queiroz Pimentel

Manaus-AM

2010

Renah Boanerges de Queiroz Pimentel

**Avaliação da atividade antibacteriana e identificação de
compostos fenólicos do mel de abelhas sem ferrão
(Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) *Melipona compressipes
manaoenses e Melipona seminigra***

Orientador: Prof. Dr. Sergio Duvoisin Junior (UEA)

Co-orientador: Prof. Dr. Cristóvão Alves da Costa (INPA)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas – UEA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais, área de concentração em Biotecnologia.

Manaus-AM
2010

DEDICATÓRIA

Ao meu avô José Boanerges de Queiroz, que sempre me apoiou, e sempre me apoiará, que me ofereceu um modelo de homem a ser seguido, por isso, tenho muito orgulho em carregar o seu nome, com todo o seu amor, bondade e sabedoria construiu nossa família e que agora me envia todo esse amor por meio de forças espirituais.

A Raimundo Roberto de Aguiar Pimentel, Cândida Maria de Queiroz Pimentel, Roberto Eugênio de Queiroz Pimentel, Rafael de Queiroz Pimentel e a pequenina Giovana Pietra, meus pais, irmãos e sobrinha, com amor, carinho e gratidão por toda sua compreensão e por todos os exemplos de vida deixados a cada momento.

Ao Cristóvão Alves da Costa, uma pessoa muito importante na minha formação, com todo carinho e admiração, agradeço-lhe por todos esses anos de ensinamentos, incentivos, confiança e atenção dedicados durante os passos iniciais de minha carreira acadêmica.

Aos olhos puxados que um dia me olhavam, mas agora não olham mais. Mas quando me olhavam, me enchiam de alegria e esperança. Me fez acreditar por um momento que o amor poderia ser realmente possível. (a **K.Yamagata**)

Em especial a todos os meus amigos, por todo apoio, atenção, carinho e incentivos dispersados por Rafael Lopes, Elissando Banhos (Sandro), André Luiz, André Felipe e esposa Graciela, Dani (Daniele Pinheiro), Camila de Souza Paula e esposo Márcio, Luciano Fernandes e esposa Luciana, Aldo Procópio, Ana Hilda, Pablina, Claudiane, Leonara, Thiago, Hélio, Alice, Willian, Trianna, Andréia, Sâmia, Sandra, Camila Scop, Regina, Hananda, Thaís, Glaucia, Kimura, Gal, Obed, Roseane, Lucivana, Cristiany, até a tia da trufa, e a sempre eficiente Ivete do Kapela, enfim, a todos os amigos e colegas, que me dão a medida dos dias.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sergio Duvoisin Junior, por ter me aceitado como orientado do curso de mestrado e por toda a paciência, dedicação, ensinamentos, companheirismo e apoio disponibilizados durante estes anos de convivência.

À Prof. Dr.^a. Patrícia Melchionna Albuquerque, pelos ensinamentos, apoio, por toda confiança em mim depositada durante todo o processo do mestrado, os quais muito contribuíram para o meu crescimento científico e intelectual.

Ao Prof. Dr. Luiz Lopez Lozano, pelos comentários pertinentes.

A Dr.^a Gislene Almeida Carvalho-Zilse, chefe do grupo de pesquisa em abelhas do INPA (GPA-INPA), pelas valiosas amostras de mel fornecidas para compor este trabalho.

Ao laboratório de Virologia Tropical do INPA em nome de todos os seus colaboradores, pelo espaço e material fornecido nos testes antibacterianos.

Aos laboratórios do MBT em nome de todos seus colaboradores, pelo apoio e dicas durante as análises cromatográficas.

A CAPES e a FAPEAM, pelo financiamento e bolsas concedidas.

**“SER HUMILDE PARA EVITAR O ORGULHO, MAS
VOAR ALTO PARA ALCANÇAR A SABEDORIA”**

(Santo Agostinho)

*Desde Criança **um sonho**: Ser Médico.*

Como filho de funcionária pública e operário, talvez um curso de Biologia e Química para ensinar fosse bom.

Após muito esforço da família durante o colegial e no vestibular, abrem-se as portas da Biologia.

Durante quatro anos de Graduação tive a oportunidade de mergulhar na incrível área da Microbiologia.

No contato com professores universitários e pesquisadores: surge a estrutura da carreira acadêmica.

Um sonho um ideal, temos que tê-los, nem sempre para alcançá-los!

Mesmo durante a graduação me tornei professor de ensino médio e pré-vestibular.

Seria pleno ser professor MESTRE um dia..., quisera...

Em uma Universidade Pública então, jamais pensei que conseguiria sê-lo!

Sonho realizado! Quatro anos após a Graduação posso receber o título de Mestre em Biotecnologia e Recursos naturais!

Agora, outro sonho distante, seria pleno ser professor DOUTOR...?

*A partir daí já estou no lucro **do sonho**!*

Renah Boanerges de Q. Pimentel

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
ÍNDICE DE TABELAS	XII
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Composição do mel	3
2.2 Fatores que promovem a atividade antibacteriana do mel	4
2.2.1 A osmose	4
2.2.2 Produção de peróxido de hidrogênio	4
2.2.3 Acidez	5
2.2.4 Componentes fitoquímicos	5
2.3 Testes de inibição do crescimento bacteriano <i>in vitro</i>	6
2.4 Avaliação do potencial antibacteriano e cicatrizante do mel na medicina	8
2.3 Flavonóides do mel: ocorrência, origem, importância e identificação	9
2.5.1 Flavonóides	9
2.5.2 Propriedades medicinais dos flavonóides	14
2.5.3 Atividade antibacteriana dos flavonóides	15
2.5.4 Flavonóides no mel	16
2.5.5 Determinação cromatográfica do perfil fenólico de mel	16
3 OBJETIVO GERAL	19
4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
5 MATERIAL E MÉTODOS	20
5.1 Origem e coleta do mel	20

5.2	Microorganismos	21
5.3	Determinação da atividade antibacteriana pelo método da difusão (cavidade-placa)	22
5.3.1	Preparo das placas	22
5.3.2	Construção da escala nefelométrica de McFarland para o controle de turbidez no preparo do inóculo.	22
5.3.3	Preparo do inóculo de bactérias	23
5.3.4	Preparo do ágar-inóculo para os testes de difusão em ágar.	24
5.4	Testes de Macrodiluição em caldo	24
5.4.1	Determinação da concentração mínima inibitória (CIM)	25
5.4.2	Determinação da concentração mínima bactericida (CMB)	26
5.5	Preparação das amostras para cromatografia	27
5.5.1	Extração de compostos fenólicos do mel	27
5.5.2	Preparo das amostras para injeção em CLAE	27
5.5.3	Análise dos flavonóides do mel por CLAE	28
5.5.4	Preparo dos padrões	28
5.5.5	Identificação dos flavonóides	29
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6.1	Testes de difusão em ágar	30
6.2	Testes de macrodiluição em caldo	39
6.3	Análises por CLAE	43
7	CONCLUSÕES	62
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

Avaliação da atividade antibacteriana e identificação de compostos fenólicos do mel de abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) *Melipona compressipes manaosenses* e *Melipona seminigra*

RESUMO - O mel de abelhas vem sendo usado desde a antiguidade nas mais variadas formas de aplicação na medicina, isso se deve principalmente as suas comprovadas propriedades terapêuticas. Hoje em dia parece ser visto como uma alternativa à utilização dos antibióticos que devido ao uso indiscriminado estão causando preocupação frente ao aparecimento de bactérias resistentes. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antibacteriano do mel de duas espécies de abelhas indígenas sem ferrão e alguns méis comerciais frente a seis bactérias patogênicas ao homem, e identificar seus compostos fenólicos. Para os testes antimicrobianos foram utilizadas duas técnicas, a da difusão em ágar e a de macrodiluição em tubo. Dois méis se destacaram como sendo os de maior atividade utilizando o método de difusão em ágar, o mel 1C-2 (*Melipona compressipes manaosensis*) inibindo o crescimento dos microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (0157:H7), *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei* e *Klebsiella sp.*, e o mel IE (mel de *Apis mellifera*, florada de eucalipto) inibindo o crescimento dos microrganismos: *Escherichia coli* (0157:H7), *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei*, *Salmonella paratyphi*, *Klebsiella sp.* Utilizando a técnica de macrodiluição, todas as sete amostras demonstraram boa atividade, inibindo o crescimento de todas as bactérias nas mais variadas diluições, indicando a maior sensibilidade dessa técnica. Vários picos foram revelados em cromatografia líquida de alta eficiência, que podem corresponder a compostos fenólicos. Somente o flavonóide rutina, foi identificado na amostra 1C-2. As informações agrupadas neste trabalho de identificação de compostos fenólicos e de testes antimicrobianos *in vitro*, podem oferecer ao mel vantagens no controle do crescimento bacteriano e no tratamento de certos problemas de saúde.

Palavras Chaves: Mel antibacteriano, Abelhas sem ferrão, Flavonóides, CLAE.

Evaluation of the antibacterial activity and identification of fenolics compositions of the honey of bees without sting (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) *Melipona compressipes manaosenses e Melipona seminigra*

ABSTRACT- The honey of bees has been used from the antiquity in the most varied application forms in the medicine, which is due mainly their proven therapeutic properties. Nowadays it seems to be seen as an alternative to the use of the antibiotics that causing concern front to the emergence of resistant bacteria due to the indiscriminate use. Before that, this work had as objective evaluates the antibacterial potential of the honey of two species of indigenous bees without sting and some honeys commercial front to six patogenic bacteria to the man, and to identify their fenolics compositions. For the antimicrobial tests two techniques were used, the one of the diffusion in agar and the one of dilution in tube. Two honeys stood out how being the one of larger activity using the diffusion method in agar, the honey 1C-2 (*Melipona compressipes manaosensis*) inhibiting the growth of the microorganisms: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (0157:H7), *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei e Klebsiella sp.*, and the honey IE (honey of *Apis mellifera*, adorned of eucalyptus) inhibiting the growth of the microorganisms: *Escherichia coli* (0157:H7), *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei*, *Salmonella paratyphi*, *Klebsiella sp.* Using the dilution technique, all the seven samples demonstrated good activity, inhibiting the growth of all of the bacteria in the but varied dilutions, indicating the largest sensibility of that technique. Several picks were revealed in High Performance Liquid Chromatography, that can correspond to fenolics compositions. Only the flavonoid rutin, was identified in the sample 1C-2. The information contained in this work of identification of compositions fenolics and antimicrobial *in vitro* tests, they can offer to the honey advantages in the control of the bacterial growth and in the treatment of certain problems of health.

Key words: Antibacterial honey, Bees without sting, Flavonoids, HPLC

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fenol básico.....	10
Figura 2A. Esquema da biossíntese de compostos fenólicos a partir da fenilalanina...	10
Figura 2B. Esquema da biossíntese de compostos fenólicos a partir da fenilalanina, indicando a junção de três moléculas de melonil-coA para a formação dos flavonóides.....	11
Figura 3. Estrutura fundamental dos flavonóides, que são biossintetizados a partir de produtos das rotas do ácido chiquímico e do ácido malônico.....	13
Figura 4. Estrutura de algumas classes de flavonóides.....	14
Figura 5. A-apigenina, B-pinocembrina, C-rutina.....	18
Figura 6. Potes de mel na colméia.....	20
Figura 7. Amostras de mel armazenadas em vidro de cor âmbar e geladeira	21
Figura 8. Escala de McFarland Construída.....	23
Figura 9. Padronização dos inóculos bacterianos pela escala de McFarland.....	23
Figura 10. Distribuição das diluições nos tubos de ensaio, de acordo com o cálculo de concentração do mel para cada tubo. B) Inoculação com a cepa bacteriana padronizada, incubação e posterior avaliação do crescimento bacteriano.....	25
Figura 11. Sistema de rota-evaporação a vácuo.....	27
Figura 12. Cromatógrafo Líquido da Alta Eficiência-CLAE.....	28
Figura 13. Teste de difusão em Agar, (a) suspensão de <i>S.sonnei</i> , (b) suspensão de <i>E.coli</i> , com as amostras de mel em suas diferentes diluições em cada cavidade.....	30
Figura 14. Teste de difusão em Agar, (a) suspensão de <i>P.vulgaris</i> , (b) suspensão de <i>S.sonnei</i> , com as amostras de mel em suas diferentes diluições em cada cavidade.....	31
Figura 15. Placas de ágar nutriente, depois de semeadas com alíquotas das diluições e incubadas, com ausência de crescimento bacteriano em A e crescimento bacteriano em B	39
Figura 16. Figura ilustrativa das regiões do cromatograma.....	43
Figura 17. Cromatograma do extrato do mel amostra 1C.....	45
Figura 18. Cromatograma do extrato do mel amostra 1C-2.....	45
Figura 19. Sobreposição dos cromatogramas 1C e 1C-2.....	46
Figura 20. Cromatograma do extrato do mel amostra 2C.....	47

Figura 21. Cromatograma do extrato do mel amostra 2C-2.....	47
Figura 22. Sobreposição dos cromatogramas 2C e 2C-2.....	48
Figura 23. Cromatograma do extrato do mel amostra 5J.....	49
Figura 24. Cromatograma do extrato do mel amostra 6MC.....	50
Figura 25. Cromatograma do extrato do mel amostra IE.....	50
Figura 26. Cromatograma do extrato do mel amostra 1C a 340nm.....	52
Figura 27. Cromatograma do extrato do mel amostra 1C-2 a 340nm.....	53
Figura 28. Sobreposição dos cromatogramas 1C e 1C-2 a 340nm.....	53
Figura 29. Sobreposição dos cromatogramas 1C-2 a 340nm e 1C-2 a 290nm.....	54
Figura 30. Cromatograma do extrato do mel amostra 2C a 340nm.....	55
Figura 31. Cromatograma do extrato do mel amostra 2C-2 a 340nm.....	55
Figura 32. Cromatograma do extrato do mel amostra 5J a 340nm.....	56
Figura 33. Cromatograma do extrato do mel amostra 6MC a 340nm.....	56
Figura 34. Cromatograma do extrato do mel amostra IE a 340nm.....	57
Figura 35. Cromatograma do padrão rutina, detecção a 340nm.....	57
Figura 36. Cromatograma do padrão apigenina, detecção a 340nm.....	58
Figura 37. Cromatograma do padrão pinocembrina, detecção a 340nm.....	58
Figura 38. Sobreposição do cromatograma dos padrões a 340nm.....	59
Figura 39. Cromatograma da amostra 1C-2, após a utilização da técnica de adição do padrão rutina.....	60

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Amostras de mel utilizadas no estudo.....	21
TABELA 2. Escala nefelométrica de Mcfarland.....	22
TABELA 3. Atividade antimicrobiana expressa pela média \pm desvio padrão dos halos de inibição, após inoculação das amostras de mel das duas espécies de abelha do campus do INPA, referentes à primeira coleta (primeiro semestre do ano).....	30
TABELA 4. Atividade antimicrobiana expressa pela média \pm desvio padrão dos halos de inibição, após inoculação das amostras de mel das duas espécies de abelha do campus do INPA, referentes a segunda coleta (segundo semestre).....	31
TABELA 5. Atividade antimicrobiana expressa pela média \pm desvio padrão dos halos de inibição, após inoculação das amostras de méis comerciais em suas diferentes diluições.....	35
TABELA 6. Valores de pH do mel puro e suas diluições.....	36
TABELA 7. Resultado do teste de macrodiluição em caldo do mel 1C e 2C, referentes à primeira coleta, indicando a concentração mínima bactericida de cada diluição do mel.....	39
TABELA 8. Resultado do teste de macrodiluição em caldo do mel 1C-2 e 2C-2, referentes à segunda coleta, indicando a concentração mínima bactericida de cada diluição do mel.....	40
TABELA 9. Resultado do teste de macrodiluição em caldo dos méis comerciais 6MC e 5J, indicando a concentração mínima bactericida de cada diluição do mel.....	42
TABELA 10. Resultado do teste de macrodiluição em caldo do mel comercial IE, indicando a concentração mínima bactericida de cada diluição do mel.....	42

1 INTRODUÇÃO

Sem dúvida um dos grandes problemas enfrentados hoje em todos os hospitais são as infecções bacterianas, principalmente infecções causadas por bactérias resistentes. A resistência bacteriana envolve mutações genéticas, estáveis e transmitidas a gerações sucessivas. O uso indiscriminado e abusivo de antibióticos seleciona cepas bacterianas mutantes resistentes, tornando a resistência um problema mundial, provocando infecções incontroláveis, levando ao uso de substâncias mais potentes e perigosas.

Os termos antibióticos, antimicrobianos e quimioterápicos vêm sendo adotados como sinônimos, que significam substâncias químicas com atividade contra microrganismos específicos. No entanto, o termo antibiótico foi primeiramente definido como substâncias produzidas por microrganismo (fungos ou bactérias), que inibem o crescimento de outros microrganismos. Portanto, tecnicamente antibióticos diferem de quimioterápicos, pois estes resultam da síntese química. Sendo assim, termos técnicos passaram a ser antiquados, e o termo antimicrobiano passou a ser sugerido para descrever todas as substâncias com atividade antimicrobiana de origem natural ou sintética que atuam como antibacterianos, antivirais e antifúngicos (TAVARES, 2002). Neste trabalho utilizaremos o termo antimicrobiano para o material em estudo.

O número de substâncias com atividade biológica indicados pela medicina para o tratamento dessas infecções é extenso, e a resistência a essas moléculas acaba sendo inevitável; criando assim a necessidade de buscar novos antimicrobianos na natureza.

O mel vem sendo utilizado desde a antiguidade no tratamento de feridas e queimaduras, e atualmente vem sendo cada vez mais utilizado na medicina moderna para esses tratamentos, principalmente no que diz respeito a infecções bacterianas. Embora seu uso não seja novidade, a sua utilização sempre foi baseada em princípios empíricos sem bases científicas concretas.

Ele é produzido a partir do néctar e outras exsudações naturais das plantas que são coletadas, processadas e armazenadas pelas abelhas. Seu aroma, paladar, coloração, viscosidade e propriedades medicinais serão variáveis, e vão depender de fontes florais, espécie da abelha e condições ambientais. As abelhas produzem o mel aproveitando o clima e onde a florada é maior, o que favorece a coleta do néctar e pólen das flores, podendo ser monofloral, quando o néctar é coletado de uma única espécie vegetal, ou polifloral, se mais de

uma espécie de planta contribui com o néctar, nesse caso recebe o nome de mel silvestre. (CAMARGO, 2001; MOREIRA, 2001; ALVES, 2005).

O potencial antimicrobiano do mel foi informado primeiramente à cerca de um século atrás, entretanto só recentemente este conhecimento tem sido colocado em uma base rigorosa de avaliação científica (DIXON, 2003).

Cooper et al. (1999), realizaram um estudo em que incluíram feridas infectadas, onde os principais focos da pesquisa eram estender o limitado conhecimento atual da suscetibilidade de patógenos de feridas frente ao mel, além de determinar sua eficácia contra organismos resistentes, e explorar seu modo de ação. Os autores isolaram 18 cepas de feridas infectadas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticillina (MRSA) e sete amostras de *Enterococcus faecalis* sensíveis à vancomicina. Todos provaram ser sensíveis *in vitro* para os dois produtos selecionados, o mel de manuka e o mel silvestre.

Atualmente é reconhecido que a maioria dos méis tem comprovada atividade antibacteriana, e que ela é dependente de uma variedade de fatores. Os conhecidos incluem a osmose, acidez, a disponibilidade limitada de moléculas de água, geração de peróxido de hidrogênio e presença de moléculas antimicrobianas como flavonóides e ácidos fenólicos (MOLAN,1992).

Nos últimos anos, tem ocorrido um aumento dos grupos que se dedicam à pesquisa da atividade antibacteriana do mel, o que tem propiciado a publicação de vários artigos sobre esta atividade comprovando sua eficácia. Isso também levou a criação de empresas interessadas que se dedicam exclusivamente a comercialização de mel com alta atividade antimicrobiana e, que têm financiado muitas das pesquisas feitas nessa área, especialmente relacionadas com testes clínicos.

A Amazônia dispõe de uma grande biodiversidade de produtos naturais ainda inexplorados quanto ao seu potencial biotecnológico. Conhecer o potencial antimicrobiano do mel de Meliponíneos da região pode representar uma alternativa atraente e de baixo custo para o tratamento de infecções causadas por bactérias, podendo ainda alavancar a cadeia produtiva de produtos de Meliponídeos da região.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Composição do mel

O mel é composto por aproximadamente 80% de açúcar, incluindo as quatro moléculas de açúcares principais (frutose, glicose, maltose e sacarose), sendo a frutose a mais abundante, e muitas outras em menores quantidades (OLAITAN et al., 2007).

A água é o segundo componente mais importante do mel. Seu conteúdo depende de diferentes fatores ambientais durante a produção, temperatura, espécie da abelha, umidade nas colméias e condições do néctar. No caso de méis comercializados, o conteúdo de água, vai depender do tratamento durante a extração, armazenamento e comercialização (OLAITAN et al., 2007).

Ácidos orgânicos constituem uma pequena fração do mel. Eles são responsáveis pela sua acidez e sabor. Os principais ácidos encontrados são: ácido glicônico, acético, butírico, láctico, fórmico, succínico, pirúvico, maléico, vínico e piroglutâmico. Assim como os outros componentes do mel, os ácidos orgânicos vão variar, de acordo com as fontes florais das abelhas produtoras, época do ano e condições de armazenamento. Ainda em menores quantidades encontram-se os minerais, sendo o mais abundante deles é o potássio. Outros são cálcios, ferro, cobre, manganês e fósforo (CONTI et al., 2007).

O mel contém várias enzimas, algumas originárias da abelha, outras das fontes florais. Elas são muito importantes no processo de maturação do mel. As mais comumente encontradas no mel são: invertase, diastase, glicose oxidase, catalase e fosfatase ácida (VORLOVÁ E CELECHOVSKÁ, 2002; BOGDANOV, 1997).

Uma variedade de vitaminas, aminoácidos essenciais e não essenciais são encontrados no mel. Dentre as vitaminas são encontradas vitaminas C, B (tiaminas) e complexo B12 (riboflavina), ácido nicotínico e ácido pantotênico (complexo B5) (HAYDAK et al., 1942). Entre os aminoácidos encontrados, a prolina é o aminoácido mais abundante (CONTI et al., 2007).

2.2 Fatores que promovem a atividade antibacteriana do mel

2.2.1 A osmose

Os microrganismos retiram da água a maioria de seus nutrientes solúveis, necessitando dela para o seu crescimento, além de que o seu conteúdo celular é composto por aproximadamente 80 a 90% de água. Quando a bactéria encontra-se em um ambiente aquoso em que existe uma concentração de solutos superior aquelas encontradas no interior da célula (hipertônica), ocorrerá à passagem da água de dentro da célula para o meio com alta concentração de solutos pelo processo físico químico conhecido como osmose. A importância disso está na inibição do crescimento da bactéria, visto que a membrana se separa da parede celular, e as reações enzimáticas ficam comprometidas (TORTORA et al., 2005).

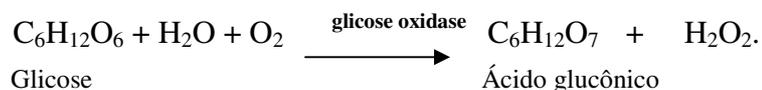
O mel é uma solução supersaturada de açúcares, com baixo conteúdo de água, e as ligações das moléculas de água com as de açúcares os fazem indisponíveis para os microrganismos. A disponibilidade de água livre do mel é expressa como atividade de água (A_w) – que é a relação entre o teor de água não ligada ou disponível. É um número adimensional, resultado da pressão de vapor de água do produto pela pressão de vapor da água pura, à mesma temperatura. Varia numericamente de 0 a 1 e é proporcional à umidade relativa de equilíbrio, a água pura tem A_w de 1.00 e o sangue de 0.99. A maioria dos méis possui um A_w de 0.66, e muitas espécies microbianas requerem A_w entre 0.94 e 0.99 para crescer (MOLAN, 1992).

2.2.2 Produção de peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio também conhecido como água oxigenada, é um poderoso antibacteriano. É um composto muito reativo, pois contém o ânion peróxido O_2^{-2} , que é tóxico para as células. A instabilidade deste composto faz com que sejam retirados elétrons das moléculas vizinhas, produzindo assim um efeito de remoção de elétrons em cascata. A atividade antibacteriana exercida por este composto se dá pela oxidação dos componentes bacterianos, agindo principalmente desestabilizando a parede celular (TORTORA et al., 2005).

No mel o peróxido de hidrogênio é produzido pela ação da enzima glicose-oxidase, que é secretada no mel pela glândula hipofaríngea das abelhas durante a coleta do néctar e processamento do mel na colméia (WHITE et al., 1963). Essa glândula é encontrada em todos os himenópteros e são considerados exclusivos desta ordem (LANDIM, 2009). Essa

enzima catalisa a reação na presença de oxigênio, de conversão da glicose em ácido glicônico e pequenas quantidades de peróxido de hidrogênio, são produzidas de acordo com a reação:



No mel amadurecido essa enzima é pouco ativa. Porém quando mel é diluído a enzima aumenta sua atividade, e o peróxido de hidrogênio é liberado lentamente em pequenas quantidades, mas suficientes para agir contra as bactérias (WHITE et al., 1963).

2.2.3 Acidez

O pH do mel varia entre 3,4 a 6,1. Essa acidez ajuda a restringir o crescimento de muitos microrganismos patogênicos ao homem, pois muitos são adaptados para o crescimento em pH fisiológico. No mel misturas complexas de ácidos, em particular o ácido glucônico, contribuem para a sua baixa acidez (MENDES e COELHO, 1983).

2.2.4 Componentes fitoquímicos

A constatação de atividades antibacterianas não-peróxidas no mel tem chamado a atenção para a existência de compostos fitoquímicos derivados de plantas no mel. Os principais componentes fitoquímicos encontrados no mel são os ácidos fenólicos e os flavonóides, também conhecidos pela sua alta atividade antibacteriana (CUSHNIE e LAMB, 2005).

Acreditava-se que os flavonóides existentes no mel teriam origem do néctar das flores, porém estudo realizado para determinar a origem fenólica do mel mostrou que os mesmos componentes fenólicos encontrados no mel, eram encontrados na própolis (AMIOT et al., 1989), e que seriam transferidos para o mel por contato do mel com a própolis.

Além da comprovada atividade antibacteriana, os flavonóides são poderosos antioxidantes com incrível poder de seqüestrar radicais livres no organismo, devido as suas numerosas hidroxilas (AL-MAMARY et al., 2002; CUSHNIE e LAMB, 2005).

2.3 Testes de inibição do crescimento bacteriano *in vitro*

Muitos estudos científicos que mostram as atividades antibacterianas do mel têm sido publicados, e um número extenso de bactérias patogênicas tem se mostrado sensíveis a experimentos com mel (LUSBY et al., 2005).

A atividade antibacteriana do mel frente a bactérias isoladas de infecções foi investigada nos Emirados Árabes Unidos (AL-WAILLI et al., 2005), na Turquia onde foi testado contra isolados clínicos de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (SELÇUK e NEVIN, 2000), na Índia contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de úlceras diabéticas, feridas e infecção de ouvido (MULLAI e MENOM, 2005), e contra espécies patogênicas isoladas na Nova Zelândia (ALLEN e MOLAN, 1997). Esses trabalhos mostram que o mel tem uma alta atividade bactericida e/ou bacteriostática.

Também têm sido demonstrados que bactérias sensíveis e resistentes a antibióticos são igualmente sensíveis ao mel com comprovada atividade antibacteriana. Um estudo com mel brasileiro também demonstrou isso, comparando a atividade do mel da abelha sem ferrão *Nannotrigona testaceicornes* contra a atividade de antibióticos mais conhecidos disponíveis para a medicina, os resultados mostraram que o mel teve atividade contra bactérias resistentes a alguns antibióticos testados, mostrando o excelente potencial terapêutico desse mel (GONÇALVES et al., 2005).

Relatórios prévios sugeriram que a ação antibacteriana do mel seja completamente atribuível ao seu alto conteúdo de açúcar.

Cooper e seus colaboradores (1999 e 2002) investigaram esta hipótese comparando a ação de dois méis, um de florada predominante de Manuka e outro mel silvestre, ambos originários da Nova Zelândia, com o de um mel artificial, que consistiu em uma solução dos quatro açúcares predominantes no mel (maltose, frutose, glicose, e sacarose) nas proporções nas quais eles acontecem no produto natural. Os resultados mostraram que, a 30% (v/v) do mel artificial incorporado em ágar nutriente não preveniu o crescimento de 18 amostras de *Staphylococcus aureus* multiresistente a metilina (MRSA), considerando que o mel de manuka e o mel silvestre pelo menos 10 vezes mais diluídos inibiram o crescimento desse microrganismo.

Estes resultados indicam que a ação dos dois méis não era exclusivamente devida à osmose (como vários autores afirmaram anteriormente). Substâncias fitoquímicas adicionais podem ser responsáveis, assim como a geração de peróxido de hidrogênio pela glicose oxidase das abelhas. Os trabalhos de Cooper e seus colaboradores (1999 e 2002) apontam para uma real possibilidade de usar o mel para descontaminar feridas colonizadas por bactérias resistentes a antibióticos.

Essa conclusão foi reforçada por estudos utilizando ensaios de inibição, em que foi adotado o mel diluído em água destilada a diferentes concentrações, e verificou-se que mesmo diluído o mel mantinha a inibição bacteriana. Portanto ficou claro que a osmose não é o único fator de inibição do crescimento bacteriano (BADAWY et al., 2004; AGBAJE et al., 2006; BASUALDO et al., 2007).

Muitos experimentos foram realizados para determinar quais fatores seriam os responsáveis pela atividade antibacteriana. O peróxido de hidrogênio por muito tempo recebeu o título de principal componente inibidor, porém experimentos têm contestado este título, quando começaram a incluir na solução diluída de mel a enzima catalase, que inibe a atividade do peróxido de hidrogênio. Os resultados demonstram que a atividade permanece, indicando que outros fatores não-peróxidos estão envolvidos na atividade antibacteriana (SNOW e MANLEY-HARRIS, 2004; CABRERA et al., 2006).

Com isso, a osmose e o peróxido de hidrogênio passaram a não ser mais considerados os principais fatores de inibição. A partir daí, esforços estão sendo concentrados para determinar os fatores não-peróxidos responsáveis pela atividade antibacteriana do mel, entre eles os mais intensamente estudados são os componentes fitoquímicos, como ácidos fenólicos e flavonóides, que têm como fonte natural as plantas.

Dentre as muitas técnicas de química analítica empregadas para a identificação dos componentes fenólicos, a mais utilizada para a identificação e isolamento de flavonóides no mel é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). No início esta técnica foi empregada para isolar flavonóides, com intuito de identificar a origem botânica do mel, visto que muitos destes compostos são específicos de determinadas espécies de plantas (ANKLAM, 1998; TOMÁS-BARBERÁN et al., 2001).

Logo a técnica foi adotada nos estudos de méis com comprovada atividade antibacteriana, como no estudo do mel de Manuka da Nova Zelândia, onde se verificou que o metil seringato, um ácido fenólico, constitui aproximadamente 70% dos componentes fenólicos deste mel. Quase todos os componentes fenólicos isolados deste mel tiveram atividade antibacteriana, porém foram responsáveis somente por uma leve inibição do crescimento,

levando a conclusão de que esses compostos não são os principais inibidores do crescimento bacteriano no mel de Manuka, apenas contribuem para esta atividade (WESTON et al., 1999; 2000).

Não só às bactérias tem sido atribuído o efeito inibitório do mel, mas também em fungos e protozoários. Foi identificado efeito inibitório do mel em infecções com *Candida albicans* na África do Sul (THEUNISSEN et al., 2001) e contra o desenvolvimento de parasitas da *Leishmania in vitro* (NILFOROUSHZADEH et al., 2007).

2.4 Avaliação do potencial antibacteriano e cicatrizante do mel na medicina

Muitas evidências clínicas têm sido publicadas, apoiando o uso do mel no tratamento de feridas infeccionadas por bactérias resistentes, promovendo a saudável cicatrização do tecido lesionado (ARMON et al., 1980).

Um importante fator que contribui para a cicatrização é o efeito antiinflamatório do mel, atribuído ao seu poderoso efeito antioxidante (AL-MAMARY et al., 2002).

Os radicais de oxigênio livre ou radicais superóxidos (O_2^-), são produzidos em pequenas quantidades durante a respiração. Esses radicais apresentam um alto grau de toxicidade para os componentes celulares devido à sua grande instabilidade. Quando a defesa do corpo de um indivíduo é baixa, a superprodução de radicais de oxigênio pode resultar em inflamações e feridas crônicas, tornando-as mais susceptíveis a infecção por bactérias (TORTORA et al., 2005).

O tratamento de feridas crônicas com mel elimina as bactérias, reduz a inflamação e estimula a cura, porque o mel pode neutralizar os radicais de oxigênio livres, já que contém componentes fenólicos que são poderosos antioxidantes (COOPER et al., 2001; VISAVADIA et al., 2006).

Outros três fatores contribuem para a cicatrização das feridas, uma delas é a remoção do tecido morto. O acúmulo de tecido morto retarda a produção de tecido novo necessário para o processo de cicatrização das feridas. A alta concentração de açúcar do mel atrai a água de tecidos próximos, para o local da ferida e isso ajuda na remoção de tecido morto (EFEM, 1998).

Também contribuindo para esse processo está o estímulo à migração de fibroblastos. Esse composto é muito importante, pois estimula a produção de colágeno que enche a cavidade da ferida (EFEM, 1998). E como mencionado anteriormente, alguns méis possui altos níveis de prolina, que é um aminoácido essencial presente no colágeno (CONTI et al., 2007).

Não somente contra infecções cutâneas o mel tem sido empregado, HAFFEJEE e MOOSA (1985), adotaram o mel em substituição à glicose na solução oral de reidratação no tratamento de crianças com gastroenterite bacteriana. Os resultados mostraram que o mel diminui a duração da diarreia bacteriana e, pode ser usado com segurança como um substituto da glicose dentro da solução de reidratação com eletrólitos.

Uma das observações mais interessantes é do uso clínico do mel na eliminação de *Staphylococcus aureus* multiresistentes a antibióticos (MRSA) envolvidos na infecção de feridas crônicas (CHAMBERS, 2006 ; VISAVADIA et al.,2006). Uma descrição clínica de um processo de cicatrização foi feita em um hospital do Reino Unido, o mel foi usado em um pé gangrenado de um diabético ameaçado de amputação. Os bons resultados tornaram este tratamento de primeira-linha em pelo menos uma unidade cirúrgica, ao invés de ser usado como último recurso (CHAMBERS, 2006).

Estas descobertas abriram muitas portas para a utilização do mel na medicina moderna. Em países como a Austrália e Nova Zelândia já é possível comprar mel e produtos a base de mel de alta atividade antibacteriana para esses fins. SIMON et al (2006), fizeram uso de um desses méis oriundo da empresa Medihoney no tratamento de feridas onde foram isoladas bactérias *Staphylococcus aureus* e *Enterococci*, ambas resistentes a antibióticos. Quando constatada a eficiência da ação do mel, as feridas levaram menos tempo para cicatrizar que o normal. No Reino Unido o mel de Manuka produzido na Nova Zelândia já ganhou estatus de droga desde 2004.

Apartir das pesquisas feitas, COOPER et al.,(2001), relatam que: “neste momento, todas estas pesquisas levaram à descoberta de alguns dos mecanismos e componentes do mel que o torna tão desejável para o tratamento de feridas, queimaduras e diarreias”.

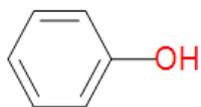
De fato, através da aplicação do mel em feridas, úlceras e queimaduras, hoje se sabe que o mel tem uma atividade antibacteriana, e também promove a rápida cicatrização de feridas crônicas que não respondem à terapia convencional. Este é o primeiro passo, no que se espera ser uma longa maratona, para aceitação deste produto na medicina moderna.

2.5 Flavonóides do mel: ocorrência, origem, importância e identificação.

2.5.1 Flavonóides

As plantas produzem uma grande variedade de produtos secundários que contêm um grupo fenol – uma hidroxila ligada a um anel aromático - na sua estrutura química (Figura 1). Estas substâncias recebem o nome de compostos fenólicos. Devido a sua grande

diversidade química, estes compostos apresentam uma variedade de funções nos vegetais, agindo na defesa contra herbívoros e patógenos, servindo como atrativo para polinizadores ou dispersores de sementes, na proteção contra a radiação ultravioleta e reduzindo o crescimento de plantas competidoras adjacentes (TAIZ e ZEIGER, 2005).



FUGURA 1. Fenol básico

Os compostos fenólicos são biossintetizados por duas rotas metabólicas diferentes: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico. A maioria dos fenóis vegetais é derivada da fenilalanina que é sintetizada pela rota do ácido chiquímico, através da eliminação enzimática de uma molécula de amônia. A rota do ácido malônico também é importante, pois fornece compostos precursores para a biossíntese dos flavonóides (Figura 2 A e B) (TAIZ e ZEIGER, 2005).

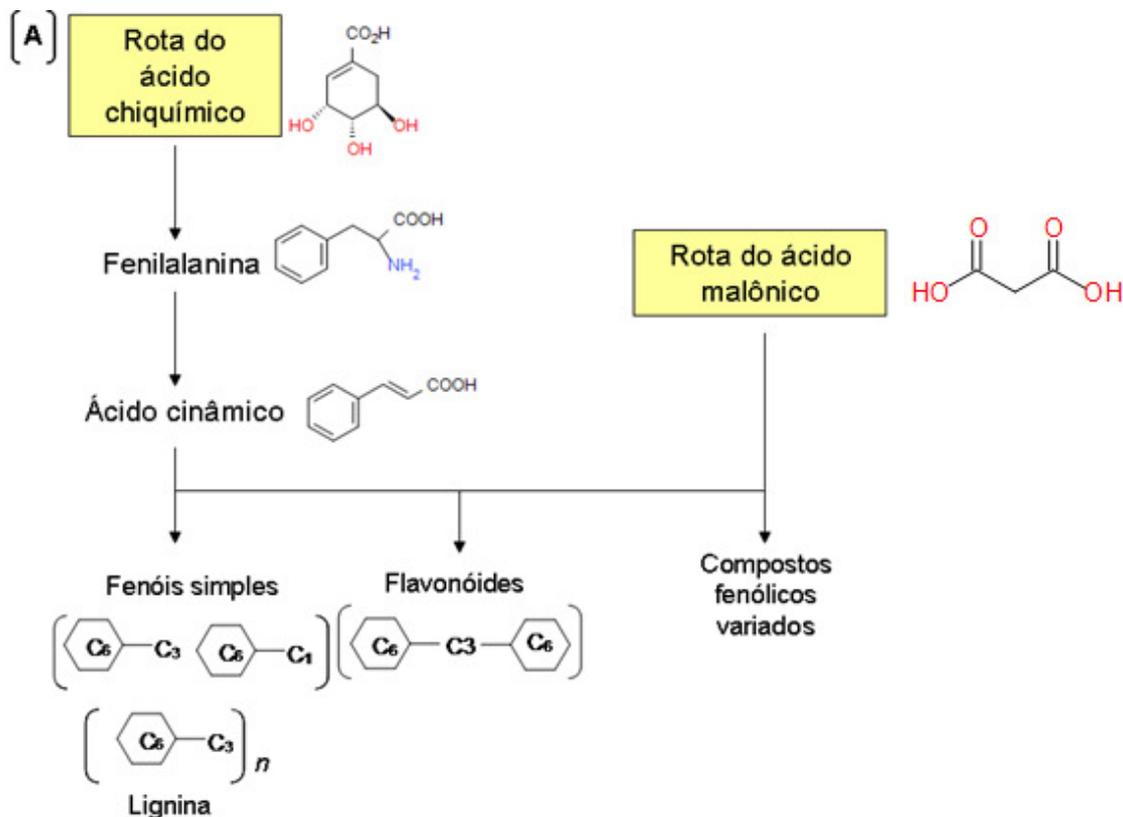


Figura 2A. A maioria dos compostos fenólicos deriva em parte da fenilalanina, um produto do ácido chiquímico, as fórmulas entre parênteses indicam o arranjo básico dos esqueletos de carbono.

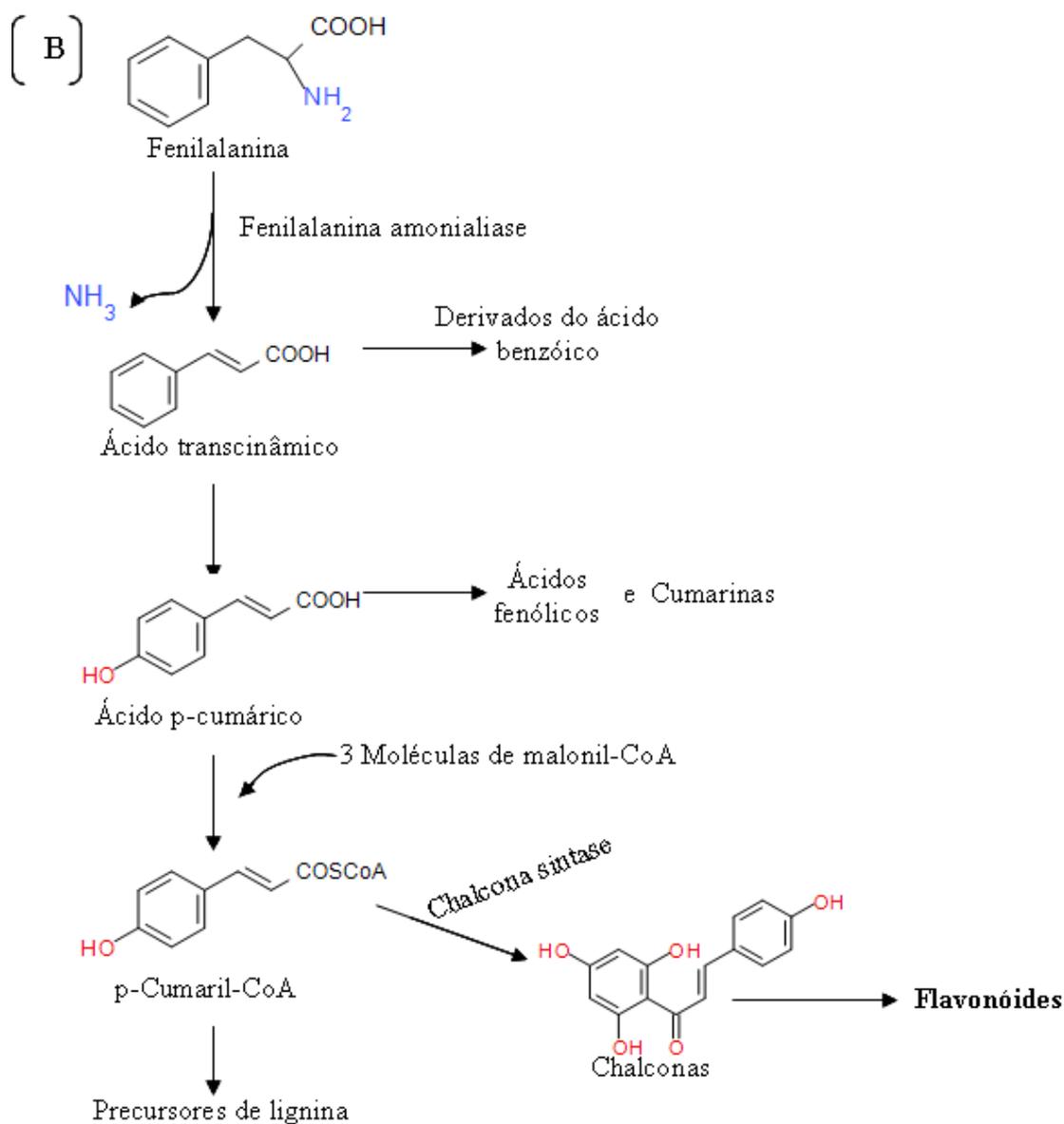


Figura 2B. Esquema da biossíntese de compostos fenólicos a partir da fenilalanina, indicando a junção de três moléculas de melonil-coA para a formação dos flavonóides.

Os flavonóides constituem a mais abundante classe de fenóis presentes entre os metabólitos secundários dos vegetais. Sua grande abundância e diversidade sugerem que seja importante para plantas superiores. São reconhecidos muitos flavonóides como pigmentos de flores na maioria das famílias de angiospermas. Estes compostos estão amplamente distribuídos em praticamente todas as partes das plantas, principalmente em células fotossintéticas (SHIRLEY, 1996).

A estrutura química dos flavonóides é baseada em um esqueleto de 15 carbonos, um anel aromático “A”, com um anel de pirano central “C” que sustenta um segundo anel

aromático “B” na posição 2, 3 ou 4. Esta estrutura é resultante das duas rotas de biossíntese de compostos fenólicos (Figura 3).

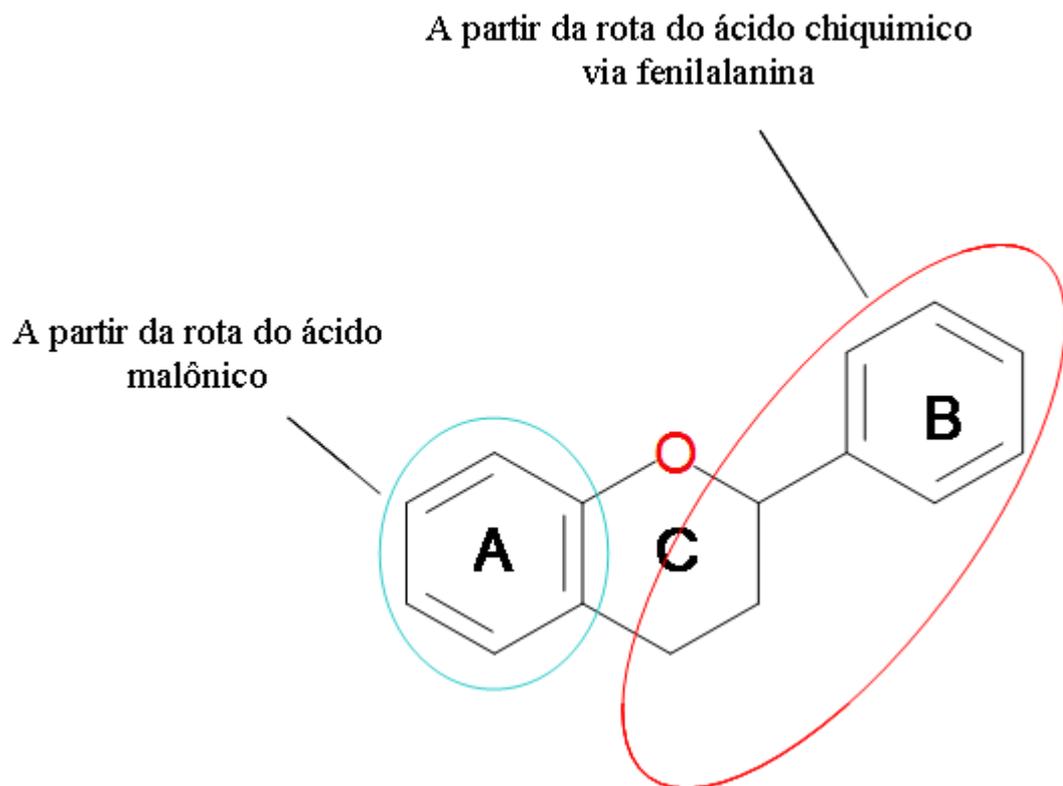
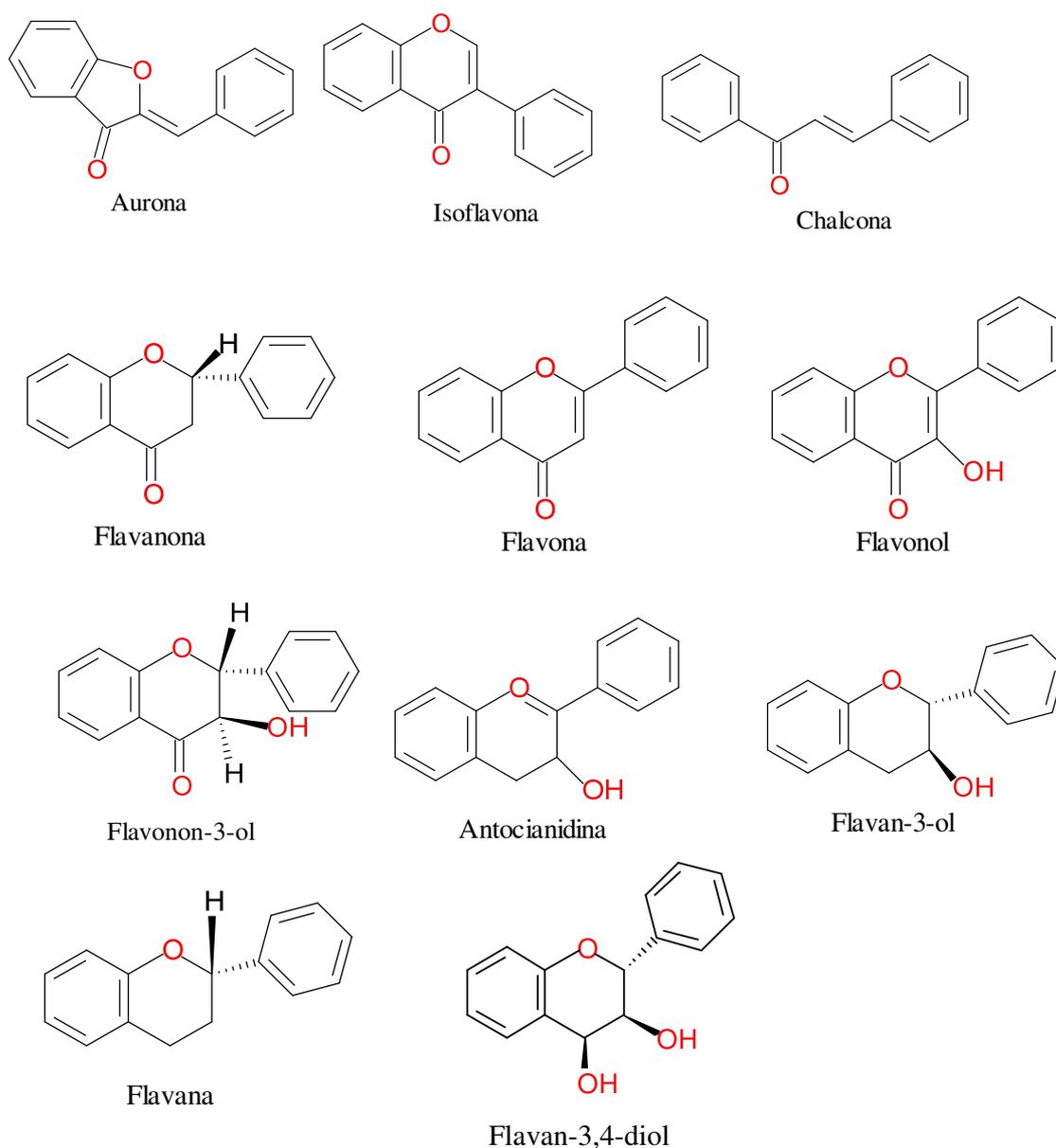


Figura 3. Estrutura fundamental dos flavonóides, que são biossintetizados a partir de produtos das rotas do ácido chiquímico e do ácido malônico.

São conhecidos mais de 4000 flavonóides. Os de origem natural apresentam-se freqüentemente oxigenados e na maioria dos casos suas moléculas encontram-se conjugadas com açúcares. Estes flavonóides "associados" a açúcares são chamados de conjugados, heterosídeos ou glicosilados (CUSHNIE e LAMB, 2005). A partir desta estrutura básica podem ocorrer outras modificações produzindo, dessa forma, outras classes dessas substâncias (Figura 4).



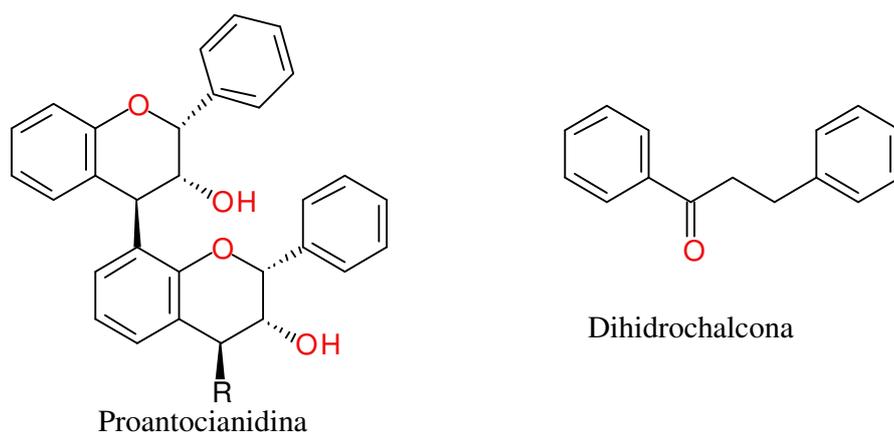


Figura 4. Estrutura de algumas classes de flavonóides.

Fonte: CUSHNIE e LAMB (2005).

2.5.2 Propriedades medicinais dos flavonóides

Uma das razões para o interesse crescente dos flavonóides para a medicina, é que a indústria farmacêutica sempre está em busca de novas espécies vegetais com propriedades bioativas para a medicina, durante tais procedimentos muitos flavonóides novos foram descritos, possuindo propriedades farmacológicas interessantes. Atualmente os flavonóides estão se tornando moléculas de grande importância na pesquisa médica. Para um grupo de componentes de estrutura relativamente homogênea, os flavonóides exibem um grande número de atividades biológicas. São componentes de muitos medicamentos naturais e estão presentes em mais de 100 preparações comercializadas na Suíça e França. A própolis, presente na cera de abelha, contém um grande número de flavonóides e é usada em medicamentos e cosméticos. As preparações com rutina e diosmina são comumente usadas para aumento do tônus vascular. As antocianinas de *Vaccinium spp.* e *Ribes spp.* (uva do monte e groselha negra, respectivamente) são usadas na resistência capilar (PETERSON et al., 1998).

Os flavonóides são muito estudados devido as suas inúmeras atividades biológicas, como por exemplo: atividade antioxidante, antimutagênica, antimicrobiana, ação antiinflamatória e antialérgica (ZUANAZZI, 2000).

A atividade antioxidante exibida pelos flavonóides está relacionada à sua estrutura e ao número de substituintes hidroxilas. Quanto mais hidroxilas, maior será a sua atividade (CAO, SOFIC, PRIOR, 1997). Em estudo realizado com extrato de *Ginkgo biloba* e derivados do vinho tinto ficou constatado que as propriedades antioxidantes dos flavonóides presentes

foram capazes de proteger as células do hipocampo contra os efeitos tóxicos de peptídios e estresse oxidativo (BASTIANETTO e QUIRON, 2001).

Existe um grande número de estudos sobre o efeito antimutagênico dos flavonóides. A quercetina é um dos compostos mais estudados. Entretanto, estudos com outros flavonóides, presente nos frutos de *Citrus spp.*, demonstram uma efetiva inibição no crescimento de células cancerígenas (CHEN et al., 1985; DEPYPERE et al., 2000; IWASE et al., 2001).

A tangeretina encontrada em cascas de frutas cítricas induz os leucócitos à inibição parcial do desenvolvimento de HL-60, células causadoras da leucemia (HIRANO, ABE, OKA, 1995). Esses compostos atuam na prevenção do câncer, uma vez que interagem com radicais livres que, quando em excesso, possuem ação tóxica e contribuem para a carcinogênese (IWASE et al., 2001).

Foram encontrados também flavonóides fitoestrógenos (daidzeína, genisteína, gliciteína) em plantas, como a soja. Esses são compostos com atividade análoga ao estrogênio, hormônio esteróide que apresenta importante função no sistema reprodutor feminino e também influenciam no crescimento, diferenciação e função de muitas células alvo (PETERSON et al., 1998). Isoladas do chá preto, as catecolaminas foram testadas quanto ao seu efeito contra a morte por isquemia de coração. Observou-se que o consumo de 7,5 mg reduziu em 20% o risco da mortalidade por essa doença (ARTS et al., 2001).

2.5.3 Atividade antibacteriana dos flavonóides

A atividade antibacteriana de flavonóides cada vez mais vem sendo descrita. Extratos de plantas com histórico de uso na medicina popular foram analisados *in vitro* para verificar atividade antibacteriana por muitos grupos de pesquisa. Como os extratos de plantas das espécies *Hypericum* (DALL et al., 2003), *Capsella* e *Chromolaena* (EL-ABYAD et al., 1990), estes foram descritos por possuir atividade antibacteriana. Muitas outras preparações fitoquímicas com altas concentrações de flavonóides são relatadas por exibir atividade antibacteriana.

A própolis também foi pesquisada em muitas ocasiões, e são freqüentemente informadas amostras que contêm altas concentrações de flavonóides com atividade antibacteriana. Grange e Davey (1990) testaram o extrato de própolis contra os bacilos da tuberculose humana, onde confirmaram a atividade antibacteriana da própolis, e atribuíram essa atividade as suas altas concentrações de flavonóides.

Essa atividade deve-se, provavelmente, à capacidade dos flavonóides de formar complexos com proteínas solúveis e com a parede celular das bactérias (CUSHNIE e LAMB 2005).

2.5.4 Flavonóides no mel

O mel é usado como um alimento desde os tempos mais remotos. Porém, só nos anos mais recentes se tem evidência de sua capacidade antioxidante e antibacteriana. O mel também foi usado como um conservante para alimentos, prevenindo-os das reações deteriorativas de oxidação. Acreditava-se que os flavonóides existentes no mel teriam origem do néctar das flores, porém estudo realizado para determinar a origem fenólica do mel mostrou que os mesmos componentes fenólicos encontrados no mel, eram encontrados na própolis, entretanto outras fontes florais podem contribuir para a presença de flavonóides do mel como o pólen e o néctar das plantas (AMIOT et al., 1989; WESTON, 2000).

2.5.5 Determinação cromatográfica do perfil fenólico de mel

A necessidade de saber os perfis e identificar combinações fenólicas individuais do mel requer a substituição de métodos tradicionais por técnicas que promovam a separação de compostos contidos em misturas complexas. A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE (HPLC - *High-performance liquid chromatography*) é sem dúvida a técnica analítica mais útil para separar e caracterizar componentes fenólicos do mel, entretanto a cromatografia de gás e eletroforese capilar também são adotadas em alguns estudos.

A Cromatografia Líquida de Alto Eficiência (CLAE) se desenvolveu muito nos últimos anos, recebendo o nome de cromatografia líquida por que a sua fase móvel é um líquido. Os componentes básicos de um cromatógrafo líquido são: bomba, coluna cromatográfica, injetor, detector e o registrador. É um método utilizado basicamente para separação de espécies iônicas, não voláteis ou macromoléculas (COLLINS et al., 1995).

A fase móvel da CLAE deve ser um solvente que respeite algumas características específicas. Essa fase deve ter um alto grau de pureza ou ser de fácil purificação, pois algumas impurezas podem interferir na detecção pelo ultravioleta (UV). Ela deve dissolver a amostra sem qualquer reação química entre ambas. A fase móvel deve ser compatível com o detector empregado e, também possuir polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra. Embora existam vários solventes três deles são mais utilizados: água, metanol e acetonitrila (COLLINS et al., 1995).

Como fase estacionária utiliza-se sólidos ou líquidos aderidos em suporte sólido, cujas partículas porosas, esféricas ou irregulares apresentam diferentes diâmetros e suportam pressão de até 345 atm. As colunas geralmente utilizadas são: octadecil (ODS), octil (C8), CN (cianopropil) e NH₂ (amina). Quanto aos detectores os mais utilizados são os fotométricos, entre eles os que absorvem na faixa do ultravioleta e visível (CIOLA, 1998).

O método de CLAE amplamente usado na análise de compostos fenólicos em mel é o de fase reversa. Neste caso a fase estacionária possui característica não-polar (coluna C18) e a fase móvel é um solvente polar (WESTON et al., 2000).

Devido à complexidade das misturas contendo compostos fenólicos, a maioria dos estudos envolvendo cromatografia já publicada descreve o uso de mais de uma fase móvel na forma de gradiente. Várias fases móveis podem ser usadas, mas os mais comuns são sistemas binários que incluem um componente aquoso e um solvente orgânico menos polar. FERRERES et al., (1994), por exemplo, utiliza cromatografia de fase reversa de gradiente de eluentes com uma solução aquosa de ácido fórmico e metanol como solventes.

Com respeito ao detector UV-Vis empregado em CLAE, os comprimentos de onda mais freqüentes usados são de 290 e 340nm (FERRERES et al., 1994). Pelo fato de alguns compostos fenólicos apresentarem vários máximos de absorção, o uso de detector com UV múltiplo simultâneo (*photodiode array*) é recomendado para propósitos de identificação, e também porque este detector oferece cromatogramas em qualquer comprimento de onda acompanhado pelo espectro de absorção de cada fração separada (GÓMEZ-CARAVACA et al., 2006). Deste modo o espectro de absorção pode ser combinado com parâmetros de retenção para a possível identificação de uma combinação desconhecida.

A 290 nm é conhecido que todas as combinações polifenólicas absorvem, mas, no entanto, alguns estudos recomendam usar comprimentos de onda diferentes para alcançar sensibilidade máxima, e também, se possível, uma seletividade satisfatória que depende das combinações polifenólicas contida no mel em questão (FERRERES et al., 1994, WESTON et al., 2000).

Polifenóis são normalmente identificados comparando tempos de retenção na coluna, obtidos a partir dos cromatogramas e espectros de UV. Espectrometria de RMN é usado freqüentemente também como uma técnica complementar à cromatografia para desvendar a estrutura destes compostos (GÓMEZ-CARAVACA et al., 2006).

Apesar de existirem mais de 4000 flavonóides diferentes na natureza, o presente estudo se focará em apenas três estruturas: apigenina, uma flavona; pinocembrina, uma flavonona; e a rutina um flavonol (Figura 4), que podem ser adquiridos comercialmente para

uso como padrões em CLAE. A escolha recaiu especificamente sobre esses flavonóides devido a sua grande atividade biológica.

Em um estudo foi verificado que a flavona apigenina tem uma ação antibacteriana inibindo o crescimento de 15 amostras de *S.aureus* MRSA (SATO et al., 2000). A pinocembrina é um poderoso antioxidante e tem reconhecida atividade antibacteriana também inibindo a propagação de *S.aureus*, muito encontrado no mel e na própolis (FUKUI et al., 1988; HOUGHTON et al., 1994). Entre as importâncias terapêuticas da rutina, está a melhora nos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados com doenças hemorrágicas ou de hipertensão, além de uma boa ação antioxidante (PATHAK et al., 1991)

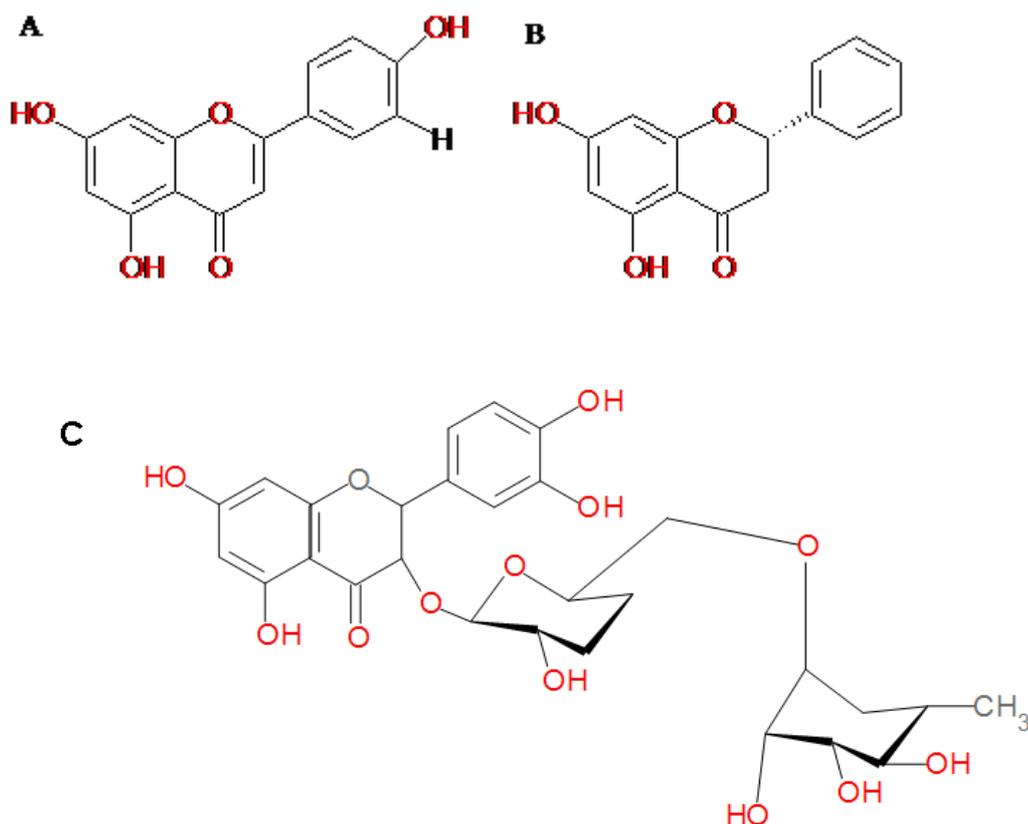


Figura 5. A-apigenina, B-pinocembrina, C-rutina

Fonte: USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, 2003.

3 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antibacteriana de méis produzidos por espécies de abelhas sem ferrão cultivadas na cidade de Manaus que produzem um mel silvestre, determinando sua composição de flavonóides por meios cromatográficos.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o efeito antibacteriano frente a seis cepas bacterianas patogênicas ao homem;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (MIC) e a Concentração Mínima Bactericida (CMB) do mel em teste;
- Identificar os flavonóides apigenina, pinocembrina e rutina, nos méis estudados;
- Comparar a atividade antibacteriana e os flavonóides do mel das abelhas sem ferrão, com méis comerciais;
- Verificar a diferença de atividade e presença de compostos fenólicos nos mel das abelhas indígenas sem ferrão coletados em estações do ano diferentes.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Origem e coleta do mel

As amostras de mel de abelhas sem ferrão utilizadas neste estudo foram fornecidas pelo Grupo de Pesquisas em Abelhas-GPA do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, provenientes do meliponário do campus INPA/GPA, das espécies *Melipona compressipes manaosenses* e *Melipona seminigra* (Apidae, Meliponinae). Foram realizadas duas coletas do mel, uma no mês de março de 2009, no período chuvoso considerado de baixa produção de mel dessas abelhas, e outra no mês de outubro de 2009, no verão período de maior produção de mel por essas espécies de abelhas.

Essas espécies armazenam seu mel em compartimentos chamados de potes em suas colméias (Figura 6), e por esse motivo foi utilizada uma seringa de 20 mL, adaptada com um tubo estéril para fazer a retirada desse mel, esse procedimento foi realizado e supervisionado por técnicos do GPA.



Fonte GPA/INPA.

Figura 6. Potes de mel na colméia

O mel retirado era imediatamente acondicionado em um recipiente de vidro de cor âmbar estéril, para evitar a possível fotodegradação de alguns compostos do mel, sendo então identificado e logo depois guardado em geladeira para evitar uma possível fermentação (Figura 7).

Três méis comerciais foram incluídos nesse estudo, um do Rio Grande do Sul, outro do Ceará produzido por abelhas do gênero *Apis*, e outro comercializado por

comunitários da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Tupé (RDS Tupé) localizado na zona rural de Manaus a margem esquerda do Rio Negro, produzido pela abelha sem ferrão popularmente conhecida como Jandaíra (*Melipona subnitida*) (Apidae, Meliponinae). Todas as amostras utilizadas neste estudo estão organizadas na Tabela 1.

Tabela 1. Amostras de mel utilizadas no estudo

Espécie de abelha	Amostras de mel		
	Data da coleta	Local de coleta	N. registro
<i>Melipona compressipes manaosensis</i>	10.03.2009	Campos do INPA	1C
<i>Melipona seminigra</i>	10.03.2009	Campos do INPA	2C
Gênero Apis	Julho	Comercial – RS	IE
<i>Melipona compressipes manaoensis</i>	24.11.2009	Campos do INPA	1C-2
<i>Melipona seminigra</i>	24.11.2009	Campos do INPA	2C-2
<i>Melipona subnitida</i>	28.11.2009	Reserva Biotupé	5J
Gênero Apis	Outubro	Comercial – CE	6MC

Uma alíquota de 100 mL de cada material foi retirada e usada nos testes antibacterianos, a outra parte (300 mL) foi utilizada nos ensaios cromatográficos.



Figura 7. Amostras de mel armazenadas em vidro de cor âmbar e geladeira.

5.2 Microrganismo

As cepas bacterianas utilizadas nesse estudo foram: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (0157:H7), *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei*, *Salmonella paratyphi*, *Klebsiella sp.* fornecidas pelo Laboratório de Virologia Tropical do INPA.

5.3 Determinação da atividade antimicrobiana pelo método da difusão (cavidade - placa)

Os testes antibacterianos de cada mel foram realizados no Laboratório de Virologia Tropical do INPA.

5.3.1 Preparo das placas

Foram preparadas placas de petri com meio sólido ágar Muller-Hinton seguindo as instruções do fabricante. Aproximadamente 5 mL do meio era vertido em cada placa bacteriológica de 65 mm, em ambiente asséptico. Após a solidificação do meio, as placas eram vedadas utilizando plástico tipo filme, e armazenadas em geladeira para posterior utilização.

5.3.2 Construção da escala nefelométrica de Mcfarland para o controle de turbidez na preparação do inóculo

Para padronizar a densidade do inóculo para um teste de sensibilidade, foi usado um controle de turbidez de BaSO₄, equivalente a uma solução padrão de McFarland. Para isso uma escala de Mcfarland foi construída da seguinte maneira: Preparou-se uma solução a 1% (p/v) de cloreto de bário (BaCl₂) e outra a 1% (v/v) de ácido sulfúrico (H₂SO₄) em água destilada.

Em seguida foram adicionados volumes de ácido sulfúrico e cloreto de bário de acordo com os volumes da tabela 2, em tubos estéreis com tampa em rosca com capacidade de 15-20 ml, os tubos eram selados hermeticamente e armazenados em local escuro, e sob refrigeração. Adiciona-se primeiro o ácido sulfúrico em todos os tubos e, em seguida, adiciona-se o cloreto de bário. A figura 8 mostra como ficou a escala construída.

Tabela 2. Escala nefelométrica de Mcfarland

Tubo	BaCl ₂ 1%(mL)	H ₂ SO ₄ 1% (mL)	Bactérias/mL
1A	0,01	9,99	3,0 x 10 ⁷
1B	0,03	9,97	1,0 x 10 ⁸
2	0,05	9,95	1,5 x 10 ⁸
3	0,10	9,90	3,0 x 10 ⁸
4	0,15	9,85	4,5 x 10 ⁸
5	0,20	9,80	6,0 x 10 ⁸
6	0,30	9,70	9,0 x 10 ⁸
7	0,40	9,60	1,2 x 10 ⁹



Figura 8. Escala de McFarland Construída

5.3.3 Preparo do inóculo de bactérias

As bactérias inóculo foram cultivadas em meio líquido caldo Muller-Hinton. A partir da cultura matriz utilizando uma alça de inoculação, foi retirada uma alçada e inoculada em volume de 3,0 mL de meio de cultura por tubo. Incubou-se a cultura a 37° C, até alcançar ou exceder a turbidez de uma solução padrão de McFarland equivalente ao tubo 1B da escala (que corresponde a 10^8 Unidades Formadoras de Colônias). Isso se fez comparando o tubo inóculo ao tubo 1B da escala, posicionando os tubos lado a lado em um fundo negro com tiras brancas conforme ilustrado na figura 9. Se a turbidez ultrapassa-se a escala, ela era ajustada adicionando caldo ou solução salina estéril até atingir a turbidez desejada (OPLUSTIL et al., 2004).

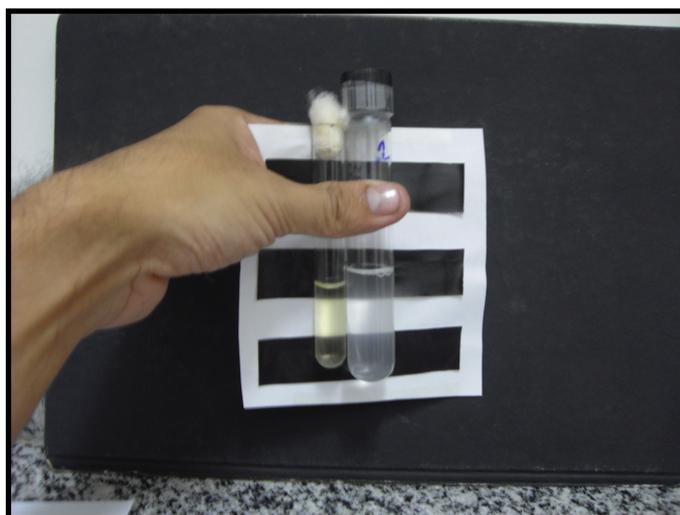


Figura 9. Padronização dos inóculos bacterianos pela escala de McFarland.

5.3.4 Preparo do ágar-inóculo para os testes de difusão em ágar.

O ágar-inóculo corresponde a um meio ágar Muller-Hinton preparado a 1%, onde ele foi fracionado em tubos no volume de 2,0 mL, para utilização no teste de atividade antibacteriana.

Para dispor igualmente as células bacterianas no meio de cultura foi utilizada a técnica pour-plate com sobre camada (*over agar*) adaptado do trabalho de Hernández et al., (2000). Essa técnica consiste em submeter o ágar-inóculo previamente preparado em banho-maria para liquefazer-se por completo. Em seguida coloca-se rapidamente o tubo contendo o meio de cultura em água a temperatura ambiente para esfriar o suficiente para não eliminar as células bacterianas e manter o ágar ainda líquido. Posteriormente eram adicionados 50 µl do inóculo de bactérias no referido ágar fundido, homogeneizando-se bem para que as células estivessem bem distribuídas no meio de cultura. Então essa solução era despejada sobre a placa de petri com ágar Muller-Hinton previamente preparada e após isso se aguardava a solidificação do meio.

A atividade antibacteriana das amostras de mel pelo método de difusão em ágar foi determinada conforme o descrito em Hernández et al., (2000), com algumas adaptações, onde foram feitos de 3 a 5 poços na placa previamente preparada. Em cada poço foram adicionados 30µl do mel a ser testado quanto ao efeito antibacteriano (mel puro e suas diferentes diluições, e água como controle negativo). Posteriormente as placas foram incubadas, sem inversão, à temperatura de 37°C por 24h, então se procedeu à leitura do diâmetro dos halos de inibição. Cada halo formado foi medido com auxílio de um paquímetro (CUNICO, 2004).

Esse experimento foi realizado em triplicata para as diferentes concentrações de cada mel testado.

5.4 Teste de Macrodiluição em caldo.

Da mesma forma que o método de difusão em ágar, foram utilizados inóculos bacterianos previamente padronizados de acordo com a escala de MacFarland, sendo sabido que tubo 1B da escala corresponde a 3×10^8 UFC/ml.

Em tubos de ensaio foram adicionadas as quantidades de mel e caldo necessárias para se obter as concentrações desejadas. Esses tubos receberam então 30µL do inóculo bacteriano padronizado. O controle positivo para o teste foi um tubo contendo o meio de cultivo mais o inóculo bacteriano padronizado, o negativo um tubo contendo o meio de cultivo mais o mel. A figura 10 ilustra a seqüência de procedimentos executados na macrodiluição em caldo.

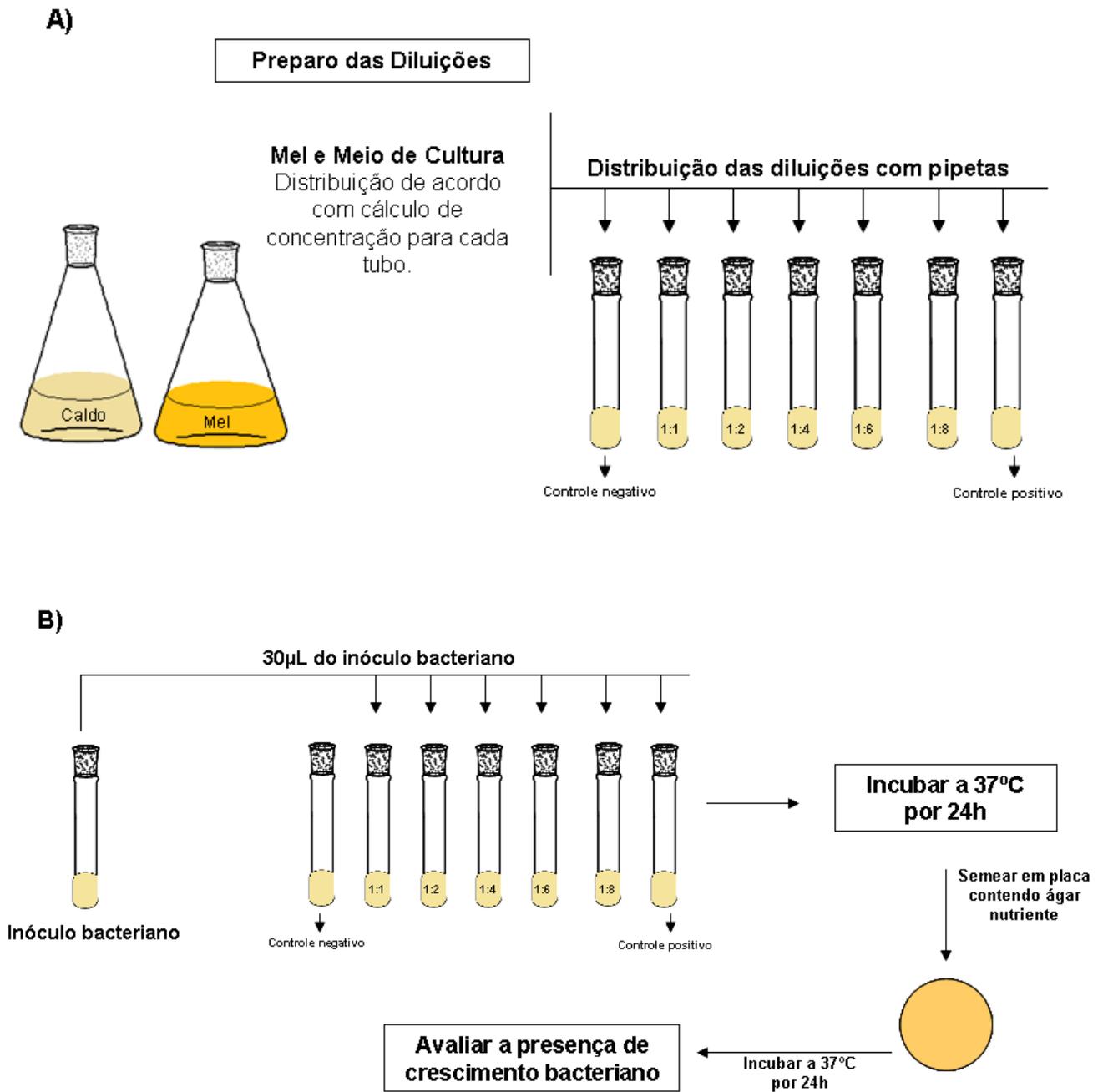


Figura 10. A) Distribuição das diluições nos tubos de ensaio, de acordo com o cálculo de concentração do mel para cada tubo. B) Inoculação com a cepa bacteriana padronizada, incubação e posterior avaliação do crescimento bacteriano.

5.4.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM é a mais baixa concentração do mel que inibe a multiplicação bacteriana visível, e foi feita observando o crescimento bacteriano nos tubos da macrodiluição em caldo pela leitura visual, onde se observava a turvação dos tubos (TAVARES, 2001). Em todos os tubos com exceção do controle positivo, a adição do mel causou turvação no meio,

dificultando a detecção de aumento da turvação a olho nú. Decidimos então partir para a detecção da concentração mínima bactericida (CMB), em todos os tubos.

5.4.2 Determinação da concentração mínima bactericida (CMB)

A CMB é a mais baixa concentração do mel capaz de matar uma população bacteriana. Foi determinada através dos tubos incubados para a determinação da concentração inibitória mínima, onde uma alíquota de (100 µL) de cada tubo foi inoculada em placas de petri com ágar nutriente sendo posteriormente incubadas em estufa a 37⁰ C por 24h. A CMB foi considerada a menor concentração do mel onde não houve crescimento celular sobre a superfície do ágar inoculado (99,9% de morte bacteriana) (TAVARES, 2001).

5.5 Preparação das amostras para cromatografia

5.5.1 Extração de compostos fenólicos do mel

A extração foi feita utilizando o método de extração líquido-líquido com Acetato de Etila conforme descrito por Wahdan (1998). Preparava-se uma solução a 20% de mel em água destilada. Em 50 mL dessa solução o pH era ajustado para 3,5 utilizando uma solução de HCl a 4 molar. Nos 50 mL da solução de mel foram adicionados 50 mL de acetato de etila e 1g de cloreto de sódio em um funil de separação. Esse sistema era agitado durante 5 min para a extração dos compostos fenólicos. Em seguida a fração de acetato de etila era retirada e armazenada em uma proveta, e outros 50 mL de acetato de etila eram acrescentados ao funil junto à solução de mel.

Os passos anteriores foram repetidos de modo que a solução de mel fosse extraída três vezes. Ao final da extração foram acumulados 150 mL do extrato do mel em acetato de etila que foi submetido à rota-evaporação em um sistema a vácuo, sob temperatura de 30⁰ C (figura 11), até se obter um concentrado de aproximadamente 10 mL, que posteriormente era armazenado em freezer a -18⁰ C.



Figura 11. Sistema de rota-evaporação a vácuo

5.5.2 Preparo das amostras para injeção em CLAE

Aproximadamente 2 mL de cada amostra concentrada era retirada e preparada para injeção em CLAE. Retirava-se a alíquota da amostra com o auxílio de uma seringa estéril de 5 mL de volume, em seguida um filtro com poro de 0,45µm de teflon era acoplado na seringa e

a amostra era filtrada e armazenada em um frasco estéreis de 2 mL. Logo após a amostra filtrada era preparada para injeção misturando 400µL da amostra em 600µL de metanol filtrado, em seguida a amostra era injetada.

5.5.3 Análise dos flavonóides do mel por CLAE

As análises por CLAE foram conduzidas em cromatógrafo a líquido da marca Varian – Prostar equipado com injetor automático, e utilizando uma coluna de fase reversa C-18 (150x4,6mmx1/4) (figura 12), em um sistema de gradiente/isocrático segundo descrito por Ferreres et al., (1994) com algumas modificações, que usa água (solvente A) e metanol (solvente B) como eluentes, em uma velocidade de fluxo de 1 mL/min. Começando com 30% de metanol permanecendo isocrático até 15min, estabelecendo então um gradiente para obter 40% de metanol até 20 min, 45% de metanol até 30 min, 60% de metanol até 50 min, e 80% de metanol até 52 min., e nesta concentração até 60 min. A detecção foi feita com um detector de UV/Vis, e os cromatogramas registrados nos comprimentos de ondas de 290 e 340 nm.



Figura 12. Cromatógrafo Líquido da Alta Eficiência-CLAE

5.5.4 Preparo dos padrões

Os padrões Apigenina (5mg) e Pinocebrina (25mg) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA), o padrão Rutina foi fornecido pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Soluções estoque dos padrões foram preparadas pela dissolução de cada padrão em metanol grau cromatográfico. O padrão Apigenina e Rutina foram dissolvidos em 10mL de metanol e o Pinocebrina em 50mL de metanol. Os padrões foram filtrados em filtro de teflon poro 0,45 µm e injetados nas mesmas condições das amostras de mel.

5.5.5 Identificação dos flavonóides

Os flavonóides existentes nas amostras foram identificados através de duas técnicas: a primeira comparando os seus tempos de retenção dos picos das amostras com os tempos de retenção dos flavonóides padrão. Posteriormente utilizou-se a técnica da adição de padrão que consiste em adicionar quantidades conhecidas de cada padrão de flavonóide na amostra. Caso ocorra aumento na altura e conseqüentemente na área do pico suspeito de ser um dos flavonóides alvo, sem que apresente ombros ou distorções nos picos, evidência ou reforça a identificação pela comparação dos tempos de retenção.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Testes de difusão em ágar

Os valores médios dos halos de inibição e desvio padrão, indicadores da atividade antimicrobiana dos méis 1C, 2C, 1C-2, 2C-2, 6MC, 5J e IE, obtidos pelo teste de difusão em ágar, podem ser observados nas tabelas 3, 4 e 5, e nas figuras 13, 14.

Tabela 3. Atividade antimicrobiana expressa pela média \pm desvio padrão dos halos de inibição, após inoculação das amostras de mel das duas espécies de abelha do campus do INPA, referentes à primeira coleta (primeiro semestre do ano).

Bactérias	Mel 1C						Mel 2C					
	1/1	1/2	1/4	1/6	1/8	puro	1/1	1/2	1/4	1/6	1/8	Puro
<i>S.aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E.coli</i>	0	0	0	0	0	15,6 \pm 0,1	0	0	0	0	0	22,2 \pm 0,2
<i>S.sonnei</i>	0	0	0	0	0	11,2 \pm 0,2	0	0	0	0	0	0
<i>P.vulgaris</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S.paratyphi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Obs.: Halos em milímetros (mm).

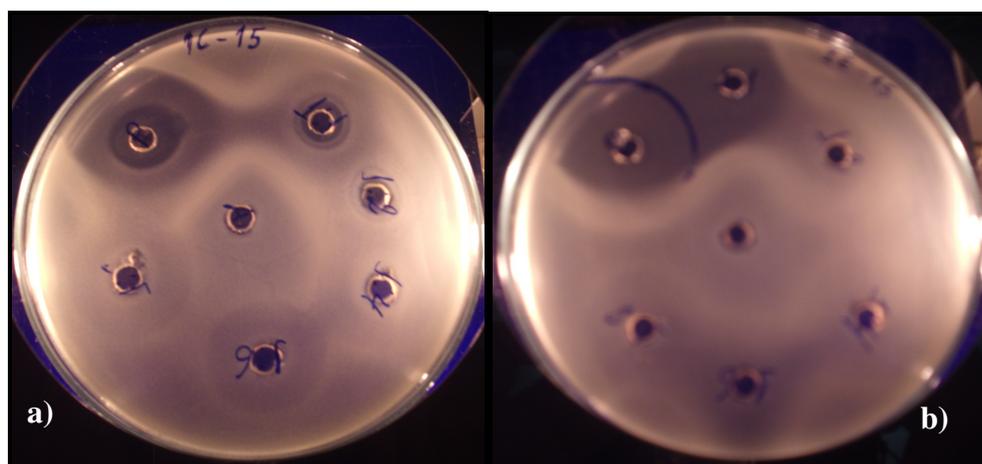


Figura 13. Teste de difusão em Agar, (a) suspensão de *S.sonnei*, (b) suspensão de *E.coli*, com as amostras de mel em suas diferentes diluições em cada cavidade.

Tabela 4. Atividade antimicrobiana expressa pela média \pm desvio padrão dos halos de inibição, após inoculação das amostras de mel das duas espécies de abelha do campus do INPA, referentes a segunda coleta (segundo semestre).

Bactérias	Mel 1C-2						Mel 2C-2					
	1/1	1/2	1/4	1/6	1/8	puro	1/1	1/2	1/4	1/6	1/8	puro
<i>S.aureus</i>	12,6 \pm 0.0	12,1 \pm 0.0	0	0	0	18,3 \pm 0.4	0	0	0	0	0	0
<i>E.coli</i>	9,2 \pm 0.0	0	0	0	0	16,1 \pm 0.0	0	0	0	0	0	0
<i>S.sonnei</i>	14,6 \pm 0.0	-*	12 \pm 0.0	9,5 \pm 0.1	0	12,4 \pm 0.2	0	0	0	0	0	0
<i>P.vulgaris</i>	20,3 \pm 0.5	18,2 \pm 0.4	15,6 \pm 0.1	13 \pm 0.3	12,8 \pm 0.2	24,1 \pm 0.0	0	0	0	0	0	10,3 \pm 0.1
<i>S.paratyphi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella sp.</i>	0	0	0	0	0	8,2 \pm 0.5	0	0	0	0	0	7,5 \pm 0.2

Obs.: Halos em milímetros (mm).

* Esta diluição apresentou contaminação.

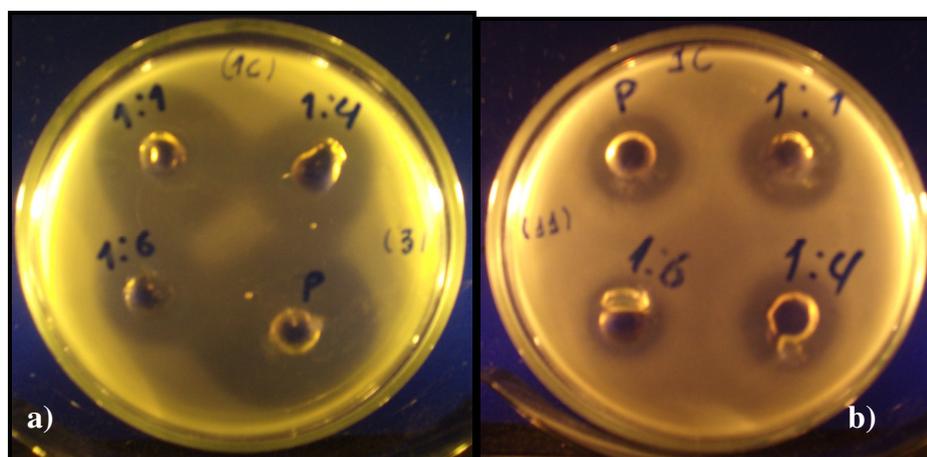


Figura 14. Teste de difusão em Agar, (a) suspensão de *P.vulgaris*, (b) suspensão de *S.sonnei*, com as amostras de mel em suas diferentes diluições em cada cavidade.

Quando analisamos os resultados dos méis 1C, 2C, 1C-2 e 2C-2, nas tabelas 3 e 4 respectivamente, verificamos uma grande diferença de atividade entre eles. Todas essas quatro amostras de mel foram coletadas na mesma região, porém em épocas do ano diferentes, as amostra 1C e 2C, foram coletadas na época de cheia da região, em que o número de chuvas é maior, porém época de entressafra na produção de mel, por ser uma época de menor florada. Nesse período essas espécies de abelha reduzem a produção de mel, em casos extremos algumas colônias chegam a morrer por falta de alimento. Enquanto que as amostras 1C-2 e 2C-2 foram coletadas na época de seca, período de maior florada na região, portanto de maior disponibilidade de néctar para as abelhas produzirem seu mel. Diante disso verificamos que o mel 1C-2 foi o de maior atividade inibindo o crescimento de cinco das seis

bactérias estudadas em suas diferentes diluições. Enquanto que o mel 1C, 2C e 2C-2 exibiram atividade somente quando aplicado puro.

Esses resultados dão indícios de que fatores fitoquímicos podem estar contribuindo para essa diferença na atividade. Outra informação que pode reforçar essa hipótese foi dada pelos técnicos que monitoram essas abelhas do campus, essas abelhas são alimentadas com néctar artificial feito de uma mistura de açúcares ou melaço de cana, durante a entressafra para evitar a perda de algumas colônias. Portanto as amostras 1C e 2C teriam uma porcentagem muito baixa de componentes fitoquímicos que seriam provenientes do néctar das plantas. Enquanto que as amostras 1C-2 e 2C-2 seriam mais ricas nesses componentes, portanto essa diferença de atividade entre o mel 1C-2 e 1C poderia ser atribuída a possíveis componentes fitoquímicos do mel 1C-2, vale ressaltar que essas amostras de mel são da mesma espécie de abelha, e ainda das mesmas colônias, porém coletadas em períodos diferentes. Mas esse fato não explica a diferença observada entre os méis 1C-2 e 2C-2.

Neste caso fatores entomológicos podem estar contribuindo para essa diferença na atividade, por serem méis produzidos por abelhas de espécies diferentes. Como por exemplo, a produção de peróxido de hidrogênio no mel pela enzima glicose oxidase das abelhas, como mostrado na revisão bibliográfica desta dissertação, o peróxido de hidrogênio é um dos fatores mais importantes envolvidos na atividade antimicrobiana dos méis, como não foi avaliado a presença de peróxido de hidrogênio nos méis estudados, não é possível comprovar se essa atividade é devido à presença desse composto, pode-se apenas supor. Entretanto o fato dessas abelhas habitarem o mesmo local geográfico, não garante que elas forragearam as mesmas espécies de plantas, portanto a possibilidade de a espécie 1C-2 ter visitado plantas que possam ter fornecido néctar e resinas ricas em moléculas bioativas é grande, comparado ao mel da espécie 2C-2. Os resultados apresentados sugerem então que esta atividade pode estar sendo exercida por componentes de origem entomológica e/ou componentes de origem fitoquímica, junto com a ação osmótica. Alguns autores já sugeriram que a espécie da abelha seria responsável pela atividade antimicrobiana (MIORIN et al., 2003), outros que a região fitogeográfica seria a responsável pela diferença de atividade (DEMERA e ANGERT, 2004). Porém, Bogdanov (1997) já tinha sugerido que a abelha e as plantas influenciariam na atividade e que ambos atuariam de forma sinérgica.

Ao analisar os resultados exibidos nas tabelas acima, verificamos que alguns microrganismos foram inibidos a diluições de 1/4 (20%), 1/6 (14,3%) e 1/8 (11,1%), bem mais diluídos que os 22% exigidos, segundo Chirife et al., (1982 e 1983) , e Molan (1992) a concentração mínima de uma solução de açúcares para prevenir o crescimento da maioria das

bactérias patogênicas é de 29% (p/v) a um A_w que varia entre 0.86 à 0.89, isso é o equivalente a uma concentração de mel de 22% . Indicando que a atividade exibida não é exclusivamente atribuída à atividade osmótica.

Essa hipótese pode ser reforçada quando analisamos os resultados das amostras 1C que inibiu o crescimento de *E.coli* e *S.sonnei* e 2C que inibiu o crescimento de *E.coli* na tabela 3, e a amostra 2C-2 na tabela 4 que inibiu o crescimento de *P.vulgaris* e *Klebsiella sp.*, todos inibiram o crescimento desses microrganismos quando aplicados puros, se essa atividade fosse totalmente atribuída à ação da osmose, seria de se esperar que as outras bactérias também fossem inibidas, visto que essas espécies bacterianas, com exceção da *S.aureus*, não são conhecidas como sendo osmotolerantes. As mesmas observações podem ser feitas quando analisamos a atividade entre os méis comerciais na tabela 5, os méis 6MC e 5J exibiram atividade somente quando aplicados puro, e contra algumas espécies bacterianas, enquanto o mel IE foi bem mais ativo inibindo cinco das seis espécies avaliadas, em diferentes diluições.

Obviamente que a atividade osmótica sempre irá atuar em soluções com altas concentrações de açúcares, porém nossos resultados revelam que a atividade atribuída à osmose e exercida por esses méis estudados não é suficiente para inibir o crescimento de algumas espécies bacterianas. Indicando a existência de outros fatores que podem estar contribuindo para esta atividade antimicrobiana.

Analisando as tabelas foi verificado que, o microrganismo *S. aureus* foi inibido somente por duas amostras de mel das sete testadas, o mel 1C-2 e o mel 5J, sendo o mel 1C-2 apresentando o maior halo 52,4% maior que o halo do mel 5J. A *E.coli* foi inibida por seis dos sete méis sendo o mel IE apresentando halo 38,0% maior que o maior halo exibido pelo mel 1C-2 o segundo mel de maior atividade para essa bactéria, e 71,5% maior que o halo exibido pelo outro mel comercial em estudo o mel 6MC. A *S.sonnei* foi inibida por quatro dos sete méis, e o mel IE apresentou maior halo dentre os méis, 19,8% maior que o maior halo exibido pela amostra 1C-2 e 44,0% maior que o halo da amostra 6MC. Porém o maior halo da amostra 1C-2 foi exibido na diluição de 1/1. A bactéria *P.vulgaris* foi inibida por três méis, sendo o mel IE apresentando maior halo dentre os outros méis, 8,3% maior que o exibido pelo mel 1C-2 e 60,0% maior que o exibido no mel 2-C2. A bactéria *S.paratyphi* só apresentou sensibilidade contra o mel IE, sendo inibida até a diluição de 1/6, sendo o maior halo 28,7% maior que o menor halo exibido, e a bactéria *Klebsiella sp.* sendo inibida por três méis sendo que o mel IE obteve maior halo dentre os outros dois, 56,4% maior em relação ao maior halo do mel 2C-2 e 49,5% maior que o mel 5J. Os maiores halos foram observados quando o mel

era aplicado puro, exceto para o mel 1C-2 contra a bactéria *S.sonnei* que mostrou maior sensibilidade na diluição de 1/1. Essa análise permite dizer ainda que o mel IE além de inibir o maior número de microrganismos é o mel que apresenta maior sensibilidade aos microrganismos, pois inibi os microrganismos em quase todas as diluições cinco das seis diluições e apresenta os maiores halos de inibição observados neste estudo.

Tabela 5. Atividade antimicrobiana expressa pela média \pm desvio padrão dos halos de inibição, após inoculação das amostras de méis comerciais em suas diferentes diluições.

Bactérias	Mel 6MC						Mel 5J						Mel IE					
	1/1	1/2	1/4	1/6	1/8	Puro	1/1	1/2	1/4	1/6	1/8	puro	1/1	1/2	1/4	1/6	1/8	puro
<i>S.aureus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,7 \pm 0.5	0	0	0	0	0	0
<i>E.coli</i>	0	0	0	0	0	7,4 \pm 0.0	0	0	0	0	0	14,5 \pm 0.0	21,8 \pm 0.2	0	0	0	0	26 \pm 0.0
<i>S.sonnei</i>	0	0	0	0	0	10,3 \pm 0.1	0	0	0	0	0	0	16,6 \pm 0.1	17,5 \pm 0.3	10 \pm 0.3	7,3 \pm 0.1	0	18,2 \pm 0.4
<i>P.vulgaris</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25,4 \pm 0.4	15,4 \pm 0.3	16,8 \pm 0.1	15,1 \pm 0.1	0	26,3 \pm 0.0
<i>S.paratyphi</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12,2 \pm 0.0	11,1 \pm 0.0	10,2 \pm 0.1	10,4 \pm 0.1	0	14,3 \pm 0.0
<i>Klebsiella sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8,7 \pm 0.2	8,7 \pm 0.2	12,8 \pm 0.0	0	0	0	0	17,2 \pm 0.0

A maioria dos microrganismos cresce bem dentro de variações pequenas de pH, sempre próximo a neutralidade entre 6,5 e 7,5. No geral essas bactérias têm seu crescimento inibido devido à inativação de algumas enzimas essenciais a sua sobrevivência (TORTORA et al., 2005). Os valores de pH de cada mel puro e em suas diluições são mostradas na tabela 6.

Tabela 6. valores de pH do mel puro e suas diluições

	Puro	1/1	1/2	1/4	1/6	1/8
1C	3,8	5,2	5,8	6,4	7,1	7,7
2C	3,6	4,9	5,7	6,1	7,5	8,0
1C-2	3,1	3,9	4,5	5,9	6,8	7,5
2C-2	3,4	4,0	4,9	6,0	6,5	7,7
IE	4,2	4,5	5,1	6,0	6,6	7,9
6MC	4,7	5,0	5,9	6,4	7,4	8,1
5J	3,8	4,4	4,7	6,0	6,7	7,6

Analisando os valores de pH na tabela acima e comparando com os valores de atividade dos méis nas tabelas anteriores, é possível fazer observações importantes.

O mel IE inibiu o crescimento de *S.sonnei* a valores de pH próximo da neutralidade 6,6 e 6,0 assim como na acidez de 4,2 e 4,5. No mel 1C-2 essa mesma bactéria foi inibida em valores de pH de 3,1 à 6,8.

Enquanto que contra *S.aureus* o mel 1C-2 teve atividade em valores de pH de 3,1, 3,9, 4,5, no mel IE essa mesma bactéria não foi inibida, e os valores de pH nas mesmas diluições foram bem próximos de 4,2, 4,5 e 5,1, sugerindo que para esta bactéria o pH não está influenciando na atividade. A bactéria *P.vulgaris* foi inibida em todas as diluições no mel 1C-2 com valores de pH que variaram do muito ácido 3,1 para o neutro em 7,5.

Fazendo uma relação entre os méis de maior atividade e os valores de pH exibidos por eles, observamos que na amostra IE a medida que o mel vai sendo diluído e os valores de pH vão aumentando, os halos de inibição vão diminuindo, até que o pH chega a um valor neutro e não há formação de halo, esse fato pode ser observado para os microrganismos *P.vulgaris* e *S.paratyphi*. Porém no microrganismo *S.sonnei* houve um leve aumento do halo na diluição 1/2 (pH 5,1) em relação a diluição 1/1 (pH 4,5), nesse caso o aumento do pH não pode Não estar influenciando na redução do tamanho do halo, pelo contrário o halo aumentou. Esse é mais um indício de que o pH ácido não influencia diretamente na inibição deste

microrganismo. Mas para os outros dois microrganismos é possível observar uma possível correlação entre o aumento do pH e o tamanho do halo, indicando que existe uma contribuição dos valores de pH ácido para a atividade antimicrobiana. A mesma observação pode ser feita entre o mel 1C-2 e a bactéria *P.vulgaris* à medida que os valores de pH da amostra de mel vão aumentando os halos vão diminuindo indicando uma forte correlação entre a acidez e o tamanho dos halos. Reforçando o fato de que a acidez pode contribuir para a inibição do crescimento bacteriano, mas não é o principal componente inibidor do mel.

Isso são indícios que a acidez exibida pelos méis estudados não são os únicos fatores de inibição desses méis, se o pH tivesse influência direta na atividade, seria esperado que o mel 1C e 2C, onde encontramos valores de pH ácidos bem próximos aos encontrados nos méis com maior atividade, assim como valores próximos da neutralidade exibissem alguma atividade. Portanto a acidez não é o principal fator de inibição, mas segundo Mendes e Coelho, 1983, pode contribuir com essa atividade junto com os outros fatores.

Dentre as duas espécies de abelha sem ferrão o mel 1C-2 de *Melipona compressipes manaosensis* demonstrou ter maior atividade inibindo o crescimento de cinco microrganismos teste (*S.aureus*, *E.coli*, *S.sonnei*, *P.vulgaris*, *Klebsiella sp.*), e dentre os méis comerciais o Mel IE de abelha do gênero *Apis* com florada predominante de Eucalipto, demonstrou ter maior atividade dentre todos os méis comerciais inibindo também o crescimento de cinco microrganismo (*E.coli*, *S.sonnei*, *P.vulgaris*, *S.paratyphi*, *Klebsiella sp.*). Embora o mel comercial tenha inibido um número maior de microrganismos em comparação com o mel de abelha sem ferrão, quando testes são desenvolvidos com um número bem maior de amostra de mel, o resultado das análises estatísticas tem revelado que não existe diferença significativa entre a atividade do mel das duas espécies de abelha (MIORIN et al, 2003; DEMERA e ANGERT, 2004).

Porém nossos resultados demonstram que existem uma diferença de inibição entre bactérias gram-positivas e gram-negativas, o mel 1C-2 (*Melipona compressipes manaosensis*) apresentou atividade contra a cepa bacteriana gram-positiva (*S.aureus*), e as cepas gram-negativas (*E.coli*, *S.sonnei*, *P.vulgaris*, *Klebsiella sp.*), com exceção da *S.paratyphi*, enquanto que o mel IE inibiu somente as bactérias gram-negativas. Atualmente, o modo de ação do mel em células bacterianas vem sendo desvendado. Uma investigação dos efeitos moleculares usando a técnica de *microarrays* indicou que as respostas bacterianas ao estresse do mel são altamente reguladas em *Escherichia coli* (BLAIR et al., 2009). Mudanças morfológicas em bactérias expostas ao mel de Manuka (HENRIQUES et. al., 2010), sugerem que bactérias gram-positivas e gram-negativas respondem ao mel de forma diferente.

Portanto, a resposta bacteriana ao mel também depende da natureza das bactérias, o mel da abelha sem ferrão *Melipona compressipes manaosensis* inibiu o crescimento das bactérias gram-negativas e o crescimento da cepa gram-positiva *S.aureus*, o mel comercial com maior atividade o mel IE, inibiu o crescimento das bactérias gram-negativas.

Talvez a maior resistência de algumas bactérias ao mel possa ser atribuída à natureza de sua parede celular. A principal função da parede celular é prevenir a ruptura das células bacterianas, quando a pressão da água de dentro da célula é maior que a de fora, por essa importância vital que ela é o local de ação de muitos antibióticos. Na maioria das bactérias gram-positivas a parede consiste de grossas camadas de peptidoglicano, essa parede permite a passagem de muitos cátions e moléculas carregadas positivamente, enquanto que as gram-negativas possuem só uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa, essa membrana tem carga negativa, portanto muitas moléculas não encontram muitas dificuldades para atravessar essas paredes, até porque as paredes não podem fornecer uma barreira para um grande número de substâncias do meio ambiente, pois as células necessitam de alguns nutrientes específicos para manter seu metabolismo (TORTORA et al., 2003), porém moléculas muito grandes encontram uma barreira para entrar. Portanto as paredes não fornecem proteção contra a ação da osmose ou contra a acidez de algumas soluções. Porém moléculas como peróxido de hidrogênio, flavonóides e ácidos fenólicos podem atuar fazendo ligações nas paredes celulares e retirando elétrons das moléculas da parede, desestabilizando-a provocando uma lise celular.

Existem pesquisas com diferentes méis pelo mundo usando como modelo a bactéria *S.aureus* (uma das bactérias gram-positivas de maior importância médica, e o maior microrganismo envolvido em casos de resistência aos antimicrobianos) tem demonstrado que tanto bactérias gram-positivas, quanto gram-negativas se mostram sensíveis ao mel (MOLAN, 1992; TORTORA et al., 2005; BALTRUSAITYTE et al., 2007; BOUKRAË et al., 2008).

6.2 Testes de macrodiluição em caldo

Os resultados da macrodiluição foram obtidos a partir da observação dos tubos e das placas de ágar nutriente semeadas com as diluições de cada tubo. A figura 14 mostra duas dessas placas.

Os resultados das concentrações mínimas bactericida dos méis 1C, 2C, 1C-2, 2C-2, 6MC, 5J e mel IE, nas suas diferentes diluições, encontram-se respectivamente nas tabelas 6, 7, 8 e 9.

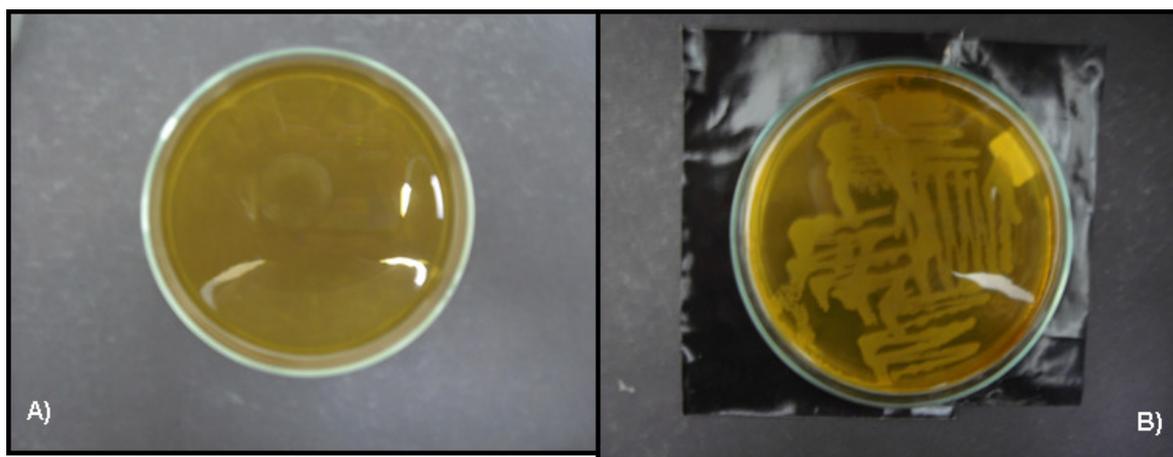


Figura 15. Placas de ágar nutriente, depois de semeadas com alíquotas das diluições e incubadas, com ausência de crescimento bacteriano em **A** e crescimento bacteriano em **B**.

Tabela 7. Resultado do teste de macrodiluição em caldo do mel 1C e 2C, referentes à primeira coleta, indicando a concentração mínima bactericida de cada diluição do mel.

Bactérias	Mel 1C							Mel 2C						
	Controle Negativo	1/1	1/2	1/4	1/6	1/8	Controle positivo	Controle negativo	1/1	1/2	1/4	1/6	1/8	Controle positivo
<i>S.aureus</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>E.coli</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>S.sonnei</i>	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>P.vulgaris</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>S.paratyphi</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella sp.</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+

“+” indica crescimento do microrganismo na concentração correspondente.

“-” significa que o microrganismo não cresceu na concentração correspondente.

Tabela 8. Resultado do teste de macrodiluição em caldo do mel 1C-2 e 2C-2, referentes à segunda coleta, indicando a concentração mínima bactericida de cada diluição do mel.

Bactérias	Mel 1C-2							Mel 2C-2						
	Controle Negativo	1/1	1/2	1/4	1/6	1/8	Controle positivo	Controle negativo	1/1	1/2	1/4	1/6	1/8	Controle positivo
<i>S.aureus</i>	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>E.coli</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>S.sonnei</i>	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>P.vulgaris</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>S.paratyphi</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella sp.</i>	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+

“+” indica crescimento do microrganismo na concentração correspondente.

“-“ significa que o microrganismo não cresceu na concentração correspondente.

Estudos de inibição de patógenos que infectam feridas *in vitro* confirmam o largo espectro de atividade do mel, independente se o mel foi testado utilizando a técnica de diluição em caldo (WILLIX et. al., 1992; KARAYIL et. al., 1998; WAHDAN, 1998; MIORIN et. al., 2003) ou difusão em placa (NZEAKO e HAMDI, 2000; SUBRAHMANYAM et. al., 2001; COOPER et. al., 2000; COOPER et. al., 2002a,b; BALTRUSAITYTE et. al. 2007; BLAIR et. al., 2009).

A maioria dos testes antimicrobianos com mel que adotam a diluição em caldo utiliza a técnica da microdiluição (KARAYIL et. al., 1998; WAHDAN, 1998; MIORIN et. al., 2003), que é feita em uma escala bem menor do que a macrodiluição, mais utilizando o mesmo critério de diluição adotado neste estudo.

Neste trabalho foram utilizadas as duas técnicas e obtivemos diferenças de atividade marcantes entre as amostras, por exemplo: o mel 1C e 2C na técnica de difusão em ágar apresentaram atividade somente quando aplicado puro, enquanto que na técnica de macrodiluição em caldo obtivemos para o mel 1C CMB de 1/6 (14,3%) para *P.vulgaris*, 1/4 (20%) para *S.sonnei* e 1/2 (33,3%) para *S.paratyphi* e *Klebsiella sp.*, e para o mel 2C CMB de 1/2 (33,2%) para *S.aureus* e *Klebsiella sp.*, e 1/4 para *P.vulgaris*. O mesmo pode ser observado entre os outros méis, com destaque para o mel 5J da abelha sem ferrão conhecida como Jandaíra (*Melipona subnitida*), que apresentou CMB de 1/8(11,1%) para *P.vulgaris*. Os resultados mostrados nas tabelas 6, 7, 8 e 9, apontam para a maior sensibilidade do método de macrodiluição, em relação ao método de difusão.

Isso se deve a probabilidade de alguns compostos do mel não se difundirem bem no meio de cultura sólido utilizado, encontrando então nenhuma barreira quando diluídos em meio líquido. Inúmeros fatores podem ter influenciado na diferença de atividade entre as técnicas. Segundo Cabral 2008, é esperado que os extratos de produtos naturais mais apolares

apresentem dificuldades na sua difusão no ágar que é polar. Silveira et al., 2009, apontam que a dificuldade de difusão de produtos naturais também pode estar relacionada à sua hidrossolubilidade e à sua massa molecular. No método de difusão, entretanto, a presença de matéria particulada na amostra pode interferir na difusão da substância antimicrobiana no ágar (ESTRELA, 2000).

Considerando que as amostras analisadas são soluções aquosas de mel, e ainda sabendo das características polares do meio ágar, pode-se dizer que o solvente não apresenta dificuldades para se difundir pelo ágar. Com isto, existe uma probabilidade muito maior de difusão dos compostos mais polares que compõe o mel, sendo que os compostos com menor polaridade têm sua mobilidade prejudicada devido à incompatibilidade de suas polaridades. No teste de macrodiluição, o meio líquido faz com que tanto moléculas apolares quanto as polares possuam uma mobilidade maior, pois não existe a barreira polar do ágar para impedir a difusão das moléculas apolares. Esse fato pode estar sendo determinante para a diferença de atividade mostrada entre os métodos.

O mel se mostrou um agente antibacteriano de amplo espectro e seu potencial antimicrobiano pode variar claramente. Condições ambientais, espécies de abelha que o produz ou de plantas que elas têm acesso afetam sua composição, pois ele é colhido no ambiente natural, por isso existe uma grande diversidade entre grupos de mel do mesmo local, principalmente os colhidos em intervalos de tempo diferentes. Devido a esta variação, a segurança na sua reprodutibilidade e eficácia com respeito aos testes antimicrobianos não pode ser completamente controlada. O mel tem uma composição química complexa, e a origem de todos os seus componentes inibitórios, e seus mecanismos de ação ainda não foram completamente desvendados. As informações agrupadas neste estudo oferecem ao mel de abelhas sem ferrão e mel comercial vantagens no controle do crescimento bacteriano. A ausência de resistência em relação à encontrada em antibióticos convencionais são características muito atraentes para a medicina moderna. A publicação de casos de erradicação de bactérias resistentes de pacientes dá maior credibilidade para os resultados observados *in vitro*, mas ainda é muito incipiente uso dessa alternativa no ambiente hospitalar.

Tabela 9. Resultado do teste de macrodiluição em caldo dos méis comerciais 6MC e 5J, indicando a concentração mínima bactericida de cada diluição do mel.

Bactérias	Mel 6MC							Mel 5J						
	Controle negativo	1/1	1/2	1/4	1/6	1/8	Controle positivo	Controle negativo	1/1	1/2	1/4	1/6	1/8	Controle positivo
<i>S.aureus</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>E.coli</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>S.sonnei</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
<i>P.vulgaris</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>S.paratyphi</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella sp.</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+

“+” indica crescimento do microrganismo na concentração correspondente.

“-” significa que o microrganismo não cresceu na concentração correspondente.

Tabela 10. Resultado do teste de macrodiluição em caldo do mel comercial IE, indicando a concentração mínima bactericida de cada diluição do mel.

Bactérias	Mel IE						
	Controle negativo	1/1	1/2	1/4	1/6	1/8	Controle positivo
<i>S.aureus</i>	-	-	-	-	+	+	+
<i>E.coli</i>	-	-	-	+	+	+	+
<i>S.sonnei</i>	-	-	-	-	-	+	+
<i>P.vulgaris</i>	-	-	-	-	+	+	+
<i>S.paratyphi</i>	-	-	-	-	+	+	+
<i>Klebsiella sp.</i>	-	-	-	-	+	+	+

“+” indica crescimento do microrganismo na concentração correspondente.

“-” significa que o microrganismo não cresceu na concentração correspondente.

6.3 Análises por CLAE

Observando os cromatogramas e correlacionando com o método utilizado, pode-se observar que os picos que saem em tempos de retenção menores, entre 0-10 min., são de compostos de natureza mais polar, já que o eluente no início da análise possui esta característica, levando em consideração ainda que a fase estacionária utilizada foi uma C18. A corrida inicia com 30% de metanol e essa porcentagem vai aumentando ao longo da corrida de 60 min., chegando a 80% no término da corrida. Sendo assim os compostos mais polares com relação a esse gradiente saem em tempos de retenção menores, enquanto que compostos apolares saem em tempos de retenção maiores. Segundo Ferreres et al., (1994), os picos que saem entre os tempos de retenção de 20 – 45 min., são provavelmente picos relacionados aos flavonóides e ácidos fenólicos, a figura 16 ilustra as regiões do cromatograma com suas polaridades distintas de uma amostra de mel.

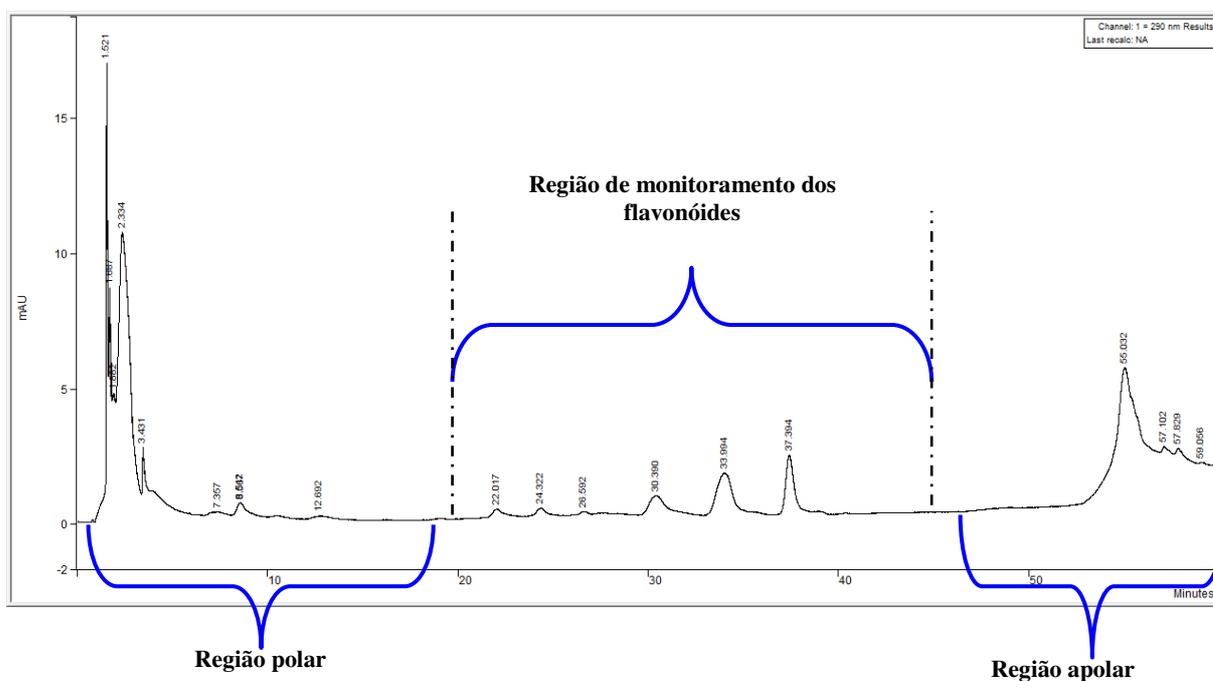


Figura 16. Figura ilustrativa das regiões do cromatograma.

Sabendo que o detector utilizado foi o UV-Vis, pode-se afirmar que os componentes que foram detectados apresentam grupamentos cromóforos. Possivelmente esses componentes são derivados de ácidos fenólicos ou flavonóides. Porém, há a necessidade de se utilizar métodos analíticos e específicos visando desvendar suas estruturas químicas presentes nos diferentes tipos de mel.

Esta condição de trabalho por gradiente com metanol e água, tem sido bastante utilizada por muitos trabalhos permitindo uma boa separação dos picos nos cromatogramas (MATOS et. al., 2000; YAO et. al., 2003 e 2004; KENJERIC, et. al., 2008,

MICHALKIEWICZ, et. al., 2008). Embora outros solventes possam ser adotados devido à complexidade específica de cada mel.

Porém Ferreres et. al., (1994) chama a atenção para o grande problema na análise de flavonóides do mel, que diz respeito ao grande conteúdo de açúcares, esse problema torna difícil a extração destes metabólitos e a preparação destas amostras para a análise em CLAE. Durante a extração líquido-líquido eles observaram a formação de uma emulsão no funil, dificultando um pouco a extração e levando a necessidade da utilização de mais solventes. Esse problema foi logo resolvido o uso de uma resina iônica XAD-2 nos processos de extração, desde então essa e outras resinas similares vem sendo utilizada em todos os estudos que visam extrair flavonóides do mel com recuperação de até 90% dos compostos (MATOS et. al., 2000; YAO et. al., 2003 e 2004; KENJERIC, et. al., 2008, MICHALKIEWICZ, et. al., 2008). Neste estudo foi utilizada a extração líquido-líquido, e minimizamos esse problema com a adição de uma solução iônica feita de água e cloreto de sódio, reduzindo assim a formação de emulsão no funil de separação.

Muitos estudos que visam à identificação de compostos fenólicos no mel utilizam água com pH ácido preparada com ácido fórmico ou ácido acético (WESTON, et. al. 2000a; GHELDOF et. al., 2002; YAOA, et. al., 2005) para compor o gradiente de eluentes da corrida, segundo Michalkiewicz et. al., (2008) isso é devido a natureza ácida da maioria dos compostos fenólicos, exigindo assim uma fase móvel ácida para a separação satisfatória dos picos, e diminuir o tempo de retenção desses compostos na coluna. Porém Bogdanov (1997), já dizia que esse método é mais usado para corridas que visam identificar ácidos fenólicos além dos flavonóides. Neste trabalho foi usado água sem adição de ácidos e obteve-se uma boa separação dos picos na região que se espera sair os flavonóides, além do que este estudo visa identificar três flavonóides e não ácidos fenólicos.

As figuras 17 a 34, a seguir ilustram os cromatogramas das análises em cromatografia líquida de alta eficiência das amostras de mel, detecção com λ de 290 e 340nm.

6.3.1 Detecção com λ de 290nm

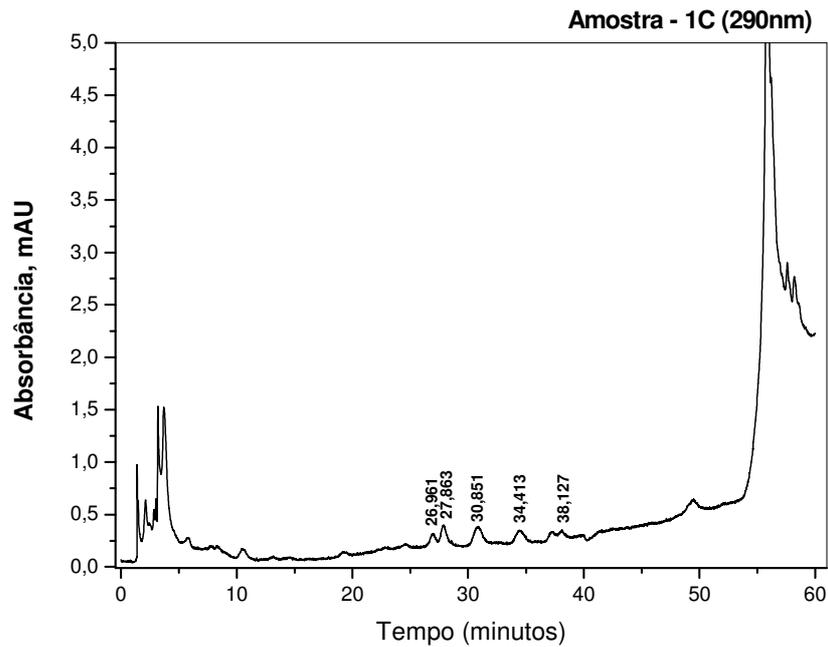


Figura 17. Cromatograma do extrato do mel amostra 1C.

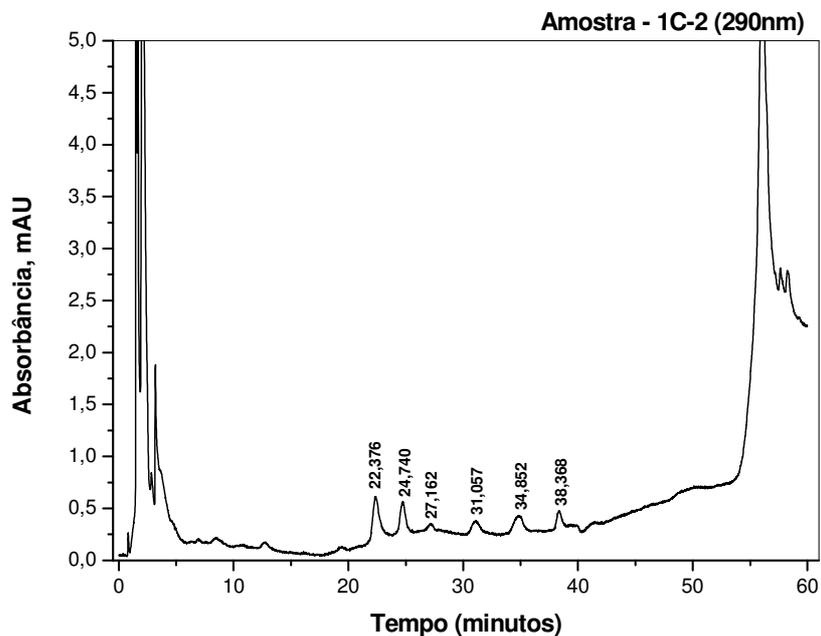


Figura 18. Cromatograma do extrato do mel amostra 1C-2.

Analisando os cromatogramas acima com λ de 290nm, referentes ao mel coletado na cheia (1C) e o mel coletado na seca (1C-2) da mesma espécie de abelha (*Melipona compressipes manaosensis*), pode-se observar uma semelhança na quantidade de picos que saem em tempos de retenção na região de monitoramento dos flavonóides. O mel 1C exibe cinco picos com tempos de retenção distintos, e o mel 1C-2 seis picos com tempos

de retenção distintos. A partir daí e analisando os tempos de retenção de cada pico dos dois cromatogramas, pode-se observar picos muito semelhantes com tempos de retenção muito próximos, que podem corresponder aos mesmos compostos nos dois méis. Porém no mel 1C-2 coletado na época de seca, dois picos com tempos de retenção de 22.376 min. a 24.740 min. respectivamente não são observados no cromatograma do mel 1C, esses picos podem corresponder a compostos fenólicos coletados de plantas que não floresceram na época da cheia, considerada de menor florada das plantas da região. Considerando que o mel 1C-2 foi o mel de maior atividade antimicrobiana entre esses dois méis, pode-se considerar uma grande possibilidade de que esses dois picos sejam de compostos fenólicos que podem estar contribuindo para essa maior atividade antimicrobiana. Essas observações podem indicar a possível presença de moléculas com maior atividade na florada das plantas dessa época do ano, o período de seca. As plantas que se reproduzem nesse período de seca, devido ao estresse ocasionado pela seca, podem está produzindo moléculas com atividade biológica maior como uma estratégia de sobrevivência, muitos flavonóides produzidos pelas plantas são usados para sua proteção contra patógenos e em competições por alelopatia com outras plantas. Esse fato pode estar refletindo na atividade biológica do mel, visto que é possível que estas abelhas possam está carreando essas moléculas para o mel.

Fazendo a sobreposição dos cromatogramas na figura 19 abaixo, fica mais claro observar as diferenças e semelhanças dos cromatogramas das amostras 1C e 1C-2.

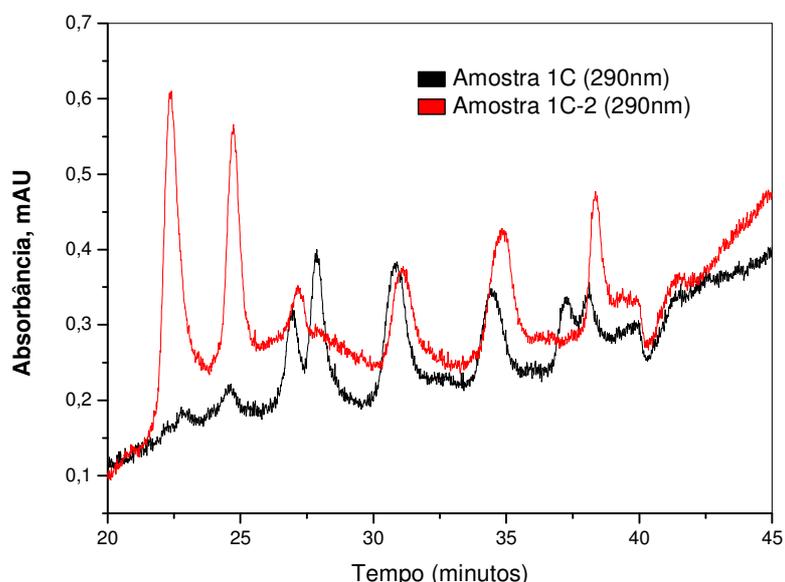


Figura 19. Sobreposição dos cromatogramas 1C e 1C-2.

Analisando a figura acima ficam claros os dois picos distintos do cromatograma do mel 1C-2 em vermelho em tempos de retenção entre 22 e 24min. e a semelhança dos outros picos com o mel 1C. Mas para termos certeza de que esses dois picos

podem corresponder a compostos fenólicos com algum tipo de atividade seria necessário isolar esses picos utilizando técnicas de cromatografia preparativa e testá-los isoladamente.

A seguir as figuras 20 e 21 ilustram os cromatogramas das amostras do mel 2C coletado na época de cheia e 2C-2 coletado na época de seca da abelha (*Melipona seminigra*).

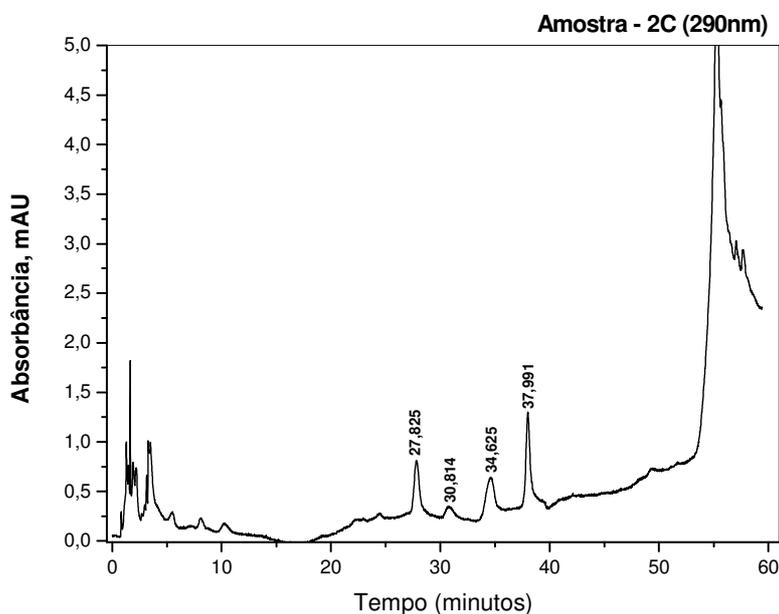


Figura 20. Cromatograma do extrato do mel amostra 2C.

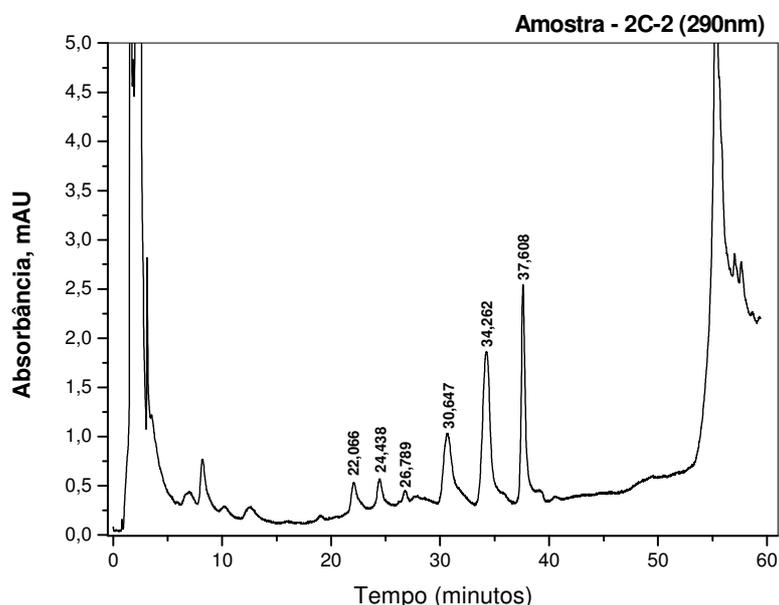


Figura 21. Cromatograma do extrato do mel amostra 2C-2.

Analisando os cromatogramas das figuras anteriores se observa uma diferença na quantidade de picos da região de monitoramento dos flavonóides das amostras 2C exibindo quatro picos e a amostra 2C-2 exibindo seis picos, três desses picos são muito semelhantes quanto aos seus tempos de retenção e podem corresponder aos mesmos compostos fenólicos contidos nas duas amostras. Porém na amostra 2C-2 existem três picos com tempos de

retenção de 22.066 min., 24.438 min. e 26.789 min. que não são observados na amostra 2C que apresenta um pico com tempo de retenção de 27.826 min. que não é observado na outra amostra 2C-2. Essas observações ficam mais evidentes quando fazemos a sobreposição dos cromatogramas, que pode ser observado na figura 22.

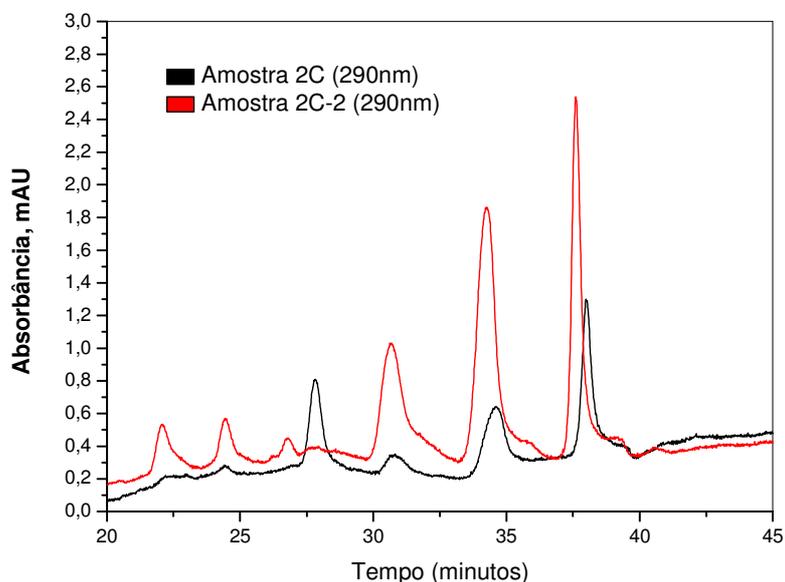


Figura 22. Sobreposição dos cromatogramas 2C e 2C-2.

Observando a figura acima podemos perceber na amostra 2C cromatograma em negro, o único pico com tempo de retenção 27.826 min., diferente em relação à amostra 2C-2 em vermelho, e os outros três picos característicos da amostra 2C-2. Observa-se também nesta figura que os três picos de compostos semelhantes entre as amostras estão em maior quantidade na amostra 2C-2, e como dito anteriormente essas amostras foram coletadas na época de seca de maior florada das plantas da região, pode-se então associar esse fato a maior oferta de néctar das flores para as abelhas, refletindo então na maior quantidade dessas moléculas no mel. Entretanto esses dois méis não apresentaram uma boa atividade antimicrobiana comparado ao mel 1C-2.

Analisando os cromatogramas e os tempos de retenção dos picos das amostras 1C-2 e 2C-2 observamos uma semelhança no perfil cromatográfico. Ambas apresentam seis picos no cromatograma na região de monitoramento de flavonóides, desses seis picos, pelo menos quatro apresentam tempos de retenção muito próximos que podem corresponder aos mesmos compostos fenólicos presentes na amostra. Isso é totalmente possível visto que apesar de serem amostras de mel produzido por abelhas de espécies diferentes, elas habitam o mesmo local geográfico no meliponário do campus do INPA e podem ter acesso às mesmas espécies de plantas para a coleta do néctar e resina. Podendo ser um indício da utilização, por

parte das distintas espécies de abelhas estudadas, de floradas ou resinas de espécies vegetais diferentes que produzem essas substâncias em maior quantidade durante essa época do ano.

Porém, a amostra 1C-2 apresentou maior atividade antimicrobiana, e os dois picos com tempos de retenção de 22.376 min. e 24.740 min, que anteriormente nesta discussão fora atribuída uma possível participação nesta atividade possa na realidade não estar mais envolvidos nesta atividade visto que dois picos com tempos de retenção muito próximos 22.066 min. e 24.438 min. são observados na amostra 2C-2 de menor atividade, e podem corresponder aos mesmos compostos e quase com as mesmas quantidades. Portanto a atividade da amostra 1C-2 pode ser atribuída a compostos que não foram detectados no comprimento de onda de 290nm.

Os cromatogramas dos méis comerciais são apresentados nas figuras abaixo, com os tempos de retenção dos picos da região de monitoramento de flavonóides.

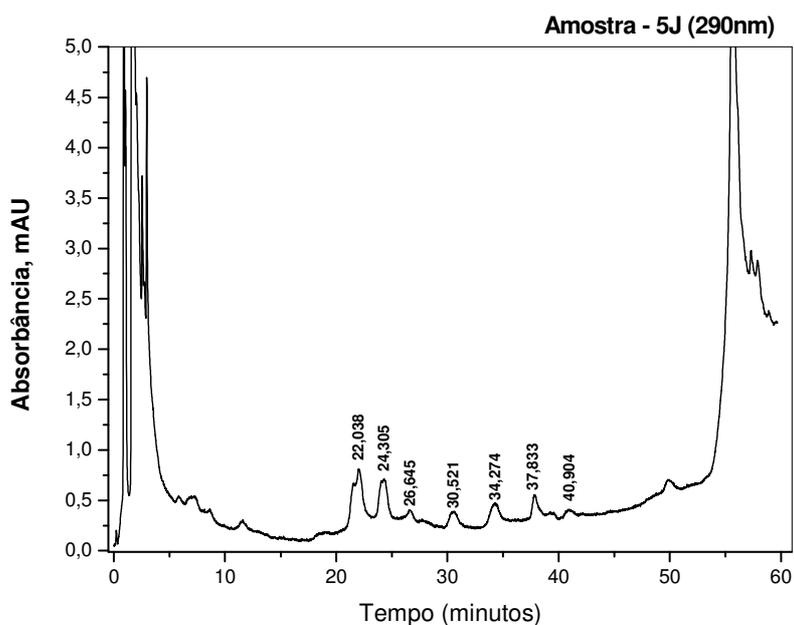


Figura 23. Cromatograma do extrato do mel amostra 5J.

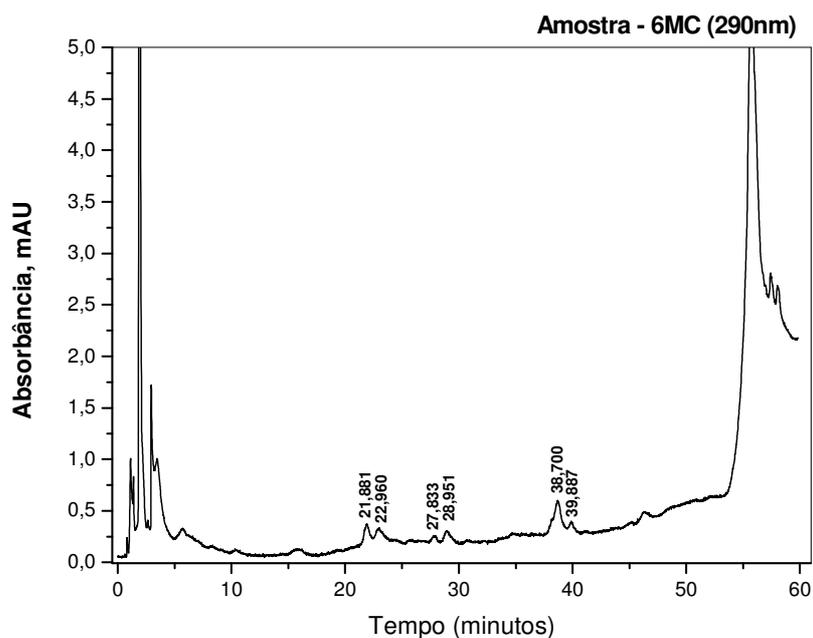


Figura 24. Cromatograma do extrato do mel amostra 6MC.

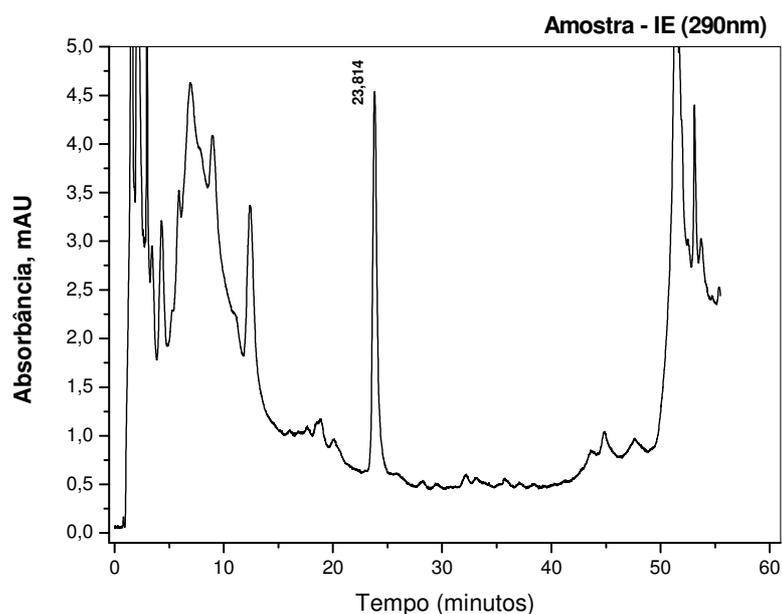


Figura 25. Cromatograma do extrato do mel amostra IE.

A amostra 5J apresentou sete picos na região de monitoramento de flavonóides, a amostra 6MC seis picos e a amostra IE um pico apenas, porem o mel de maior atividade antimicrobiana dentre os méis comerciais é o mel IE, e parte dessa atividade pode ser atribuída a esse composto que tem tempo de retenção de 23.814 min. nenhum dos outros cromatogramas apresentados tem um pico com um tempo de retenção próximo a este. A amostra 5J foi produzida pela abelha sem ferrão *Melipona subnitida* na reserva do Biotupé e apresenta dois picos com tempos de retenção de 22.038 min. e 24.306 min. muito próximos

aos dois picos exibidos pelas amostras 1C-2 e amostra 2C-2 também produzidas por duas espécies de abelhas sem ferrão do campus do INPA. Isso pode significar que essas três espécies de abelha sem ferrão podem ter hábitos de visitar plantas da mesma espécie para coletar o néctar e resina, com isso os mesmo compostos correspondentes a esses picos seriam levados ao mel. Como esse mel não teve uma boa atividade antimicrobiana assim como o mel 2C-2, isso pode reforçar a hipótese de que esses dois picos não estão envolvidos na atividade antimicrobiana da amostra 1C-2, se esses picos correspondessem a compostos que estivessem atribuindo a atividade antimicrobiana a amostra 1C-2, seria de se esperar que essa atividade fosse refletida nas outras amostras.

6.3.1 Detecção com λ de 340nm

Os cromatogramas da amostra 1C (figura 26) apresenta cinco picos com tempos de retenção distintos na região de monitoramento dos flavonóides e a amostra 1C-2 (figura 27), apresenta três picos, analisando os tempos de retenção de cada um desses picos, pode-se perceber que nenhum deles exibem tempos de retenção muito próximos, indicando que são possíveis compostos fenólicos específicos de cada mel e que só absorvem neste comprimento de onda. Como a amostra 1C-2 exibiu maior atividade antimicrobiana existe uma grande possibilidade de que esses picos possam corresponder a compostos fenólicos com maior atividade. O pico com tempo de retenção de 22.098 min., na amostra 1C-2 da figura 27, é a substância que mais absorve neste comprimento de onda quando comparado com os outros picos das outras amostras indicando uma maior quantidade dessa substância nesta amostra. Essa observação fica mais clara quando se faz a sobreposição dos cromatogramas dessas duas amostras na figura 28. Analisando essa figura fica clara a diferença dos cromatogramas com nenhum dos picos com tempos de retenção próximos, e a maior absorção do pico com tempo de retenção 22.098 min., na amostra 1C-2.

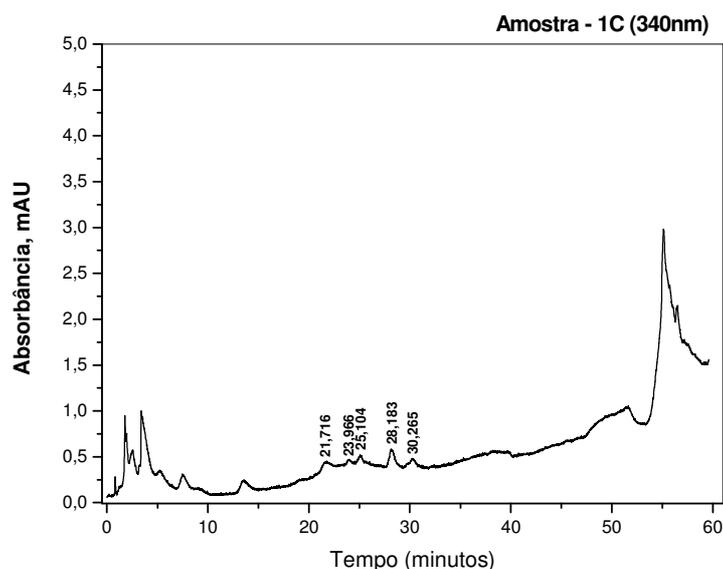


Figura 26. Cromatograma do extrato do mel amostra 1C a 340nm.

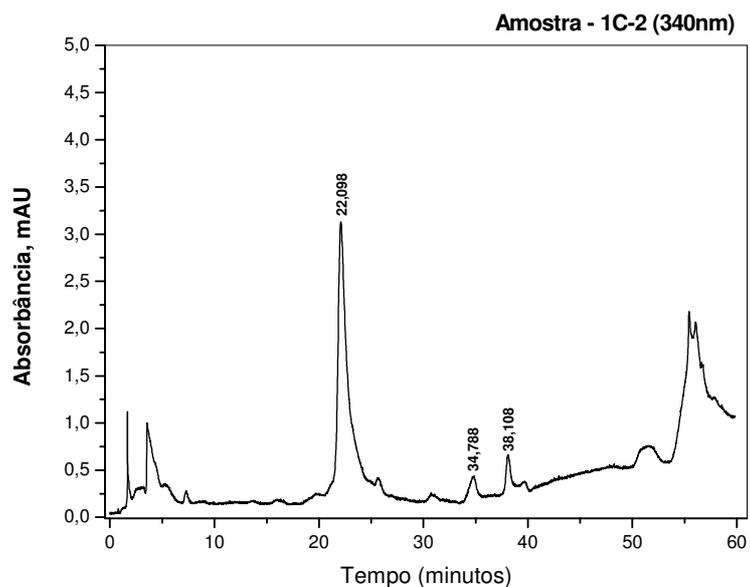


Figura 27. Cromatograma do extrato do mel amostra 1C-2 a 340nm.

Quando se faz a sobreposição dos cromatogramas da amostra 1C-2 nos dois comprimentos de onda 290 e 340nm na figura 29, pode-se observar uma grande semelhança de alguns picos de cada cromatograma.

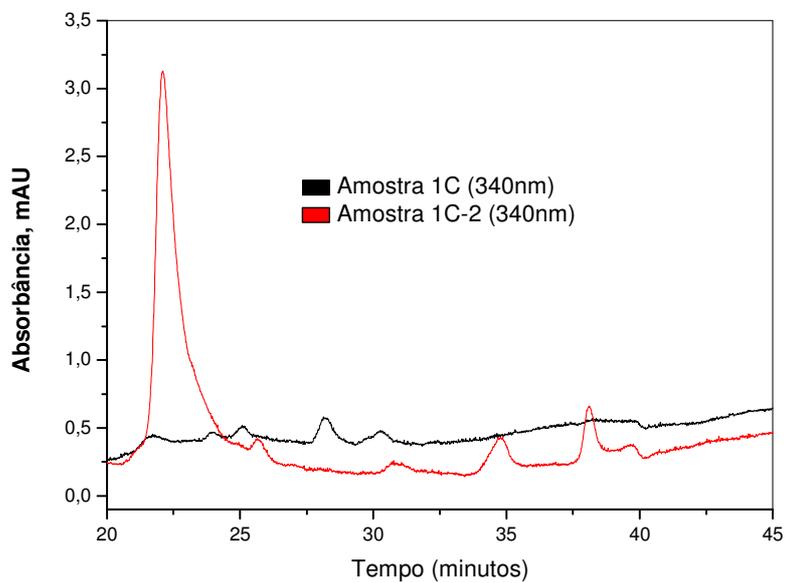


Figura 28. Sobreposição dos cromatogramas 1C e 1C-2 a 340nm.

Analisando a figura 29, pode-se observar que alguns picos que absorvem no comprimento de onda de 290nm também absorvem no comprimento de onda de 340nm. A maioria dos compostos fenólicos absorve a comprimentos de onda 290nm, porém muitos estudos recomendam usar comprimentos de onda diferentes utilizando um detector de *photodiode array*, para alcançar uma boa sensibilidade dos compostos analisados, e uma seletividade satisfatória que depende das combinações polifenólicas contida no mel em questão (FERRERES et al., 1994, WESTON et al., 2000). O pico com tempo de retenção 22.376 min., no cromatograma 1C-2 a 290nm, parece ser mais sensível ao comprimento de onda de 340nm exibindo um pico bem maior com tempo de retenção de 22.098min., no cromatograma a 340nm, ou ainda existe a possibilidade de que sejam compostos diferentes.

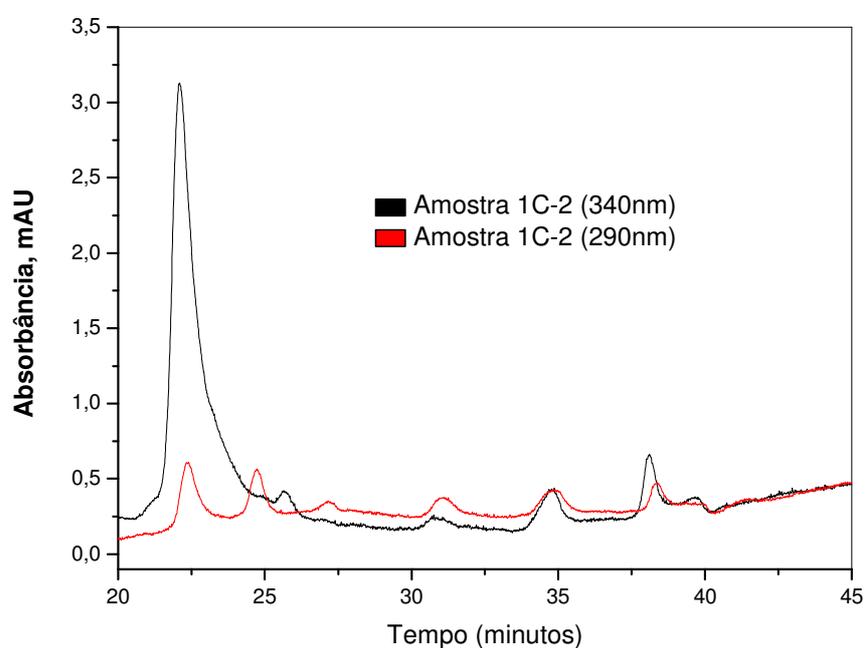


Figura 29. Sobreposição dos cromatogramas 1C-2 a 340nm e 1C-2 a 290nm

As figuras 30 e 31 mostram os cromatogramas das amostras de mel 2C e 2C-2 a 340nm.

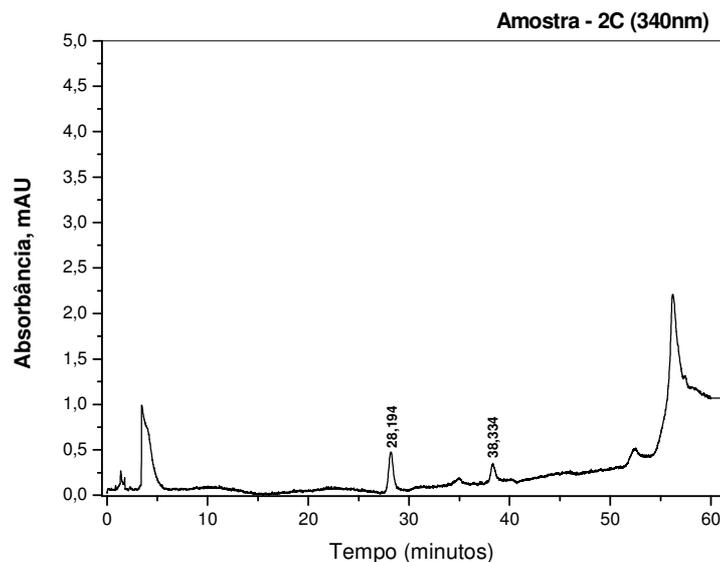


Figura 30. Cromatograma do extrato do mel amostra 2C a 340nm.

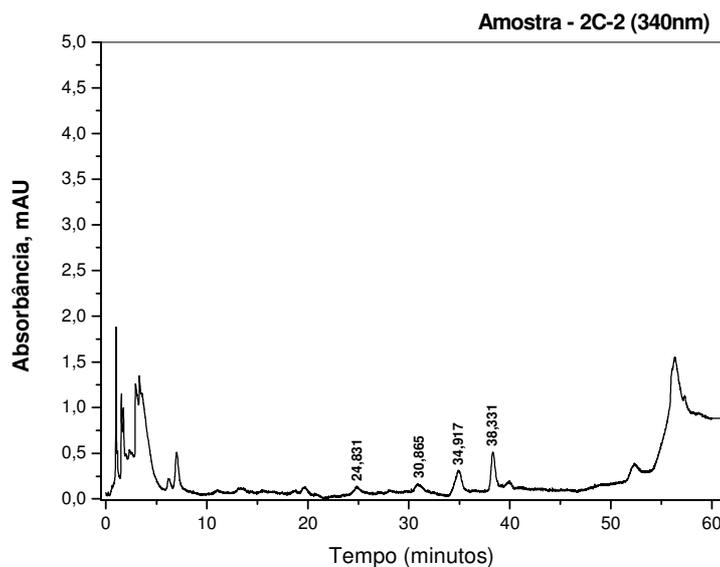


Figura 31. Cromatograma do extrato do mel amostra 2C-2 a 340nm.

Nos cromatogramas acima a amostra 2C exibe dois picos com tempos de retenção distintos e a amostra 2C-2 apresenta quatro picos a 340nm, dentre essas amostras um pico parece ser comum entre essas duas amostras com tempos de retenção de 38.334 min. na amostra (2C) e 38.331 min., na amostra (2C-2). Quando comparado com o comprimento de onda de 290nm somente a amostra 2C-2 apresentou três picos com tempos de retenção muito próximos, indicando que esses compostos absorvem nos dois comprimentos de onda.

As amostras 5J e 6MC, figuras 32 e 33 respectivamente, não apresentaram nenhum composto na faixa de monitoramento dos flavonóides absorvendo no comprimento de onda de 340nm, quando comparado com os cromatogramas de 290nm.

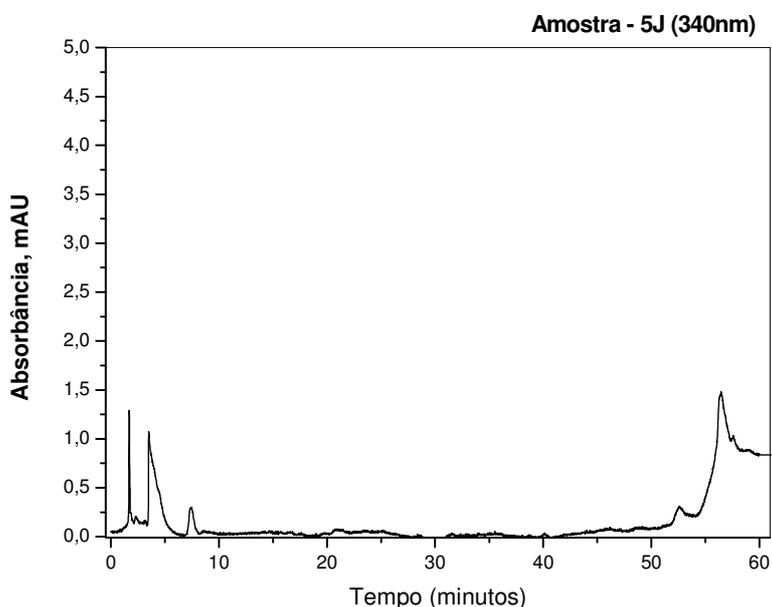


Figura 32. Cromatograma do extrato do mel amostra 5J a 340nm.

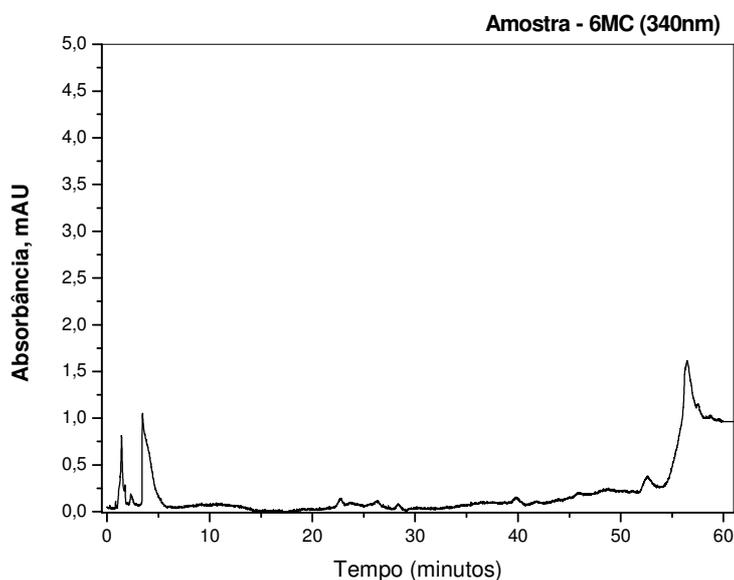


Figura 33. Cromatograma do extrato do mel amostra 6MC a 340nm.

A amostra IE que é a amostra de maior atividade entre os méis comerciais, apresenta quatro picos na faixa de monitoramento de flavonóides com diferentes tempos de retenção, enquanto que a mesma amostra a 290nm exibiu apenas um pico. Indicando que os compostos fenólicos desta amostra absorvem melhor nessa faixa de 340nm do espectro

(figura 34). O Pico com tempo de retenção 28.074 min. é um pico com tempo de retenção característico desta amostra, não sendo observado em nenhuma outra, e pode estar relacionado com a maior atividade antimicrobiana desse mel.

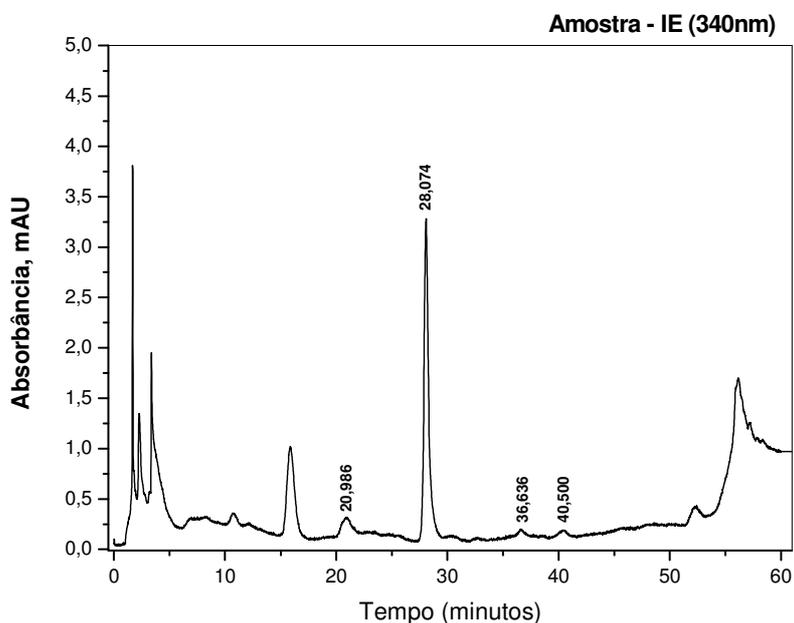


Figura 34. Cromatograma do extrato do mel amostra IE a 340nm.

Foram utilizados três padrões de flavonóides para serem identificados nos méis avaliados (rutina, apigenina e pinocembrina) cujo cromatogramas são mostrados nas figuras 35, 36 e 37 respectivamente. A sobreposição dos cromatogramas dos padrões utilizados é mostrada na figura 38.

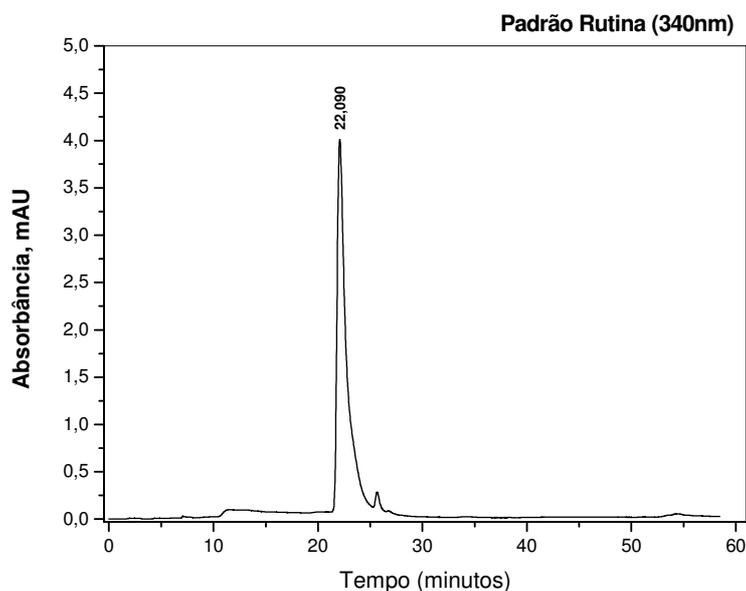


Figura 35. Cromatograma do padrão rutina, detecção a 340nm.

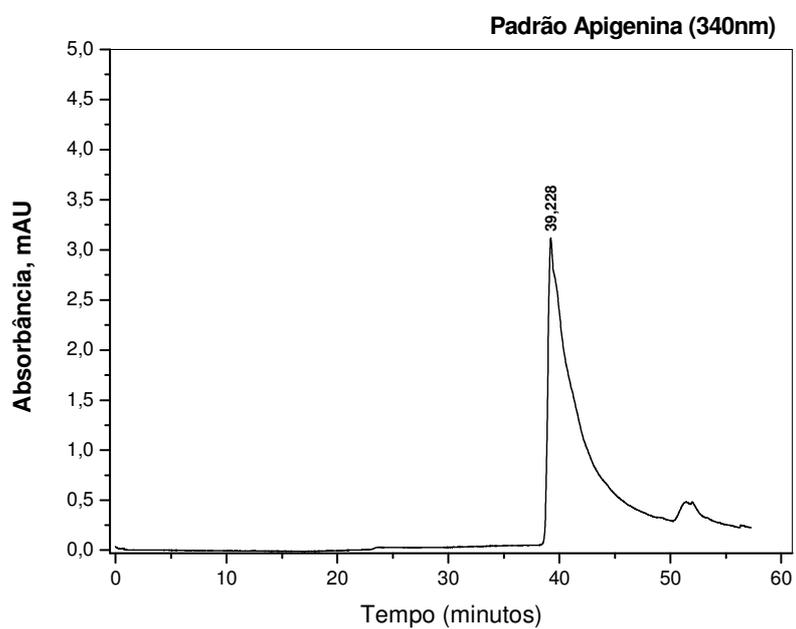


Figura 36. Cromatograma do padrão apigenina, detecção a 340nm.

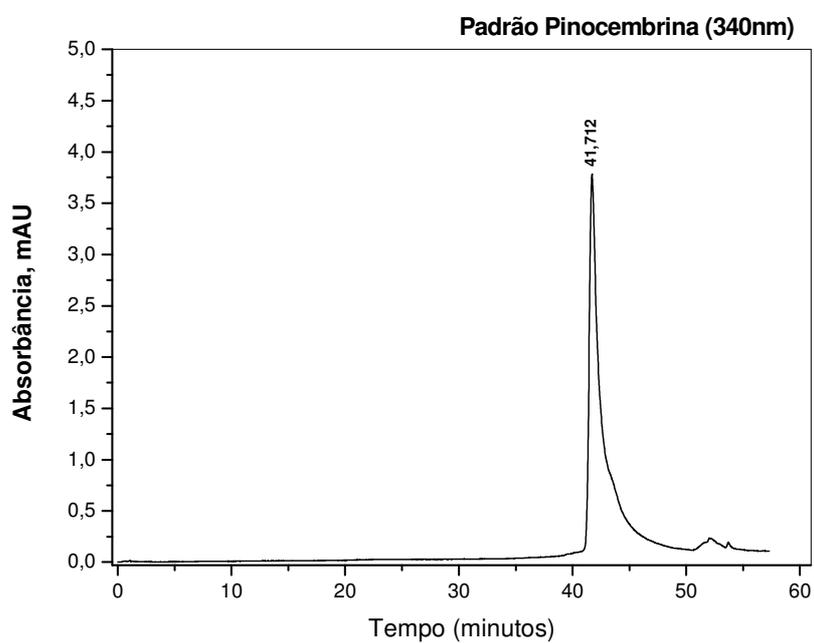


Figura 37. Cromatograma do padrão pinocembrina, detecção a 340nm.

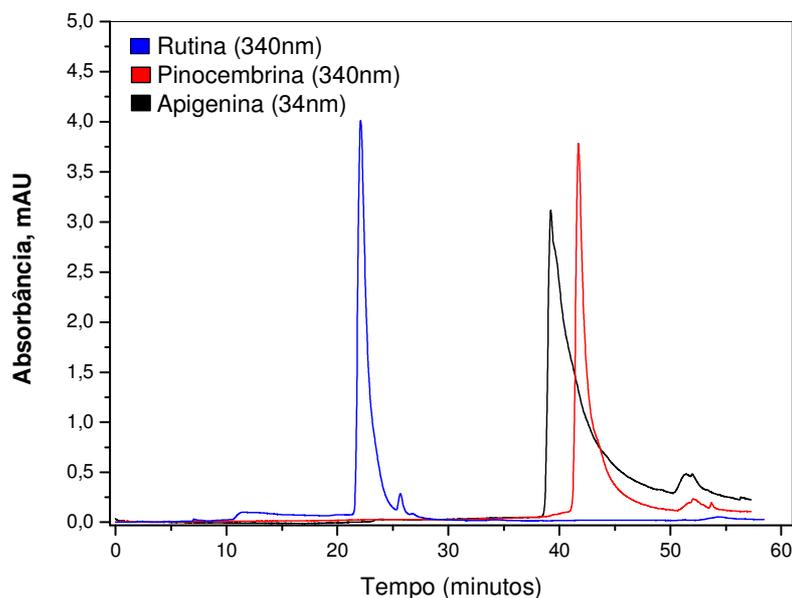


Figura 38. Sobreposição do cromatograma dos padrões a 340nm.

Os padrões apresentaram picos máximos de absorção a 340nm com tempos de retenção distintos, por esse motivo usamos este comprimento de onda para identificar sua presença nos cromatogramas dos méis.

Fazendo a análise dos cromatogramas, comparando os tempos de retenção e fazendo a sobreposição dos cromatogramas, foi observado que em nenhum dos méis foram identificados os flavonóides pinocebrina e apigenina. Porém, foi possível identificar um pico na amostra 1C-2 (*Melipona compressipes manaosensis*) com tempo de retenção de 22.098 min., figura 27, que é muito próximo ao tempo de retenção do padrão rutina 22.090 min. da figura 35, portanto esse é um pico que provavelmente correspondente ao flavonóide rutina, no comprimento de onda de 340nm.

Para comprovar a hipótese de que este pico poderia corresponder ao flavonóide rutina utilizamos a técnica de adição de padrão na amostra, onde adicionamos mais 10µL do padrão rutina à amostra e injetamos outra vez na CLAE, e foi observado que o pico da amostra aumentou sem deformação (figura 39), indicando a grande possibilidade de que aquele pico poderia corresponder ao flavonóide rutina, esse procedimento foi repetido mais três vezes.

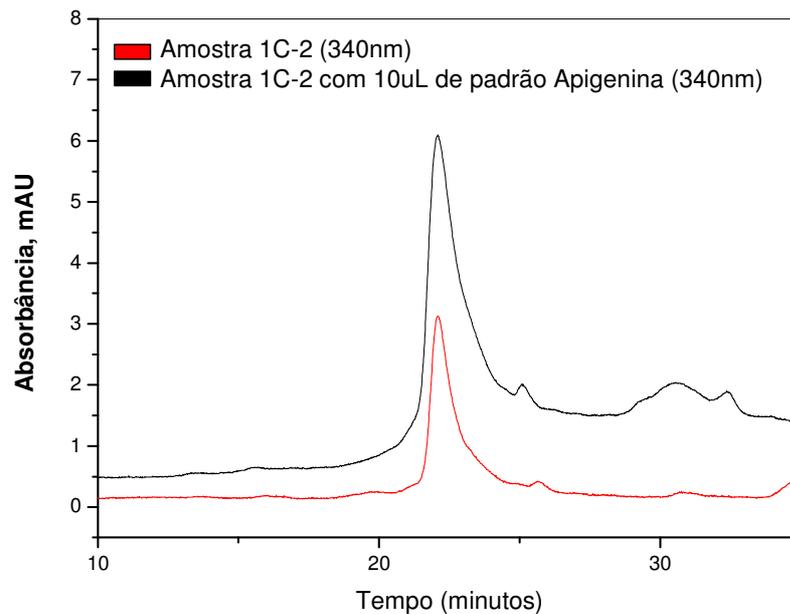


Figura 39. Cromatograma da amostra 1C-2, após a utilização da técnica de adição do padrão rotina.

Embora a rutina tenha sido identificada no mel de maior atividade antimicrobiana, não existem ainda relatos científicos que comprovem sua atividade, porém esse flavonóide apresenta muitas propriedades terapêuticas associada à melhora nos sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados com doenças hemorrágicas ou de hipertensão, além de uma boa ação antioxidante (PATHAK et al., 1991)

A rutina é um flavonóide glicosilado pertencente ao subgrupo dos flavonóis, junto à apigenina e pinocembrina são encontrados na própolis ou cerúmen produzido pelas abelhas do gênero *Melipona*, portanto não estão relacionados à origem floral do mel, pois para a produção de própolis e cerúmen estas abelhas usam exudatos e resinas produzidas por outras partes das plantas, dificilmente o néctar ou pólen das flores (SOLER et al., 1995; VIT et al., 1997), sugerindo sua transferência da resina para mel. Esta transferência é facilitada porque o mel das abelhas sem ferrão é armazenado em potes construídos com misturas de resinas e cera como mostrado na figura 6. Porém, devem ser considerados fatores como tempo de contato e temperatura ao estudar as proporções de transferência de flavonóides glicosilados de cerúmen para mel, e observar se a idade do mel irá variar o perfil de combinações de flavonóides.

Estas observações estão de acordo com resultados obtidos em pesquisas realizadas com várias espécies de abelhas sem ferrão da Venezuela (VIT et al., 1997). Mas esse é o primeiro relato da presença do flavonóide rutina no mel de abelha sem ferrão do Brasil.

São exigidos vários fatores para explorar a ligação entre os flavonóides característicos de méis de abelha sem ferrão e o papel provável deles nas propriedades antibacterianas destes méis. Controles precisos deveriam considerar a ação sinérgica de flavonóides estritamente com outros componentes do mel, por causa da complexidade deste produto natural.

A maior quantidade de picos possivelmente correspondente a compostos fenólicos foi observada nos méis de abelha sem ferrão, indicando o uso de uma maior diversidade de recursos florais ou uma composição de flavonóides mais rica do néctar explorado, quando comparado com méis de *A. mellifera*.

O potencial antimicrobiano de combinações fenólicas ao invés de utilizar moléculas fenólicas isoladas, de um modo geral, já é bem conhecido, extratos de fenóis totais podem ser mais ativos do que utilizar componentes isolados, desde que a bioatividade de um componente individual possa mudar na presença de outro componente nas combinações do extrato (BORCHERS et al., 2004), correspondendo a um efeito sinérgico (RAUHA et al., 2000; PEREIRA et al., 2006). Neste trabalho os méis foram estudados sem que houvesse fracionamento para determinar a atividade antimicrobiana. Visto que o mel integro pode ser mais ativo que seus componentes isolados, exercendo assim um possível efeito sinérgico.

Hoje em dia a qualidade do mel e da própolis depende de sua composição química e origem floral. O conteúdo de seus compostos fenólicos como flavonóides e ácidos fenólicos são fortemente afetados pela sua origem floral, geográfica e características climáticas do local. Por isto argumenta-se hoje, que a identificação e quantificação dos seus compostos fenólicos são de grande interesse. Além disso, eles têm uma capacidade antioxidante e antimicrobiana muito importante que pode ser proveniente de seus polifenóis como flavonóides e ácidos fenólicos.

7. CONCLUSÕES

- O mel da espécie de abelha *Melipona compressipes manaosensis*, mostrou uma boa atividade frente a uma cepa Gram-positiva e as cepas Gram-negativas comparado ao mel comercializado IE, que inibiu somente as cepas Gram-negativas.

- Todas as amostras de mel que apresentaram atividade antimicrobiana no teste de macrodiluição em tubo, demonstraram uma concentração mínima bactericida, indicando que a atividade exercida por essas amostras de mel são do tipo bactericida.

- O método de macrodiluição em tubo apresentou maior sensibilidade nos testes antibacterianos comparado com o método de difusão. Indicando a possível atividade antimicrobiana associada a compostos mais apolares, que tem dificuldade de se difundir no ágar.

- O flavonóide rutina foi identificado por CLAE apenas na amostra de mel da abelha *Melipona compressipes manaosensis*, esse é o primeiro relato da presença desse flavonóide no mel de abelhas no Brasil, e a primeira tentativa de caracterização fenólica do mel dessas duas espécies de abelha sem ferrão. No entanto, vários picos foram revelados na região considerada de monitoramento dos flavonóides nos cromatogramas, e podem estar relacionados a possíveis compostos fenólicos.

- Picos característicos nas amostras 1C-2 e IE, méis com maior atividade antimicrobiana revelados nos nossos estudos, podem estar relacionados com a atividade antimicrobiana desses méis, porém para comprovar isso teríamos que retirar as frações de cada pico e testar separadamente.

- Nossos resultados apontam para uma possível ação sinérgica dos vários fatores antimicrobianos encontrados no mel como a osmose, pH ácido, presença de compostos fenólicos e produção de peróxidos de hidrogênio, contra as cepas bacterianas avaliadas neste trabalho.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIOT, M.J.; Aubert, S.; Gonnet, M.; Tacchini, M. Les composés phénoliques des miels: étude préliminaire sur identificatio et la quantification par familles. **Apidologie**, v.2, n. 20, p.115-125, 1989.

ALLEN K.L.; MOLAN P.C; REID G.M. A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. **J. Pharm. Pharmacol.** V.43, p. 817-822, 1991.

ALLEN, K. L.; MOLAN, P.C. The sensitivity of mastitis-causing bacteria to the antibacterial activity of honey. **New Journal of agricultural Research**, v. 40, p.537-540, 1997.

ANKLAM, E. A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. **Food Chemistry**, v. 63, n.4, p.549-502, 1998.

ARTS, I.C.W.; HOLLMAN, P.C.H.; FESKENS, E.J.M.; MESQUITA B.H.B.; KROMHOUT, D. Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the zutphen elderly study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 227-232, 2001.

AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Research**, v. 22, p.1041-1047, 2002.

AL-JABRI A.A.; NZEAKO B.; AL-MAHROOQI, B. In vitro antibacterial activity of mani and African honey. **Br. J. Biomed. Sci.**, v.60, n.1, p.1-4, 2003.

AL-WALLI, N.S.; AKMAL, M.; AL-WALLI, F.S.; SALOOM, K.Y.; ALI, A. The antimicrobial potential of honey from United Arab Emirates on some microbial isolates. **Med. Sci.Monit.**, v.11, n.12, p.433-438, 2005.

AGBAJE,E.O.; OGUNSANYA,T.; AIWERIOBA,O.I.R. Convetional use of honey as antibacterial agent. **Annals of African Medicine**, v.5, n.2, p.78-81, 2006.

BOGDANOV S. Determination of pinocembrin in honey using HPLC. **J. Apicult. Res**, v.28 n.1, p. 55-57, 1989.

BOGDANOV, S. Nature and origin of the Antibacterial substances in honey. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v.30, p.748-753, 1997.

BASTIANETTO, S.; QUIRION, R. Natural extracts as possible protective agents of brain aging. **Neurobiology of Aging**, v.23, n.5, p.2635-640, 2002.

BADAWY, O.F.H.; SHAFII, S.S.A.; THARWAT, E.E.; KAMAL, A.M. Antibacterial activity of bee honey and its therapeutic usefulness against *Escherichia coli* 0157:H7 and *Salmonella typhimurium* infection. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v.3, n.23, p.1011-1022, 2004.

BORCHERS, A.T.; KEEN, C.L.; GERSTIWIN, M.E. Mushrooms, tumors, and immunity: an update. **Experimental Biology and Medicine**, v. 229, p.393-406, 2004.

BALTRUSAITYTE, V.; VENSKUTONIS, R. P.; CEKSTERYTE, V. Antibacterial activity of honey and beebread of different origin against *S. aureus* and *S. epidermidis*. **Food Technol. Biotechnol.** v.45, n.2, p. 201-208, 2007.

BASUALDO, C.; SGROY, V.; FINOLA, M.S.; MARIOLLI, J.M. Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. **Veterinary Microbiology**, v.124, p.375-381, 2007.

BOUKRAË, L.; NIAR, A.; BENBAREK, H.; BENHANIFIA, M. Additive Action of Royal Jelly and Honey Against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medicinal Food**, v.11, n.1, p.190-192, 2008.

BLAIR. S. E.; COKCETIN. N. N.; HARRY. E. J.; CARTER. D. A. The unusual antibacterial activity of medical-grade *Leptospermum* honey: antibacterial spectrum, resistance and transcriptome analysis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v.28, p.1199-1208, 2009.

CHIRIFE J.; SCARMATO G.; HERSZAGE L. Scientific basis for use of granulated sugar in treatment of infected wounds. **Lancet**, v.1, p. 560-561, 1982.

CHIRIFE, J.; HERSZAGE, L.; JOSEPH, A.; KOHN, E.S. In vitro study of bacterial growth inhibition in concentrated sugar solutions: microbiological basis for use of sugar

in treating infected wounds. **Antibacterial agents and chemoteraphy**, v.23, n.5, p.766-773, 1983.

CHEN, Y.S.; LEE, C.S.; CHOU, C.T.; CHANG, Y.S. The chemical constituents of the peels of citrus. **Journal of the Chinese Agricultural Chemical Society**, v.32, p.85-88, 1985.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 6. ed. Campinas: Editora UNICANP, 1995.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v.1, p.749-760,1997.

CIOLA R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho HPLC**. 1. ed. São Paulo: Edgard Bülcher, 1998

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4 p.564-582, 1999.

COOPER, R.A.; MOLAN, P.C.; HARDING, K.G. Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.92, n.6, p.283-285,1999.

COOPER, R.A.; MOLAN, P.C.; KRISHNAMOORTHY, L. Manuka honey used to heal a recalcitrant surgical wound. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 20, p.758-759, 2001.

COOPER, R.A.; MOLAN, P.C.; HARDING, K.G. The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. **Journal of Applied microbiology**, v.93, n.5, p.857-863, 2002a.

COOPER R.A.; HALAS E.; MOLAN P.C. The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. **Journal Burns Care Rehab**, v.23, p.366-370, 2002b.

CUNICO, M. M., CARVALHO, J. L. S., KERBER, V. A., HIGASKINO, C. E. K. ALMEIDA, C., MIGUEL, M., MIGUEL, O. G. Atividade antimicrobiana do extrato bruto

etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14, n. 2. p.97-103, 2004.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.26, p.343-356, 2005.

CABRERA, L.; CÉSPEDES, E.; NAVA, R.; RODRIGUEZ, G.O. Actividad antibacteriana no-peróxido de mieles zulianas. **Revista Científica, FCV-LUZ**, v.16, n.5, p.556-563, 2006.

CHAMBERS, J. Topical manuka honey for MRSA-contaminated skin ulcers. **Palliative Medicine**, v.20, p.557, 2006.

CONTI, M.E.; STRIPEIKS, J.; CAMPANELLA, L.; CUCINA, D.; TUDINO, M.B. Characterization of italian honeys (Marche Region) on the basis of their mineral content and some typical quality parameters. **Chemistry Central Journal**, v.1, n.14, p.1-10, 2007.

DEYPERE, H.T.; BRACKE, E.; BOTERBERG, T.; MAREEL, M.M.; NUYTINCK, M.; VENNEKENS, K.; SERREYN, R. Inhibition of tamoxifen's therapeutic benefit by tangeretin in mammary cancer. **European Journal of Cancer**, v.36, n.4, p.73, 2000.

DEMERA J.H.; ANGERT E.R. Comparison of the antimicrobial activity of honey produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* from different phytogeographic regions of Costa Rica. **Apidologie**, v.35, p. 411-417, 2004.

DIXON, B. Bacteria can't resist honey. **The lancet Infectious diseases** v. 3, February 2003. Disponível em: <<http://infection.thelancet.com>>. Acesso em: 27 de setembro. 2008.

EFEM, S.E.E. Clinical observations on the wound healing properties of honey. **The British Journal of Surgery**, v.75, n.7, p.679-681, 1998.

ESTRELA, C.R.A. **Eficácia antimicrobiana de soluções irrigadoras de canais radiculares**. Dissertação de Mestrado - Instituto de Patologia Tropical e de Saúde Pública de Goiânia, Goiás, 2000.

FUKUI H, GOTO K, TABATA M. Two antimicrobial flavanones from the leaves of *Glycyrrhiza glabra*. **Chem. Pharm. Bull**, v.36, n. 10. p.4174-4176, 1988.

FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; SOLER, C.; GARCIA-VIGUEIRA, C.; ORTIZ, A.; TOMÁS-LORENTE, F. A simple extractive technique for honey flavonoid HPLC analysis. **Apidologie**, v.25, p. 21-25, 1994.

FRENCH, V.M.; COOPER, R.A.; MOLAN, P.C. The antibacterial activity of honey against coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.228-231, 2005.

GHELDOLF, N.; WANG, H.; ENGESETH, N.J. Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.5870-5877, 2002.

GONÇALVES, A.L.; FILHO, A.A.; MENEZES, H. Atividade antimicrobiana do mel da abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). **Arq. Int. Biol.**, v.72, n.4, p.455-459, 2005.

GOMÉZ-CARAVACA, A.M.; GÓMEZ-ROMERO, M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, n.4, p.1220-1234, 2006.

HAYDAK, M.H.; PALMER, L.S.; TANQUARY, M.C.; VIVINO, A.E. Vitamin content of honeys. **Journal of Nutrition**, v.23, n.6, p.581-588, 1942.

HAFFEJEE, I. E.; MOOSA, A. Honey in the treatment of infantile gastroenteritis. **British medical journal**, v. 290, n. 22, p.1866-1867, 1985.

HIRANO, T.; ABE, K.; OKA, K. Citrus flavone tangeretin inhibits leukaemic HL-60 cell growth partially through induction of apoptosis with less cytotoxicity on normal lymphocytes. **British Journal of Cancer**, v.72, n.6, p.1380-1388, 1995.

HERNÁNDEZ, N. E., TERESCHUK, M.L., ABDALA, L.R. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafí Del Valle (Tucumán, Argentina). **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, n.1-2, p.317-322, 2000.

HOUGHTON, P. J.; WOLDEMARIAM, T. Z.; DAVEY, W.; BASAR, A.; CLARA, L. Quantitation of the pinocembrin content of propolis by densitometry and high performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis**, v.6 n. 4, p.115-125, 2007.

HENRIQUES. A. F.; JENKINS. R. E.; BURTON. N. F.; COOPER. R. A. The intracellular effects of manuka honey on *Staphylococcus aureus*. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v.29, p.45-50, 2010.

KENJERIC, D.; MANDIC, M.; PRIMORAC, L.; CACIC, FRANE. Flavonoid pattern of sage (*Salvia officinalis* L.) unifloral honey. **Food Chemistry**, v. 110, p.187-192, 2008.

IWASE, Y.; TAKEMURA, Y.; JU-ICHI, M.; YANO, M.; ITO, C.; FURUKAWA, H.; MURUKAINAKA, T.; KUCHIDE, M.; TOKUDA, H.; IVISHINO, H. Cancer chemopreventive activity of 3, 5, 6, 7', 8', 3', 4'-heptamethoxyflavone from the pul of Citrus plant. **Cancer letter**, v.163, p.7-9, 2001.

JAMES OBO'L; SEGREE W.; VENTURA A.K. Some antibacterial properties of Jamaican honey. **W. I. Med. Journal**, v.21, n.7, p. 7-17, 1972.

KARAYIL S.; DESHPANDE S.D.; KOPPIKAR G.V. Effect of honey on multidrug resistant organisms and its synergistic action with three common antibiotics. **J. Postgrad. Med.** v.44, p.93-97, 1998.

KOTKAR, H.M.; MENDKI, P.S.; SADAN, S.V.; JHA, S.R.; UPASANI, S.M.; Maheshwari, v.1. Antimicrobial and pesticidal activity of partially purified flavonoids of *Annona squamosa*. **Pest Management Science**, v.1, p.33-37, 2002.

LUSBY, P.E.; COOMBES, A.L.; WILKINSON, J.M. Bactericidal activity of different Honeys against pathogenic bacteria. **Archives of Medical Research**, v.36, n.5, p.464-467, 2005.

LAMDIM, C. C. **Abelhas: morfologia e função de sistemas**. São Paulo: Editora UNESP, 2009.

MENDES, B. A.; COELHO, E.M. Considerações sobre características do mel de abelhas – Análises e critérios de inspeção. **Informe Agropecuário**, v.9, n.106, p.56-67, 1983.

MOLAN P.C.; SMITH I.M.; REID G.M. A comparison of some New Zealand honeys. **J. Apic. Res.**, v.27, n.4, p. 252–256, 1988.

MOLAN, P.C. The antibacterial activity of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. **Bee World**, v.73, p.5-28, 1992.

MATOS, I., FERRERES, F.; YAO, L.; D'ARCY, B.; CAFFIN, N.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Flavonoids in monospecific eucalyptus honeys from Australia. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, p.4744-4748, 2000.

MIORIN P.L.; LEVY JUNIOR, N.C.; CUSTODIO, A.R.; BRET, W.A.; MARCUCCI, M.C. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus* . **Journal of Applied Microbiology**, v.95, p.913-920, 2003.

MULLAI, V.; MENON, T. Bactericidal activity of different types of honey against clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **The Journal Alternative and Complementary Medicine**, v.13, n.4, p.439-441, 2007.

MAEDAA, Y.; LOUGHREYA, A.; PHILIP, J.A.E ,B. MILLAR, B.C.; RAOD, J.R.; KEARNS, A.; MCCONVILLEF, O.; GOLDSMITHA, C.E.; ROONEYA, P.J.; DOOLEYB, J.S.C.; LOWERY,C.J.; SNELLINGB,W.J.; MCMAHONG, A.; MCDOWELL, D.; MOOREA, J.E. Antibacterial activity of honey against community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). **Complementary Therapies in Clinical Practice** , v.14, p.77–82, 2008.

MICHALKIEWICZ, A.; BIESAGA, M.; PYRZYNSKA, K. Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. **Journal of Chromatography A**, v. 1187, p. 18-24, 2008.

NZEAKO B.C.; HAMDI J. Antimicrobial potential of honey on some microbial isolates. **Med. Sci.** v.2, p.75-79, 2000.

NILFOROUSHZADEH, A.N.; JAFFARY, F.; MORADI, S.; DERAKHSHAN, R.; HAFTBARADARAN, E. Effect of topical honey application along with intralesional injection of glucantime in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **MC Complementary and Alternative Medicine**, v.7, n.13, p.1-4, 2007.

OSATO, M.S.; REDDY, S.G.; GRAHAM, D.Y. Osmotic effect of honey on growth and viability of *Helicobacter pylori*. **Digestive Diseases and Sciences**, v.44, n.3, p.462-464, 1999.

OPLUSTIL, C.P.; ZOCCOLI, C.M.; TOBOUTI, N.R.; SINTO, S.I. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. 2.ed. São Paulo: Savier, 2004.

OLAITAN, P.B.; ADELEKE, O.E.; OLA, I.O. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. **African Health Science**, v.7, n.3, p.159-165, 2007.

PATHAK, D.; PATHAK, A.; SINGLA, A.K. Flavonoids as medical agents: recent advances. **Fitoterapia**, Amsterdam, v.57, n.5, p. 371-389, 1991.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v.18, n.12, p.1995-2018, 1998.

PEREIRA, J.A.; PEREIRA, A.P.G.; FERREIRA, I.C.F.R.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.; ESTEVINHO, L.; BENTO, A. Table olives from Portugal: compounds, antioxidant potential, and antimicrobial activity. **Journal Agricultural and Food Chemistry** v. 54, p. 8425-8431, 2006.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997.

RAUHA, J.P.; REMES, S.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; KÄHKÖNEN, M.; KUJALA, T.; PIHLAJA, K.; VUORELA, H.; VUORELA, P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v.56, p. 3-12, 2000.

SIDDIQUI, I.R.; FURGALA, B. Isolation and characterization of oligosaccharides (disaccharides) from honey. **J. Apic. Res.**, v.6, p.139-145, 1967.

SOLER, C.; GIL, M.L.; GARCÍA-VIGUEIRA, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Flavonoid patterns of French honeys with different floral origin. **Apidologie**, v.26, p.53-60, 1995.

SHIRLEY, W.B. Flavonoid biosynthesis: “new” function for an “old” pathway. **Trends in Plant Science**, v. 1, p. 377-381, 1996.

SATO, Y.; SUZAKI, S.; NISHIKAWA, T.; KIHARA, M.; SHIBATA, H.; HIGUTI, T.; Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J. Ethnopharmacol**, v.72, p.483-488, 2000.

SUBRAHMANYAM M.; HEMMADY A.; PAWAR S.G.; Antibacterial activity of honey on bacteria isolated from wounds. **Ann. Burns Fire Dis.**v.1, p.22-24, 2001.

SELÇUK, H., NEVIN, K. Investigation of antimicrobial effect of honey collected from various regions of Tukey. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.5, n.3, p.325-328, 2002.

SNOW, M.J.; MANLEY-HARRIS, M. On the nature non-peroxide antibacterial activity in New Zealand manuka honey. **Food Chemistry**, v.84, p.145-147, 2004.

SIMON, A.; SOFIKA, K.; WISZNIEWSKY, G.; BLASER, G.; BODE, U.; FLEISCHHACK, G. Wound care with antibacterial honey (medihoney) in pediatric hematology-oncology. **Support Care Cancer**, v.14, p.91-97, 2006.

SILVEIRA, L.M.S.; OLEA, R.S.G.; MESQUITA, J.S.; CRUZ, A.L.N.; MENDES, J.C. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Rev. Bras. Farm.**, v.90, n.2, p.124-128, 2009.

TOMAS-BARBERAN, F.A.; MARTOS, I.; FERRERES, F.; RADOVIC, B.S.; ANKLAM, E. HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys. **J Sci Food Agric.**, v.81, p.485-496, 2001.

- THEUNISSEN, F.; GROBLER, S.; GEDALIA, I. The antifungal action of three South African honeys on *Candida albicans*. **Apidologie**, v.32, p.371-379, 2001.
- TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. São Paulo: Atheneu, 2001.
- TAVARES, J. C. **Microbiologia e farmacologia simplificada**. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Atmed, 2004.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.F.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- UGAZ, O.L. Investigación fitoquímica, **Métodos en el estudio de productos naturales**. Lima: Pontificia Universidad Católica Del Peru, 1998.
- VORLOVÁ, L.; CELECHOVSKÁ, O. Activity of enzymes and trace element content in bee honey. **Acta Vet.**, v.71, p.375-378, 2002.
- VISAVADIA, B.G.; HONEYSETT, J.; DANFOT, M.H. Manuka honey dressing: an effective treatment for chronic wound infections. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.46, n.1, p. 55-56, 2006.
- VIT, P.; SOLER, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Profiles of phenolic compounds of *Apis mellifera* and *Melipona spp.* honeys from Venezuela. **Z Lebensm Unters Forsch A**, v.204, p. 43-47, 1997.
- YAO, L.; DATTA, N.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; FERRERES, F.; MATOS, I., SINGANUSONG, R. Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys. **Food Chemistry**, v. 81, p. 159-168, 2003.
- YAO, L.; JIANG, Y.; SINGANUSONG, R. DATTA, N.; RAYMONT, K. Phenolic acids and abscisic acid in Australian *Eucalyptus* honeys and their potential for floral authentication. **Food Chemistry**, v. 86, p.169-177, 2004.

WHITE, J.W.; SUBERS, M.H.; SHEPARTZ, A.I. The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose oxidase system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.73, p.57-70, 1963.

WILLIX D.J.; MOLAN P.C.; HARFOOT C.G. A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of Manuka honey and other honey. **J. Appl. Bact.** v.73, p.388-394, 1992.

WESTON, R. J.; MITCHELL, K.R.; ALLEN, K.L. Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. **Food Chemistry**, v.64, p. 295-301, 1999.

WESTON, R. J.; BROCKLEBANK, L. K.; LU, Y. Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys. **Food Chemistry**, v. 70, p.427-435, 2000.

WESTON, R. J. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. **Food Chemistry**, v.71, p. 235-239, 2000.

ZUANAZZI, J.S.S. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/Ed. 2000, p.489-515.