



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

VICTOR HUGO CLÉBIS

**EFEITO ANTIBACTERIANO ADITIVO DA ASSOCIAÇÃO
ENTRE OS MÉIS DE *Apis mellifera* LATREILLE
AFRICANIZADA (HYMENOPTERA: APIDAE: APINAE) E
Scaptotrigona bipunctata LEPELETIER, 1836
(HYMENOPTERA: APIDAE: MELIPONINAE)**

Londrina
2017

VICTOR HUGO CLÉBIS

**EFEITO ANTIBACTERIANO ADITIVO DA ASSOCIAÇÃO
ENTRE OS MÉIS DE *Apis mellifera* LATREILLE
AFRICANIZADA (HYMENOPTERA: APIDAE: APINAE) E
Scaptotrigona bipunctata LEPELETIER, 1836
(HYMENOPTERA: APIDAE: MELIPONINAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Nakazato

Londrina
2017

VICTOR HUGO CLÉBIS

**EFEITO ANTIBACTERIANO ADITIVO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE OS
MÉIS DE *Apis mellifera* LATREILLE AFRICANIZADA
(HYMENOPTERA: APIDAE: APINAE) E *Scaptotrigona bipunctata*
LEPELETIER, 1836 (HYMENOPTERA: APIDAE: MELIPONINAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Edson Aparecido Proni
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Lucy Megumi Yamauchi Lioni
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina-PR, 17 de fevereiro de 2017.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Clébis, Victor Hugo.

Efeito antibacteriano aditivo da associação entre os méis de *Apis mellifera* Latreille africanizada (Hymenoptera: Apidae: Apinae) e *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) / Victor Hugo Clébis. - Londrina, 2017. 69f. : il.

Orientador, Gerson Nakazato.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2017. Inclui bibliografia.

1. Antibacterianos - Tese. 2. Mel - Tese. 3. *Scaptotrigona bipunctata* - Tese. 4. *Apis mellifera* - Tese. I. Nakazato, Gerson. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

“Dedico esta tese a todos que me acompanharam durante minha vida. Dedico aos meus pais, Érica e Milton, que sempre apoiaram meus esforços com amor e dedicação; além de me mostrarem como amar alguém. Aos meus colegas de laboratório, que mostraram como a ciência é uma obra feita em conjunto. E aos meus amigos, que mostraram como o mundo pode ser um lugar acolhedor.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a meus pais, Milton e Érica, pela minha criação e pelo investimento tanto financeiro quanto emocional nos meus estudos. Que esse trabalho demonstre ao menos parte de minha gratidão por tudo que fizeram por mim. O amor deles me mostrou o que é amar alguém e lutar por esse amor, algo que foi essencial para que pudesse apresentar esse documento ao mundo.

Juntamente com meus pais, agradeço meu irmão Pedro por me ensinar como é importante sorrir ao mundo não importando qual a dificuldade e falar o que eu às vezes precisava ouvir.

Agradeço também aos meus tios, Noélia e Osni, por sempre estarem por perto e oferecerem ajuda quando necessária para nossa família. E para todos os tios, as tias, primos e primas que estão distantes, mas cujos momentos serão guardados para sempre.

Ao professor Gerson Nakazato, deixo aqui meu obrigado por oferecer o espaço do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada da UEL (NIP3) e por toda a orientação do final de meu curso de graduação até hoje. Sua orientação sempre visou ao meu desenvolvimento tanto profissional quanto pessoal, não havendo limites para sua disposição em sanar minhas dúvidas, mesmo quando seria necessário acompanhar experimentos para tal. Com esse acompanhamento, pude aprender a necessidade de tomar rédeas dos meus projetos e da minha vida e a ver como se faz parte do desenvolvimento de um novo produto juntamente com a comunidade científica.

Assim como ao meu orientador, tenho gratidão pela professora Renata Katsuko Takayama Kobayashi. Além de oferecer o espaço do NIP 3, foi muito gratificante minha participação no projeto de ensino Ensinando Microbiologia ao Ensino Médio. Graças a ele, aprendi como pode ser recompensador e até prazeroso lecionar jovens; o cuidado e a dedicação em ensinar alguém, e o quão grande é o potencial da juventude brasileira.

Aos doutorandos Erick Kenji Nishio e Sara Scandorieiro, agradeço pelo acompanhamento durante o experimento. Como pesquisadores atuando na área de antibacterianos (e, no caso do Erick, especificamente com o mel em si); a

experiência de ambos foi de grande auxílio na interpretação do efeito do mel e na execução das metodologias usadas nesse trabalho.

A todos meus companheiros do Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada da UEL (NIP3), agradeço pelos momentos de trabalho e alegria durante esses três anos. Esse companheirismo me mostrou o lado humano da comunidade científica e como seu desenvolvimento ocorre através do conjunto entre seus vários membros.

Agradeço também aos membros dos Laboratórios de Biologia Molecular de Microrganismos (NIP 5) e aos alunos e professores do Laboratório de Micologia Médica e Microbiologia Bucal (NIP 9) pela parceria e comprometimento no grande trabalho que é o desenvolvimento de um novo antibacteriano. Também gostaria de agradecer ao pessoal do Laboratório de Microscopia Eletrônica e de Microanálise (LMEM), e ao professor Admilton Gonçalves de Oliveira Júnior pela instrução e ajuda na obtenção das imagens pela Microscopia Eletrônica de Varredura.

Aos meus colegas de mestrado, sou grato pela amizade e pelas brincadeiras, que garantiram um fôlego quando estava rodeado de responsabilidades. E também a todos meus amigos, pelas risadas, conversas e por me mostrarem um mundo no qual eu poderia prazerosamente viver.

Aprecio a colaboração dos professores presentes na banca durante a apresentação do meu projeto de dissertação de mestrado. Agradeço novamente o professor Gerson Nakazato pela participação tanto quanto orientador como crítico no decorrer do projeto. Agradeço a professora Lucy Megumi Yamauchi Lioni pela orientação durante a graduação, o convite para entrar no laboratório NIP 3 e o cuidado em comparecer na qualificação desse projeto. E também agradeço ao professor Edson Aparecido Proni pela participação na banca de qualificação, pelas doações de méis e pelas respostas quanto às características dos mesmos.

Agradeço o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia pela oportunidade de trabalhar com excelentes profissionais, cujo apoio me permitiu essa oportunidade. Agradeço à UEL e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio e suporte financeiro para realização deste estudo.

A todos que participaram dessa jornada, que esse trabalho seja meu agradecimento.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Tereza de Calcutá)

CLÉBIS, Victor Hugo. **Estudo da Ação Antibacteriana e Efeito Aditivo da Associação Entre os Méis de *Apis mellifera* Latreille Africanizada (Hymenoptera: Apidae: Apinae) e *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier 1836 (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae).** 2017. 67f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

A resistência bacteriana aos diversos antibacterianos convencionais é um grave problema clínico, que requer a constante busca por novos antimicrobianos. Neste estudo foi avaliada a atividade antibacteriana dos méis produzidos pelas abelhas *Scaptotrigona bipunctata* (HSB) e *Apis mellifera* (HAM), contra bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, e *Pseudomonas aeruginosa*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*). Seis ensaios foram utilizados para avaliar este efeito: 1) Poço-difusão em ágar; 2) Microdiluição em caldo, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM); 3) Técnica de “Checkerboard” (determinação do tipo de atividade antibacteriana da combinação dos méis); 4) Curva de tempo e morte; 5) Microscopia eletrônica de varredura; 6) Produção de peróxido de hidrogênio. Halos de inibição foram observadas para HSB e a combinação HSB/HAM, contra todas as cepas bacterianas utilizadas neste estudo. As CIMs para HAM variaram de 20 a 25% e de 1,25 a 5%, para HAM e HSB, respectivamente. As curvas de tempo e morte mostraram que o HSB teve um efeito bactericida para *S. aureus*, e bacteriostático para *E. coli*, enquanto que o HAM mostrou um efeito bactericida para *E. coli* e bacteriostático para *S. aureus*. A combinação dos méis mostraram um efeito aditivo na atividade antibacteriana, reduzindo pela metade as CIMs de cada mel. Esta combinação também apresentou uma maior capacidade de produzir peróxido de hidrogênio do que os méis individualmente. Diferentes alterações morfológicas foram observadas na superfície bacteriana de *S. aureus* na presença dos méis ou da combinação entre eles. Esses resultados sugerem diferentes mecanismos de atividade antibacteriana do HSB e HAM, e que a combinação destes méis pode ser uma alternativa interessante no controle de infecções bacterianas.

Palavras-chave: Antibacterianos. Mel. *Scaptotrigona bipunctata*. *Apis mellifera*. Efeito aditivo.

CLÉBIS, Victor Hugo. **Study of the Antibacterial Action and Additive Effect of *Apis mellifera* Latreille Africanized (Hymenoptera: Apidae: Apinae) honey *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier 1836 (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) honey.** 2017. 67 p. Dissertation (Master Science in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

The bacterial resistance to several antibacterials is a severe clinical issue which requires the constant search for new antimicrobials. In this study, the antibacterial activities of the honeys produced by the *Scaptotrigona bipunctata* (HSB) e *Apis mellifera* (HAM) bees were evaluated against Gram-negative (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and *Pseudomonas aeruginosa*) and Gram-positive (*Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*) bacteria. Six assays were used to evaluate this effect: 1) Agar well-diffusion; 2) Microdilution assay, for determination of minimal inhibitory concentration (MIC); 3) Checkerboard analysis through microdilution assays employing double antimicrobial gradient were used (to determine of the type of antibacterial activity from combined honeys); 4) Time-kill curve; 5) Staining electronic microscopy; 6) Hydrogen peroxide production. The inhibition zones were observed for HSB and HSB/HAM combined against all bacterial strains used in this study. The MICs ranged from 20 to 25% for HAM, and from 1,25 to 5% for HSB. The time-kill curves showed that the HSB had a bactericidal effect against *E. coli* and a bacteriostatic against *S. aureus*, while the HAM showed a bactericidal effect against *S. aureus* and a bacteriostatic against *E. coli*. The combination of the honeys showed an additive effect on antibacterial activity, decreasing the MICs of the honeys by half. The combination also showed an higher hydrogen peroxide production than the individual honeys. Different morphological alterations were observed in the bacterial surfaces from *S. aureus* treated with either honey or their combination. These results suggest different antibacterial activity mechanisms between the HSB and HAM, and that the combination of these honeys can be an interesting alternative for bacterial infection control.

Key-words: Antibacterial. Honey. *Scaptotrigona bipunctata*. *Apis mellifera*. Additive effect.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 01** - Mecanismos de resistência bacteriana adquiridos por mutações aos antimicrobianos.....25
- Figura 02** - Esquema do modo de transferência horizontal de genes26

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- Figura 01** - Curva de tempo e morte das cepas *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 submetidas a diferentes tratamentos com méis (em log₁₀)60
- Figura 02** - Produção de peróxido de hidrogênio (em mM H₂O₂).....63
- Figura 03** - Imagens de microscopia eletrônica de varredura de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 na presença dos méis das abelhas *Scaptotrigona bipunctata* e *Apis mellifera*.....65

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 01 -	Seletividade de antibacterianos usados.....	22
Tabela 02 -	Exemplos de modos de resistência aos antibacterianos atuais	24

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 01 -	Diâmetros dos halos de inibição e concentrações inibitórias mínimas e dos méis contra diferentes cepas bacterianas.....	59
Tabela 02 -	Concentrações inibitórias mínimas dos méis contra <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> , após tratamento com a catalase.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos para indicar erro padrão
°C	Grau Celsius
°GL	Grau Gay Lussac
≤	Menor ou igual
<	Menor
>	Maior
X	Sinal de multiplicação
+	Sinal de adição
$\frac{\quad}{\quad}$	Fração
µL	Microlitros
µm	Micrometros
®	Registrado
™	Marca Registrada
A.C.	Antes de Cristo
AW	Atividade de água
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
DEAC	<i>Escherichia coli</i> de adesão difusa
DEC	<i>Escherichia coli</i> diarreiogênica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EDA	Ensaio por difusão em ágar
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
EROS	Espécies reativas de oxigênio
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ESBL	Beta-lactamases de espectro estendido
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal

FIC	Concentração inibitória fracionada
FICI	Índice de concentração inibitória fracionada
g	Gramas
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HAM	Mel da abelha <i>Apis mellifera</i>
HSB	Mel da abelha <i>Scaptotrigona bipunctata</i>
iNTS	<i>Invasive non-typhoidal Salmonella</i>
ITU	Infecções de trato urinário
Kg	Quilogramas
KPC	Carbapenemases de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
log	Logaritmo
M	Molar
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
mg	Miligrama
MH	Mueller Hinton
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
n ^o .	Número
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
nm	Nanômetro
NMEC	<i>Escherichia coli</i> associada à meningite neonatal
NO	Óxido nítrico
NTS	<i>Salmonella enterica</i> não-tifóide
OMS	Organização Mundial da Saúde
OprF	<i>Outer membrane porin F</i>
OsO ₄	Tetróxido de ósmio
p < 0,05	Probabilidade menor que 5 %
pH	Potencial de hidrogênio
PR	Paraná
RIF	Rifampicina

rpm	Rotação por minuto
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de Shiga-toxina
Tir	<i>Translocated intimin receptor</i>
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UFC	Unidade formadora de colônia
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
v/v	Porcentagem em volume (volume/volume)
VISA	<i>Staphylococcus aureus</i> com resistência intermediária à vancomicina
VRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à vancomicina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	METAS	19
3	REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1	HISTÓRICO DO DESENVOLVIMENTO DE ANTIBACTERIANOS E DO MEL	20
3.2	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA	23
3.3	BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA E CEPAS RESISTENTES	27
3.3	ESTUDO DO USO ANTIBACTERIANO DO MEL	30
3.3.1	Definição de Mel Quanto sua Manufatura e Composição	30
3.3.2	Estudos Modernos das Propriedades Medicinais do Mel	31
3.3.3	Propriedades Antibacterianas do Mel	33
3.4	OS MÉIS DAS ABELHAS <i>APIS MELLIFERA</i> E <i>SCAPTOTRIGONA BIPUNCATATA</i>	35
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	ARTIGO: EFEITO SINÉRGICO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO E NANOPARTÍCULAS DE PRATA BIOLÓGICAS CONTRA CEPAS BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES	49
6	CONCLUSÃO	68

1 INTRODUÇÃO

Resultados de descobertas empíricas possuem uma histórica relação com o uso de antibacterianos no controle de infecções. Antigamente, a medicina era intimamente relacionada com a teologia, com muitos tratamentos de moléstias envolvendo rituais religiosos, nos quais eram usados diversos produtos. Contudo, já existiam documentos na Antiguidade que discorriam sobre descobertas empíricas quanto à eficácia das diferentes terapias e substâncias; entres os quais podemos destacar a *Matéria Medica “Shennong Bencao Jing”* de Tao Hongjing como o primeiro manual de medicina, e o *Corpus Hippocraticum*, redigido durante a civilização grega. Tais documentos listavam vários tratamentos, descobertos por tentativa e erro; e ambos relatavam o potencial medicinal de aplicações de mel (EATON, 2015; FERREIRA; PAES; LICHTENSTEIN, 2008; FRANCIA; STOBART, 2014; JONES, 2001).

Há relatos do uso do mel como pomada na medicina desde a civilização suméria. O mel também foi usado como forma de tratamentos por civilizações indígenas antes da colonização europeia, e até pelos russos durante a Primeira Guerra Mundial. Mas, apesar de seu uso nunca ter sido cessado, ele foi substituído em grande parte pelos primeiros antibacterianos, como a penicilina, que é usada contra infecções bacterianas até os dias atuais (BOGDANOV, 2016; FERREIRA; PAES; LICHTENSTEIN, 2008; JONES, 2001; SUBRAHMANYAM, 1996).

O surgimento desses antibacterianos foi resultado da análise da antibiose de bactérias por moléculas; descoberta que, por sua vez, só foi possível uma vez que foi comprovado o potencial patogênico de microrganismos em infecções por Robert Koch. As descobertas do cientista no século XIX resultariam na formulação dos postulados de Koch. Descobertas como essas, presentes ao longo do século, assim como um aumento do número de infecções no decorrer do século impulsionaram o estudo pelo controle de infecções. Tais estudos teriam como consequência o desenvolvimento das primeiras práticas médicas, como a lavagem de mão e a desinfecção com fenol (FERREIRA; PAES; LICHTENSTEIN, 2008; LISTER, 1867).

Por exemplo, enquanto era desenvolvido o “salvarsan” por Paul Ehrlich, o primeiro antibacteriano sintético, Jonh Tyndall relatou uma indução de morte ou “dormência” em bactérias na presença do fungo *Penicillium notatum*; um estudo

que posteriormente serviria de base para a descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928 (AMYES, 2001; SEFTON, 2002).

Apesar de trabalhos procurarem elucidar o papel da penicilina nos anos 60; seu uso em massa ocorreu após do desenvolvimento de técnicas de purificação por Norman Heatley (KENNEDY, 2004). O uso da penicilina marcou a “Era Dourada” dos antimicrobianos, que durou entre os anos 40 e 60. Essa época foi caracterizada por várias descobertas de moléculas com capacidade antibacteriana, o que levaria ao controle de várias doenças, como por exemplo, a febre reumática (FERREIRA; PAES; LICHTENSTEIN, 2008; SILVER, 2011; SINGH, 2006).

Entretanto, a “Era dourada” também foi marcada pelo uso intenso dessas substâncias, o que levaria ao surgimento de diversas cepas resistentes. O primeiro caso clínico de resistência ocorreu em 1946, cujo patógeno era uma cepa de *S. aureus* resistente à metilina (MRSA) (LEVY 2002; PALUMBI, 2001). Desde então, o surgimento de cepas resistentes aos antibacterianos estimulou uma constante busca por novas substâncias e terapias para o controle de infecções (FINCH, 2007).

Entre as diversas substâncias com atividade antibacteriana, destacamos o mel. Ele é definido como uma solução açucarada produzida por abelhas e armazenada em favos ou potes das colmeias; e pode ser classificado quanto à origem e ao modo de produção (BRASIL, 2003). E, apesar de seu uso ser relatado desde as civilizações antigas, o estudo das propriedades bactericidas da solução foi retomado apenas por Van Ketel no final do século XIX (DUSTMANN, 1979; STOBART, 2014; JONES, 2001).

Além do potencial antibacteriano do mel, este pode apresentar efeito anti-inflamatório. Para tal, já foram desenvolvidos curativos com mel que demonstraram uma aceleração do processo inflamatório (KASSIM et al. 2010, YUSOF, 2007).

Conforme Nishio et al. (2016), méis de abelhas indígenas sem ferrão como *Scaptotrigona bipunctata* e *S. postica* apresentaram maior efeito antibacteriano do que o mel da abelha *Apis mellifera*. Porém méis de abelhas indígenas possuem um valor comercial mais elevado (ALVES et al., 2005). Em vista disso, comparamos a ação antibacteriana dos méis da abelha indígena sem ferrão *S. bipunctata*, da abelha *A. mellifera* africanizada e da mistura entre esses méis.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar a atividade antibacteriana dos méis de *Apis mellifera* e *Scaptotrigona bipunctata*, e verificar o potencial antibacteriano da combinação dos méis.

2.2 METAS

- Verificar a sensibilidade bacteriana para os méis isolados, assim como a mistura destes.
- Determinar o grau de associação da atividade antibacteriana na combinação dos méis.
- Analisar a cinética do crescimento bacteriano na presença e ausência dos méis.
- Visualizar as alterações morfológicas superficiais bacterianas na presença dos méis.
- Quantificar o peróxido de hidrogênio produzidos nos méis e a sua influência no potencial antibacteriano.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 HISTÓRICO DO DESENVOLVIMENTO DE ANTIBACTERIANOS E O MEL

O desenvolvimento de tratamentos para o controle de doenças acompanhou o desenvolvimento das civilizações desde a Antiguidade. Documentos atribuídos às primeiras civilizações, como a suméria, mostram um empenho por parte de seus autores em recorrer ao uso de substâncias para o tratamento de diferentes enfermidades. Entre estes documentos, encontra-se o mais antigo relato do uso do mel: uma escritura suméria de aproximadamente 2000 A.C. que recomendava o uso do mel para o tratamento de feridas (JONES, 2001).

O uso do mel para o tratamento de feridas também é encontrado em documentos mais recentes, como papiros escritos pela civilização egípcia, que recomendava misturar mel com ocre vermelho e alabastro em pó para o tratamento de alopecia. Esta civilização, como outras, relacionavam intimamente o uso de substâncias com rituais religiosos. Livros religiosos escritos na Antiguidade atribuíam a diferentes substâncias, como o mel, propriedades de cura; como por exemplo, o relato de Salomão no Corão: “E teu Senhor inspirou as abelhas, (dizendo): Construí as vossas colmeias nas montanhas, nas árvores e nas habitações (dos homens). [...] Sai do seu abdômen um líquido de variadas cores que constitui cura para os humanos. (Corão 16:68-69)” (FERREIRA; PAES; LICHTENSTEIN, 2008; GUTHRIE, 2011; JONES, 2001).

Os dados coletados durante a Antiguidade sobre as propriedades medicinais de substâncias não incluíam o conhecimento da existência de patógenos como microrganismos; assim, eles eram obtidos apenas empiricamente (FERREIRA; PAES; LICHTENSTEIN, 2008). Essas informações foram escritas em diferentes manuais médicos, que descreviam recomendações de diferentes substâncias para as diversas moléstias. Como exemplos desses manuais, existem: o *Shennong Becaó Jing* (Materia Médica do Divino Fazendeiro); um manual descrito durante a civilização Chinesa; e o *Corpus Hippocraticum*, uma coletânea de livros associada a Hipócrates, escrita por vários médicos hipocráticos durante a civilização greco-romana (EATON, 2015; FRANCIA; STOBART, 2014).

Interessantemente, o mel foi recomendado em manuais de diferentes civilizações. No caso do *Shennong Becaó Jing*, o mel era recomendado para o

tratamento da dor, como também, a capacidade de aumentar o “*qi*”, enquanto que no *Corpus Hippocraticum*, o mel era recomendado para o tratamento de tifo, ou para o prolongamento da vida. Outros relatos mais tardios possuíam descrições mais detalhadas do potencial do mel, como o do médico romano Discordes, que recomendava o mel para o tratamento de úlceras, infecções de garganta, olhos e narinas; e relatava diferenças entre méis quanto ao potencial medicinal (EATON, 2015; FRANCIA; STOBART, 2014). O mel também foi usado por civilizações européias, e indígenas da América, para o tratamento de doenças respiratórias (BÁLLIVAN, 2008; CORTOPASSI-LAURINO; GELLI, 1991; POSEY, 1987).

O uso medicinal do mel perdurou na civilização européia até a primeira metade do século XX, sendo inclusive usado pelos russos durante a Primeira Guerra Mundial (BOGDANOV, 2016; SUBRAHMANYAM, 1996). A introdução de novas terapias ocorreu com os estudos de antibacterianos, que foram iniciados no final do século XIX, com a comprovação por Robert Koch do papel patogênico dos microrganismos. Na época, já eram adotadas práticas médicas capazes de reduzir infecções pós operatórias, como a lavagem das mãos antes de processos cirúrgicos estabelecida por Semmelweis; e o procedimento de desinfecção com fenol elaborada por Joseph Lister (FERREIRA; PAES; LICHTENSTEIN, 2008; LISTER, 1867). Entretanto, estas práticas possuíam algumas limitações, como a toxicidade do fenol (INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY, 1994).

Um dos pioneiros dos estudos de antibiose foi Paul Ehrlich, que iniciou seu trabalho sobre antibióticos a partir de sua reflexão sobre o termo “antibiose”, cunhado por Vuillemin; a afinidade de pigmentos por determinados tecidos (tanto os usados na indústria têxtil quanto aqueles utilizados em cortes histológicos); e seu interesse em identificar bactérias em lâminas histopatológicas. Dessa reflexão, ele propôs a existência de uma substância que teria afinidade por células de patógenos, originando assim a teoria da toxicidade seletiva. Essa teoria o levaria a desenvolver juntamente com Sahachiro Hata o “composto 606” em 1905, que viria a ser conhecido como “salvarsan”. O “composto 606” era um derivado do arsênio, uma molécula usada na produção de pigmentos, e foi usado no tratamento da sífilis (causada pela bactéria *Treponema pallidum*), obtendo sucesso no tratamento de vários casos (AMYES, 2001; KENNEDY, 2004).

Na época dos estudos de Paul Ehrlich, Jonh Tyndall, em 1875, descreveu a capacidade do fungo do gênero *Penicillium* em induzir um estado de

“morte ou dormência” em bactérias. Esta Informação foi importante para Alexander Fleming descobrir a penicilina em 1928. Curiosamente, tal descoberta foi uma consequência da observação de halos de inibição em ágar com culturas de *Staphylococcus aureus* contaminadas pelo fungo *P. notatum*.

Tabela 01- Seletividade de antibacterianos usados.

Sítio de ação	Seletividade para bactérias	Exemplo de antibacteriano
Síntese da parede bacteriana	A parede celular de peptidoglicana é ausente em mamíferos.	Penicilinas, Cefalosporinas, Vancomicina
Síntese proteica	O ribossomo bacteriano é o 70S, enquanto que de eucariontes é 80S.	Aminoglicosídeos, Tetraciclina
Síntese do ácido fólico	A síntese do ácido fólico em bactérias utilizam PABA, diferente dos mamíferos.	Sulfonamidas, Trimetopim
Metabolismo do ácido nucléico	Há diferenças estruturais em enzimas como topoisomerasas, mas ainda há toxicidade para eucariontes.	Quinolonas, Rifampicina
Desorganização da membrana	Possui baixa seletividade, sendo seu uso clínico restrito.	Polimixina B

Fonte: adaptado de Sefton (2002); Tortora (2010)

O tratamento de infecções em massa pela penicilina marcou a “Era Dourada” dos antimicrobianos. Este período, que durou entre as décadas de 40 e 60; foi caracterizado pela descoberta de várias moléculas com atividade antibacteriana, o que possibilitou o controle de várias doenças, como a febre reumática. Mas, as novas substâncias eram usadas logo após a obtenção de resultados empíricos sobre o efeito, isto é, sem o conhecimento de mecanismos de ação. Além do uso antes da descoberta do mecanismo responsável pelo efeito bactericida, os medicamentos eram usados indiscriminadamente, o que resultaria no surgimento de cepas resistentes aos antibacterianos usados (FERREIRA; PAES; LICHTENSTEIN, 2008; SILVER, 2011;

SINGH, 2006; TODAR, 2011). Os antibacterianos usados são baseados na seletividade proposta por Paul Ehrlich, agindo em diferentes alvos, conforme listado na tabela I (AMYES, 2001; SEFTON, 2002).

Alexander Flanning, entretanto, notou em sua pesquisa que o crescimento de bactérias em concentrações gradativamente maiores de penicilina levou à seleção de mutantes com maior resistência ao antibacteriano. Essas células bacterianas possuíam uma parede celular com menor permeabilidade para o medicamento, o que permitia que resistissem a concentrações do fármaco que era encontradas no sangue, durante o tratamento de pacientes. E, em 1945, baseado em sua pesquisa, ele alertou, em uma entrevista para o New York Times, que o uso indiscriminado da penicilina poderia levar à seleção de “formas mutantes” de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina, e também ressaltou a possibilidade de tais “formas bacterianas” levarem a infecções, e pacientes infectados transmitirem tais bactérias resistentes para outros indivíduos (LEVY, 2002). O primeiro caso de resistência surgiu um ano mais tarde com uma cepa de MRSA, e os anos seguintes foram marcados por um acelerado aumento no número de casos de infecções com bactérias resistentes aos antimicrobianos (LEVY, 2002; PALUMBI, 2001).

3.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA

Um determinado antibacteriano não possui necessariamente atividade contra todas as espécies bacterianas, pois uma determinada cepa pode possuir fatores que impedem a ação desse antibacteriano intrinsecamente. Essa resistência intrínseca pode ser caracterizada pela simples ausência da molécula alvo na bactéria, ou falta de um canal de entrada na membrana. Em alguns casos, ela pode ser decorrente da presença de uma camada eficiente na barreira do antibacteriano, fato observado em alguns casos de resistência de bactéria Gram-negativas (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008; TODAR, 2011).

Adicionalmente, além dos casos de resistência intrínseca; as bactérias, assim como outros microrganismos, podem ser selecionadas para uma melhor adaptação da população às condições do meio ambiente. E devido a essa adaptação ao meio, onde antibacterianos podem estar presentes; ocorre um aumento do número de cepas que apresentam resistência ou multi-resistência aos agentes terapêuticos (ALANIS, 2005). Infecções causadas por cepas, como MRSA (resultantes da pressão

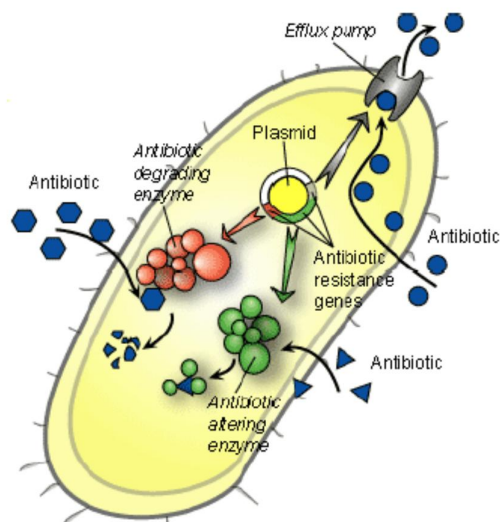
evolutiva causada pelos bactericidas e bacteriostáticos), são de difícil tratamento. Essa dificuldade resulta num aumento de custos hospitalares, assim como das taxas de morbidade e mortalidade (LEVY e MARSHALL, 2004; SEFTON 2002). A tabela 02 lista os modos de resistência para os antibacterianos usados, e a figura 01 ilustra os principais mecanismos de resistência adquiridos por mutações.

Tabela 02- Exemplos de modos de resistência aos antibacterianos atuais.

Antibacterianos	Modo de resistência
Clorafenicol	Redução da entrada na célula
Tetraciclina	Bombas de efluxo da bactéria
Beta-lactâmicos, Eritromicina,	Eliminação do antibacteriano ou diminuição da afinidade com o alvo
Beta-lactâmicos, Aminoglicosídeos, Clorafenicol	Clivagem ou modificação enzimática da molécula
Sulfonamidas, Trimetopim	Aumento na produção do alvo e adição de via metabólica alternativa

Fonte: adaptado de Todar (2011)

Figura 01- Mecanismos de resistência bacteriana adquiridos por mutações aos antimicrobianos.



Fonte: Todar (2011)

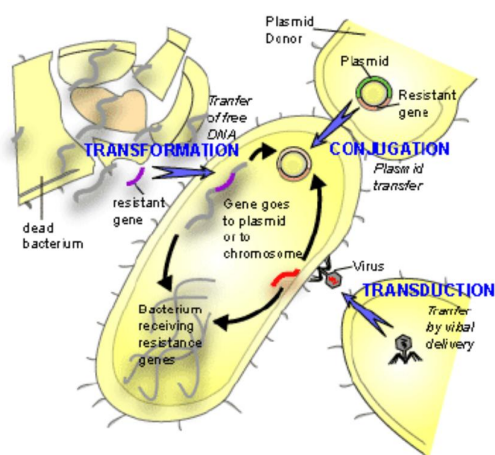
O surgimento de uma cepa resistente, o que caracteriza a resistência como adquirida, pode ocorrer como consequência de mutações em um ou mais *loci* de seu cromossomo, ou pela transferência desse material genético para outras bactérias. Tais alterações genéticas resultam na alteração das proteínas que são transcritas pela bactéria, e logo em mudanças em componentes estruturais dela, como os receptores pelos quais os antimicrobianos entram na célula. Uma vez alterados, a permeabilidade da bactérias para o antibacteriano pode diminuir. Além da disso, alterações na tradução de proteínas podem alterar estrutura dos canais de membrana, e (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2008; TODAR, 2011).

Mutações são deleções, inserções, inversões ou trocas na sequência de bases nitrogenadas que compõem o material genético. Cepas contendo mutações que conferem resistência são selecionadas pela pressão evolutiva causada resultante da presença do antibacteriano (NEIDHARDT, 2004, TODAR, 2011). Mutações ocorrem principalmente por erros no processo de transcrição ou reparo do DNA bacteriano, sendo denominadas mutações dependentes de crescimento. Vale notar que pode ocorrer uma indução do estado de hipermutabilidade, o que resulta em bactérias “hipermutantes” (com uma maior taxa de mutação) (ALONSO; CAMPANARIO; MARTINEZ, 1999; DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2007; KRAŠOVEC, 2003; MARTINEZ; BAQUERO, 2006).

Uma vez que o gene mutante é formado, ele pode ser expresso e transferido verticalmente ou horizontalmente. A transferência vertical de genes, ou

evolução vertical, é a replicação e passagem de genes de uma bactéria para suas “células-filhas”. Por tal processo, pode-se aumentar tanto o número de cópias dos genes de resistência em uma população, assim como o número de bactérias resistentes. A transferência horizontal de genes, por sua vez, é a passagem de material genético entre células bacterianas da mesma espécie ou de espécies diferentes. Ela pode ocorrer pelos processos de conjugação, transformação ou transdução; esquematizados pela figura 02 (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2007; NEIHARDT, 2004; RICE; BONOMO, 2005; SUMMERS, 2006; TODAR, 2012).

Figura 02- Esquema do modo de transferência horizontal de genes.



Fonte: Todar (2011)

Conjugação é a transferência horizontal de genes dependente da formação de uma estrutura, chamado *pili* conjugativo (vulgarmente conhecido como *pili* “sexual”). Tal processo também é capaz de transferir *transposons* (contendo sequências de DNA) por plasmídios, e se inserir no DNA da bactéria receptora (DZIDIC; SUSKOVIC; KOS, 2007; NEIHARDT, 2004; RICE; BONOMO, 2005; SUMMERS, 2006; TODAR, 2012).

O processo de transformação é a capacidade de uma bactéria (considerada “competente”) de adquirir um material genético de outra bactéria lisada. Isso é possível pela síntese de proteínas de membrana capazes de ligar os fragmentos exógenos à molécula de DNA, que são variáveis entre espécies (CHEN, 2004; JONHSTON, 2014; TODAR, 2011). Uma vez dentro do citoplasma, os fragmentos de DNA são captados por proteínas promotoras de recombinação (RPM),

que recrutam enzimas recombinases homólogas ao fragmento e ativam-nas. Dessa forma, o material genético exógeno é incorporado ao DNA cromossomal de uma bactéria, valendo-se ressaltar que este processo pode ser limitado pela presença de determinadas enzimas de restrição de bactérias receptoras (BEERNINK; MORRICAL, 1999; JONHSTON, 2014; PROVERDI, 1999; TODAR, 2011).

O terceiro processo, a transdução, refere-se ao recebimento de genes de outra bactéria por intermédio de um bacteriófago, ou seja, por uma partícula viral infecciosa cuja replicação ocorre em células bacterianas. A transdução pode ser generalizada ou específica. A transdução generalizada é caracterizada por um erro de uma partícula viral (denominada vírion) durante a aquisição do material genético a ser transportado. O vírion, por esse erro, adquire o material genético da célula hospedeira ao invés do material viral (NEIHARDT, 2004). Já, a transdução específica é a consequência de um erro na excisão do genoma viral replicado pelo prófago. Entretanto, vale notar que nesse caso, a bactéria hospedeira que recebeu os genes transduzidos, poderá também realizar a transdução específica, com uma maior frequência (NEIHARDT, 2004).

O surgimento de cepas resistentes resultante da pressão evolutiva e transferência de genes evolutivo é uma constante (NEIDHARDT, 2004; AMERICAN SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES, 2010).

3.3 BACTÉRIAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA E CEPAS RESISTENTES

A resistência aos antimicrobianos é apontada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das maiores ameaças à saúde humana (AMERICAN SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES, 2010). Nos Estados Unidos, estima-se que 2 milhões de pacientes desenvolvem uma infecção bacteriana cuja cepa apresenta multirresistência aos antimicrobianos, e que estes casos resultam em 23 mil mortes anuais (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

Dentre as diferentes bactérias que levam a esse quadro preocupante, encontram-se algumas espécies como *Escherichia coli*, principal causador de infecção do trato urinário (ITU). Já certas sorovarietades de *Salmonella enterica* não-tifoide (NTS), como Typhimurium e Enteritidis, são responsáveis por 93,8 milhões de casos de gastroenterites por ano (MAJOWICZ et al., 2010). Além dessas espécies, um grupo

importante de espécies bacterianas multirresistentes é denominado “ESKAPE”, cujos membros são reconhecidos por sua capacidade de “escapar” da ação de antibacterianos. Este grupo inclui cepas de *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Anciobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.* (PETERSON, 2009).

Mesmo fazendo parte da microbiota intestinal, cepas de *Escherichia coli* são capazes de causar infecções em diferentes sistemas, como o nervoso, circulatório, digestório e urinário (CROXEN et al. FINLAY, 2013). Cepas de *E. coli* que causam doenças extraintestinais são denominadas *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC), que temos como exemplos, *E. coli* associada à meningite neonatal (NMEC) e *E. coli* uropatogênica (UPEC). Já as cepas que causam diarreia são conhecidas como diarreio gênicas (DEC), que temos como principais patótipos: enteropatogênica (EPEC), produtora de Shiga-toxina (STEC), enteroinvasiva (EIEC), enterotoxigênica (ETEC) enteroagregativa (EAEC) e de adesão difusa (DEAC). Cepas de *E. coli* patogênica são capazes de produzir vários fatores de virulência como apêndices como fímbrias e *pili* (que auxiliam na adesão da bactéria a células hospedeiras), proteínas que tornam a célula hospedeira receptível como é o caso do receptor Tir (que altera o citoesqueleto da célula hospedeira) (BOPP et al., 2003; CROXEN; FINLAY, 2010; NATARO; KAPER, 1998; WINN et al., 2006).

No que se refere a fatores de resistência, é especulada desde 1969 a possibilidade da passagem de cepas resistentes de outros animais ao humanos via alimentos (SHOOTER et al. 1970; SMITH, 1969). No século XXI, *E. coli* é uma das principais espécies bacterianas associadas à produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), clivadoras de beta-lactâmicos como a penicilina; e de carbapenemases de *Klebsiella pneumoniae* (KPC), que clivam carbapenêmicos (CHAVDA et al., 2016; JACOBY; MUNOZ-PRICE, 2005).

No caso de *Salmonella enterica*, NTS infectantes induzem principalmente gastroenterites. Entretanto em até 5% dos casos de infecção por NTS ocorre a invasão de outros tecido a partir da infecção gastrointestinal, levando a infecções “invasive NTS” (iNTS), e resultam em bacteremia assim como focos de infecção em outros sistemas (MANDAL; BRENNAND, 1988). Diferente de casos de febre tifoide, não há vacinas para a prevenção de infecções por bactérias NTS, dificultando a prevenção de infecção. Esse quadro é agravado também pelo surgimento de cepas de NTS multirresistentes. (CRUMP et al., 2011; MAJOWICZ et

al., 2010; SJÖLUND-KARLSSON et al., 2010).

Espécies do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, e comumente encontrados na microbiota de pele e mucosas (KLOOS; SCHLEIFER, 1986; OTTO, 2008). Cepas do gênero *Staphylococcus* são os principais agentes causadores de infecções pleuropulmonares, osteoarticulares, e peles (HINRICHSEN, 2013; TONG et al., 2015). Em 2011, mais de um terço dos países da União Europeia apresentaram pelo menos 25 % de cepas de MRSA entre os isolados de *S. aureus* (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION and CONTROL, 2011). Além de cepas MRSA, já foram isoladas cepas de *S. aureus* com resistência intermediária ou total à vancomicina, conhecidas como VISA e VRSA, respectivamente (CHAMBERS; DELEO, 2009).

Outra bactéria do mesmo gênero, *S. epidermidis* é considerada uma das principais causas de infecções nosocomiais; e a sua capacidade de produzir biofilme é apontada como um dos principais fatores de resistência aos antimicrobianos (GOMES, 2014, CERCA et al., 2005).

Infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa* ocorrem principalmente em tecidos imunocomprometidos, sendo o patógeno assim associado às infecções em pacientes com câncer ou vítimas de queimaduras (NIKAIDO, 2003). Esta espécie bacteriana pode causar diferentes doenças; entre as quais destacamos as pneumonias, e infecções no trato urinário e em sítios cirúrgicos (BREIDENSTEIN, 2011; CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013; DE LA FUENTE-NÚÑEZ; HANCOCK, 2011; PEREIRA et al., 2014; WAGNER et al., 2008). Essa espécie bacteriana pode apresentar diferentes mecanismos de resistência aos antimicrobianos (perda de porinas, bomba de efluxo e produção de beta-lactamases). Entre os fatores de resistência intrínseca, destacamos a redução da permeabilidade celular pela perda da porina OprF, que controla a passagem de substâncias para o meio intracelular, conferindo resistência a diversos antibacterianos (NIKAIDO, 2003). Além disso, amostras de *P. aeruginosa* podem apresentar enzimas como beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) (BUSH, 2010).

Dado ao aumento brusco do número de cepas bacterianas resistentes, a efetividade dos antibacterianos convencionais tem diminuída ao longo do tempo, o que justifica um grande esforço na busca por novos antimicrobianos (FINCH, 2007).

3.4 ESTUDO DO USO ANTIBACTERIANO DO MEL

3.4.1 Definição de Mel Quanto sua Manufatura e Composição

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento define por meio do Decreto-Lei nº. 214/2003 de 18 de Setembro. Por ele, o mel é considerado como uma solução açucarada natural produzida por abelhas a partir de composto de plantas, que é recolhido, transformado, depositado, desidratado e armazenado em favos das colmeias por elas.

Este decreto também classifica o mel quanto à origem em mel de néctar, caso seja proveniente de flores; ou em mel de melada, caso feito a partir de excreções de insetos sugadores de plantas. Outra classificação do produto no documento é quanto ao modo de produção de acordo com o modo de coleta dele. Por exemplo, o mel que é coletado dos alvéolos dos favos construídos pelas abelhas é considerado “mel em favos”; e denomina-se “mel com pedaços de favos”. O mel também pode ser considerado “mel escorrido” se for obtido a partir do que é escorrido dos favos. O “mel prensado” é obtido pela compressão de favos. Por último, ele pode ser classificado também pelo modo de produção em “mel filtrado”, quando o mel é obtido por um processo que elimina matéria orgânica ou inorgânica (BRASIL, 2003).

O Artigo II desse decreto regulamenta a composição necessária para a comercialização de um produto como “mel”, com as seguintes características (BRASIL, 2003):

- Teor de açúcares maior que 60 %;
- Quantidade de sacarose (indicador de colheita prematura) de menor que 5 %;
- Umidade menor que 20 %;
- Presença de sólidos insolúveis menores que 0,1 %;
- Concentração de ácidos livres menor que 50 mEq.kg⁻¹;
- Condutividade elétrica menor que 0,8 mS/cm;
- Atividade diastásica maior que 8 Göthe;
- Concentração de hidroximetilfurfural menor que 40 mg.kg⁻¹;

A massa seca do mel é composta principalmente por açúcares, como a frutose (que corresponde a 38,5 % da composição) e a glucose (que corresponde a 31 %). Entretanto, o mel é composto por quase 200 substâncias diferentes (EZZ EL-ARAB et al., 2006; KHAN; ABADIN; RAUF, 2007; MOUDONI; PADILA-ZAKOUR; WOROBO, 2001). Entre elas, estão moléculas como o ácido glucurônico, responsável

pelo seu gosto e acidez; enzimas como a glucose oxidase, que participa na formação do mel e produz peróxido de hidrogênio, e a catalase, sendo tal composição varia conforme fatores como a origem floral, condições ambientais, e tratamentos posteriores (OLAITAN; ADELEKE; OLA, 2007; VIUDA-MARTOS, et al, 2008).

Além de ser comercializado como alimento, a literatura atribuí ao produto, propriedades medicinais; podendo ser, por exemplo, benéfico ao sistema imunológico, além de conferir efeitos como: antidepressivo, anti-inflamatório, analgésico, sedativo, expectorante e antimicrobiano (WIESE, 1986). Entretanto, mesmo com diversos critérios para regular a composição de méis comercializados, não há uma regulamentação para verificar contaminações do mel por fungos ou bactérias. Fatores como a umidade do mel podem incentivar o crescimento de leveduras; comprometendo seu uso medicinal (GOMES et al., 2010).

3.4.2 Estudos Modernos das Propriedades Medicinais do Mel

O uso das propriedades antibacterianas foi relatado na Era Contemporânea no ano de 1892 por Van Ketel, conforme aponta Dustmann (1979). O mel, na época, era comumente usado tanto nas comunidades quanto por médicos. Por exemplo, durante a Primeira Guerra Mundial, a substância foi usada por soldados russos e chineses como agente curativo; e antes da Segunda Guerra Mundial, o mel era usado em hospitais da Nova-Zelândia para o tratamento de feridas. Mas, apesar da descoberta de Ketel datar apenas uma década após o estabelecimento dos postulados de Koch, houve a preferência do uso de outros bacterianos no Ocidente, estabelecendo o mel como “apenas algo para colocar na torrada” (SUBRAHMANYAM, 1996; EATON, 2015). Mesmo assim, o cientista holandês teria seus estudos continuados por outros na América e na Europa, que comprovariam as características antimicrobianas da substância no decorrer do século XX (DUSTMANN, 1979). E, recentemente, trabalhos descrevem os mecanismos responsáveis pelas propriedades medicinais do mel, possibilitando seu “redescobrimento” pela medicina moderna; ainda que haja hesitação em usá-lo na clínica devido à falta de prática (BERGMAN et al., 1983; EMSEN, 2007; MOLAN, 1992; MOLAN, 1997; MOLAN; RHODES, 2015).

Paralelas ao uso do mel como antibacteriano, diversas propriedades medicinais do mel são apontadas pela literatura, sendo uma delas seu efeito antioxidante. Substâncias oxidativas reagem com lipídios, proteínas, açúcares e

ácidos nucleicos de células; prejudicando o metabolismo celular (VIUDA-MARTOS et al., 2008). O mel, apesar de conter espécies reativas de oxigênio (EROS), também contém compostos fenólicos. Tais compostos são o ácido fenólico e os flavonóides; moléculas marcadoras da origem botânica do mel, com capacidade antibacteriana, anticancerígena e antioxidante (AL-MAMARY; AL-MEERI; AL-HABORI, 2002; ESTEVINHO et al, 2008; VINSION et al., 1998; YAO et al., 2003). No caso da capacidade antioxidante, essas moléculas são relacionadas com diferentes mecanismos, como a capacidade em quelar espécies reativas e redução de íons férricos que resultariam na produção de espécies reativas (KÜÇÜK et al., 2007). Adicionalmente, a hidrossolubilidade dos compostos permite que a ação antioxidante do mel seja distribuída pelo plasma sanguíneo para além do sítio de aplicação (SILVA et al, 2008).

O potencial antioxidante do mel também pode ser relacionado ao seu efeito anti-inflamatório. Um estudo realizado por Kassim e colaboradores (2010) mostrou um potencial do mel Gelam (proveniente da Malásia) como inibidor da prostaglandina E2 e do óxido nítrico (NO). O estudo também mostrou o potencial deste mel em diminuir o edema e a dor em tecidos inflamados, tanto em modelos imunológicos (resultantes da inoculação de lipopolissacarídeo), quanto em modelos não-imunológicos. Tais achados são relevantes uma vez que outro estudo, realizado por Yusof e colaboradores (2007), desenvolveram um curativo feito com a mistura desse mel com um hidrogel, e verificaram uma aceleração no processo de cicatrização de ratos nos pontos de aplicação da formulação. O uso do mel para reparo tecidual também é apoiado por outros estudos envolvendo tratamento de queimaduras para a reconstrução tecidual em ferimentos. Nesses casos, é relatada a aceleração do processo fisiológico de reparo tecidual, como nas etapas de granulação e epitelização quando comparado com curativos impregnados com prata (KRAMER et al., 2004; SAMI et al., 2011).

Por último, é reportada pela literatura a capacidade do mel em ser usado como prebiótico, que é um suplemento nutricional que altera o equilíbrio da microbiota intestinal, favorecendo o crescimento de microrganismos benéficos ao organismo hospedeiro. Tal capacidade provém da presença de oligossacarídeos, como frutooligossacarídeos; que são açúcares que, quando fermentados pela microbiota intestinal, estimulam seletivamente o crescimento de cepas favoráveis ao hospedeiro da microbiota, e ocasionam diversos efeitos fisiológicos, como aumento

da absorção de cálcio (BANSAL; MEDHI; PANDHI, 2005; CHEN et al., 2000; CHOW, 2002; SANS et al., 2005).

3.4.3 Propriedades Antibacterianas do Mel

O primeiro relato na literatura sobre a capacidade antibacteriana de um mel foi feito por Van Ketel em 1892 (DUSTMANN, 1979). Em seguida, estudos procuraram encontrar o fator no mel responsável por tal atividade. Um desses, feito por White, Subers e Schepartz (1963), encontrou o primeiro fator antibacteriano do mel; correlacionando a ação bactericida à presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A molécula, uma EROS produzida pela enzima glucose peroxidase (chamada de “inhibine” pelos autores) estava presente no mel (DUSTMANN, 1979; BOGDANOV, 1997). Entretanto, estudos futuros mostrariam que no mel há uma diversidade de moléculas com potencial bactericida, cuja ação independe de estresse oxidativo (ADCOCK, 1962; MAVRIC et al., 2008).

Essa diversidade de fatores antibacterianos torna o uso farmacológico do mel interessante; pois resulta em uma menor probabilidade do surgimento de cepas resistentes (CARNWATH et al., 2014). A variedade de substâncias contidas também faz com que ele combata infecções tanto indiretamente, por meio de estímulos a processos fisiológicos como granulação e cicatrização; quanto diretamente, pela produção de moléculas como o peróxido, que prejudicam o crescimento bacteriano no local da ferida (AL-WAILI et al., 2011; OLAITAN; ADELEKE; OLA, 2007). Porém, vale ressaltar que o uso medicinal do mel requer alguns fatores, como a ausência de herbicidas, pesticidas ou metais pesados, e de traços de radiação. O produto deve ainda ser esterilizado previamente com o intuito de evitar uma infecção secundária no hospedeiro (BOGDANOV, 1996; GREENWOOD, 1995; SNOWDON, 1996; TOVEY, 2000).

Muitos estudos descreveram a presença de EROS como resultado da ação da enzima glucose oxidase presente no mel. Essa enzima é responsável pela catalisação da conversão de glucose em ácido glucurônico e peróxido de hidrogênio na presença de água e oxigênio. Ela é semelhante à outra glucose oxidase presente em glândulas hipofaríngeas de abelhas, e sua atividade está relacionada à conservação do alimento e formação do mel (GAUHE, 1941; MAURIZIO, 1962, SCHEPARTZ; SUMS, 1964; WESTON, 2000). Os produtos da reação catalisada são

descritos por vários autores como fatores responsáveis pela atividade antibacteriana (BOGDANOV, 1997; DUSTMANN, 1979; WHITE JR; SUBERS; SCHEPARTZ, 1963). Bizerra, Da Silva e Hayashi (2012) afirmam que EROS como o peróxido de hidrogênio causam danos oxidativos na membrana celular, em proteínas, e no material genético de bactérias. Entretanto, é relativamente baixa concentração de EROS no mel puro. A atividade enzimática da glucose oxidase é maior quando o mel é diluído na faixa entre 30 a 40. O acúmulo do peróxido de hidrogênio também pode variar dependendo da origem do mel, sendo que alguns méis atingem um acúmulo máximo no período de 4 horas após a incubação a uma temperatura de 37 °C (BANG; BUNTTING; MOLAN, 2003).

Outros estudos apresentaram dados que demonstram que o mel possui um efeito parcial que independe de EROS; o que é constatável com a redução parcial do potencial antibacteriano após o tratamento com a enzima catalase. Essa propriedade é notável principalmente em alguns méis, como o mel “Manuka” (ADCOCK, 1962; MAVRIC et al., 2008; MOLAN; RUSSEL, 1988).

O mel possui um efeito antibacteriano por suas propriedades físico-químicas, como a alta concentração de açúcares; cuja interação com as moléculas de água presentes no local da colônia bacteriana torna-as indisponíveis para a bactéria, reduzindo assim a chamada atividade de água (A_w). O resultado dessa interação pela higroscopicidade reduz a captação de água pela bactéria, alterando seu metabolismo bacteriano (AMOR, 1978; OLAITAN; ADELEKE; OLA, 2007). A acidez do mel, proveniente da ação da enzima glucose oxidase, é um outro fator apontado como responsável pelo efeito antibacteriano.

O pH do mel, que varia entre 3,2 e 4,5, está abaixo do mínimo necessário para o crescimento de bactérias como *P. aeruginosa* (4,5) e *E. coli* (4,0), prejudicando o crescimento bacteriano (HANKIN, 1987). O baixo pH também é apontado como um possível ativador de macrófagos, devido a necessidade da acidificação de seus vacúolos (GUPTKA et al., 1992). Por último, além dos mecanismos já apresentados, estudos mais recentes mostram a relação do efeito antibacteriano do mel com moléculas, como metilglicoxal e Bee-denfensin-1, cuja presença varia entre méis e floradas. A partir de modelos de neutralização da atividade dessas moléculas essa, juntamente com a neutralização de peróxido de hidrogênio do pH, foi demonstrado como tais fatores são os constituintes com efeito bactericida em méis como o mel “Manuka” (KWAKMAN et al., 2010; KWAKMAN; ZAAT, 2012).

A capacidade antibacteriana já é comprovada contra diversas bactérias. Estudos mostram um efeito bactericida do mel contra diversas cepas, inclusive cepas de interesse clínico como MRSA (SHERLOCK et al., 2010; SHENOY et al., 2012; VIUDA-MARTOS et al., 2008). Também é demonstrado pela literatura que as bactérias não desenvolvem resistência a ele (BLAIR et al., 2009; MERCKOOL et al., 2009). Outros estudos também demonstram que aplicação tópica de mel não leva a efeitos danosos, e apresenta um grande potencial antibacteriano no tratamento de infecções (BULMAN, 1955; EFEM, 1988; FAROUK et al., 1988; PHARUAPRADIT; SAROPALA, 1992; SUBRAHMANYAM, 1993). Mas, vale a ressaltar que seu potencial antibacteriano varia conforme a origem e o processamento do mel, o que torna importante os ensaios de atividade antibacteriana para avaliar previamente a eficácia de um mel específico antes de aplica-lo como agente terapêutico (D'AGOSTINO; LA ROSA; ZANELLI, 1961; RADWAN; EL-ESSAWY; SARHAN, 1984).

3.5 Os MÊIS DAS ABELHAS *APIS MELLIFERA* E *SCAPTOTRIGONA BIPUNCTATA*

O efeito antibacteriano do mel é influenciado por diversos fatores, como a origem. Entre as diversas espécies de abelhas produtoras de mel, a abelha cujo mel é o mais comercializado mundialmente é *A. mellifera* (conhecida como abelha europeia), devido a diversos fatores, como a fácil domesticação dela sua presença em países consumidores de mel (ALVES et al., 2005). A espécie foi introduzida no Brasil por colonizadores europeus e se propagou no país rapidamente.

As espécies nativas, conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão, são caracterizadas pelo ferrão atrofiado (MINUSSI; ALVES DOS SANTOS, 2007; PRONI; MACIEIRA, 2002).

A análise do efeito bacteriano do mel de *Apis mellifera* é comparada com o mel de “Manuka”. Este mel recebe tal nome em função da planta Manuka (cujo nome científico é *Leptospermum scoparium*), nativa da Nova Zelândia e Austrália. O néctar dela coletado pelas abelhas possui diidroxiacetona, que é convertida em metilglicoxal no processo de formação do mel, resultando em um efeito antibacteriano no mel independente de ROS (ADAMS, MANLEY-HARRIS, MOLAN; 2009).

Já as abelhas indígenas nativas, que são conhecidas por Meliponíneos (e a criação delas, como Meliponicultura), formam um grupo que inclui a espécie *S. bipunctata* (MOLAN, 1992; NOGUEIRA-NETO, 1997; TEMARU, et al.

2007). Seu mel dessa abelha sem ferrão é utilizado como um alimento com fins medicinais por indígenas e em áreas rurais, atribuindo-se a ele propriedades terapêuticas (CORTOPASSI-LAURINO; GELLI, 1991; POSEY, 1987). Conforme Cortopassi-Laurino e Gelli (1991), o mel de meliponíneos possui um efeito antibacteriano maior do que o mel de *A. mellifera*. Os méis de Meliponíneos possuem um maior teor de água e, portanto, é mais vulnerável à fermentação, o que pode dificultar seu armazenamento (BIJLSMA, 2006; BORSATO, 2013).

Outro problema na comercialização do mel de abelhas indígenas é sua menor produtividade: enquanto a abelha europeia é capaz de produzir 15 Kg de mel ao ano, resultando em uma produção maior que 13 litros/colméia ao ano; a abelha sem ferrão é capaz de produzir apenas de 1 a 10 Kg de mel ao ano, variando conforme a região (DE ALMEIDA SOUZA; DE MELLO PEREIRA; DO RÊGO LOPES, 2010; PEREZ *et al.*, 2006; VENTURIERI, 2004). Junto a esse fator, a reputação medicinal, o sabor exótico do mel e dificuldades de produção e armazenamento (devido a maior umidade) tornam este mel mais caro; o que dificulta o seu uso terapêutico em larga escala (ALVES *et al.*, 2005). Um quilograma de mel de *A. mellifera* é vendido no valor de R\$16,00 a R\$21,00; enquanto que um litro de mel de meliponíneos varia entre R\$ 266,00 a R\$ 325,00 no mercado nacional.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, C. J.; MANLEY-HARRIS, M.; MOLAN, P. C. The origin of methylglyoxal in New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 8, p. 1050-1053, 2009. 344

ADCOCK, D. The effect of catalase on the inhibine and peroxide values of various honeys. **Journal of Apicultural Research**, v. 1, n. 1, p. 38-40, 1962.

D'AGOSTINO BARBARO, A.; LA ROSA, C.; ZANELLI, C. Attività antibatterica di mieli Siciliani. **Quadernidella nutrizione**, v. 21, n. 1-2, p. 30-44, 1961

ALANIS, A. J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era?. **Archives of medical research**, v. 36, n. 6, p. 697-705, 2005.

ALONSO, A.; CAMPANARIO, E.; MARTINEZ, J. L.. Emergence of multidrug-resistant mutants is increased under antibiotic selective pressure in *Pseudomonas aeruginosa* **Microbiology**, v. 145, p. 2857–2862, 1999.

AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Research**, v. 22, n. 9, p. 1041–1047, 2002.

ALVES, R. M. O. et al. **Custo de produção de mel: uma proposta para abelhas africanizadas e meliponíneos**. 1. ed. Série meliponicultura- nº 02. Cruz das Almas: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI-BA, 2005. 14 p.

AMOR, D. M. **Composition, properties and uses of honey: a literature survey**. Leatherhead, Reino Unido: The British Food Manufacturing Industries Research Association, 1978. 84 p.

AMERICAN SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES. The 10 X '20 Initiative: Pursuing a Global Commitment to Develop 10 New Antibacterial Drugs by 2020. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 8, p. 1081-1083, 2010.

AMYES, S. G. B. **Magic Bullets, Lost Horizons: The Rise and Fall of Antibiotics**. Londres, Reino Unido: Taylor & Francis, 2001, 262 p.

BALLIVIÁN, J. M. P. P. **Abelhas nativas sem ferrão**. São Leopoldo: Oikos, 2008. 128 p.

BANG, L. M.; BUNTTING, C.; MOLAN, P. The Effect of Dilution on the Rate of Hydrogen Peroxide Production in Honey and Its Implications for Wound Healing. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 9, n. 2. p. 267-273, 2003.

BEERNINK, H. T.; MORRICAL, S. W. RMPs: recombination/replication mediator proteins. **Trends in Biochemical Sciences.**, v. 24, n. 10, p. 385–389, 1999.

BERGMAN, A. et al. Acceleration of wound healing by topical application of honey: An animal model. **The American Journal of Surgery**, v. 145, n. 3, p. 374–376, 1983.

BIJLSMA, L. et al. Water content of stingless bee honey (*Apidae, Meliponini*): Interspecific variation and comparison with honey of *Apis mellifera*. **Apidologie**, v. 37, v.4, p. 480–486, 2006.

BIZERRA, F. C.; DA SILVA JR, P. I.; HAYASHI, M. A. F. Exploring the antibacterial properties of honey and its potential. **Frontiers in microbiology**, v. 3, 2012.

BLAIR, S. E. et al. The unusual antibacterial activity of medical-grade *Leptospermum* honey: Antibacterial spectrum, resistance and transcriptome analysis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 28, n. 10: 1199-1208, 2009.

BOPP, C. A. et al. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. In: MURRAY, P.R.; et al. Washington, Estados Unidos: **Manual of clinical microbiology**. 8. ed., 2003. p.654-671.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento. **Decreto Lei nº 216, 18 de setembro de 2003**. Diário da república - I série-A. 2003.

BREIDENSTEIN, E. B. M., DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; HANCOCK, R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 8, p. 419-426, 2011.

BOGDANOV, S. Non-peroxide antimicrobial activity of honey. In: Mizrahi, A.; Lensky, Y. (Eds.). **Bee products**. Nova Iorque, Estados Unidos: Plenum Press, 1996. p. 39–47.

BOGDANOV, S. et al. Determination of sugars by HPLC. **Apidologie (extra issue)**, p. 1-59, 1997.

BOGDANOV, S. Honey in medicine. 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/304011973_Honey_in_Medicine> (Último acesso em: 22 nov. 2016).

BORSATO, D. M. **Composição química, caracterização polínica e avaliação de atividades biológicas de méis produzidos por meliponíneos do Paraná (Brasil)**. 2013. 132 f. Tese (Doutorado em Farmacêuticas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2013.

BULMAN, M.W. Honey as a surgical dressing. **Middlesex Hospital Journal**, v. 55, n. 1, p. 188-189, 1955.

BUSH, K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 558-564, 2010.

CARNWATH, et al. The antimicrobial activity of honey against common equine wound bacterial isolates. **The Veterinary Journal**. v. 199, n. 1. p. 110-114, 2014

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic Resistance Threats in the United States**. Geórgia, Estados Unidos: Center for Disease Control and Prevention, 2013.

CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nature reviews. Microbiology**. v. 7, n. 9, p. 629-641, 2009.

CHAVDA, K. D. et al. Molecular Diversity and plasmid analysis of KPC-Producing *Escherichia coli*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 60, n. 7, p. 4073-4081, 2006.

CHEN, I.; DUBNAU, D. DNA uptake during bacterial transformation. **Nature reviews. Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 241–249, 2004.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; GELLI, D. S. Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action antibactérienne des miels d'abeilles africanisées *Apis mellifera* et de Méliponinés du Brésil. **Apidologie**, v.22, n. 1, p.61–73, 1991.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature reviews. Microbiology**. v. 8, n. 1, p. 26-38, 2010.

CROXEN, M. A. et al. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. v. 26, n. 4, p. 822-880, 2013.

DUSTMANN, J. H. Antibacterial effect of honey. **Apiacta**, v. 14, n. 1, p. 7-11, 1979.

DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology Biotechnology**, v.46, n. 11, p.11-21, 2008.

EATON, C. V. You can never tell with bees. In: _____. **Manuka: The Biography of an Extraordinary Honey**. Nova Zelândia, Austrália: Exisle, 2014. p. 30-55.

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, 1988.

EMSEN, I.M. A different and safe method of split thickness skin graft fixation: Medical honey application. **Burns: journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 33, n. 6, p. 782-787, 2007.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Annual epidemiological report 2011 - Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data**. Estocolmo, Suécia: European Centre for Disease Prevention and Control, 2011.

ESTEVINHO, L. et al. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46, n. 12, p. 3774-3779, 2008.

EZZ EL-ARAB, A.M.et al. Effect of dietary honey on intestinal microflora and toxicity of mycotoxins in mice. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 6, n. 6, p. 1-13, 2006.

FAROUK, A. et al. Studies on Sudanese bee honey: Laboratory and clinical evaluation. **International Journal of Crude Drug Research**, v. 26, n. 3, p. 161-168, 1988

FERREIRA, M. V. C.; PAES, V. R.; LICHTENSTEIN, A. Penicilina: oitenta anos. **Revista de Medicina**, São Paulo, v. 84, n. 4, p. 272-276, 2008.

FRANCIA, S.; STOBART, A. Early Greek Medicine: Evidence of Model, Methods and *Materia medica*, In: _____. **Critical Approaches to the History of Western Herbal Medicine**. Nova York, Estados Unidos: A&C Black, 2014, p. 27-46

FINCH, R. Innovation - Drugs and Diagnostics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. i79-i82, 2007.

GAUHE, A. Uber ein glukoseoxydierendes Enzym in der PharynxdrÖse der Honigbiene. **Zeitschrift fur Vergleichende Physiologie**, v. 28, n. 3, p. 211-253, 1941.

GOMES, S. et al. Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 2, p. 544-548, 2010.

GOMES, F.; TEIXEIRA, P.; OLIVEIRA, R. Mini-review: *Staphylococcus epidermidis* as the most frequent cause of nosocomial infections: old and new fighting strategies. **Biofouling**. v. 30, n. 2, p. 131-141, 2014.

GUPTA, S. K. et al.: Therapeutic efficacy of honey in infected wounds in buffaloes. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 62, n. 6, p. 521-523, 1992

GUTHRIE, D. **A History of Medicine**. Reimpressão. Carolina do Sul: BiblioBazaar, 2011. 540 p.

HINRICHSEN, S. L.; CAVALCANTI, I.; HINRICHSEN, B. L. Infecção relacionada à Assistência à Saúde (IrAS) | Importância e Controle. In: HINRICHSEN, S.L. (ed.). **Biossegurança e Controle de Infecções: Risco Sanitário Hospitalar**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 166-174.

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. **Environmental health criteria 161**. 1994. Disponível em: <<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc161.htm>> (Último acesso em 01 de outubro de 2016).

JACOBY, G. A.; MUNOZ-PRICE, L. S. The new β -lactamases. **The New England Journal of Medicine**. v. 352, n. 4, p. 380-391, 2005.

JOHNSTON, C. et al. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. **Nature reviews. Microbiology**, v. 12, n. 3, p. 181-196, 2014.

JONES, R. (2001) Honey and healing through the ages, In MUNN, P.; JONES, R (eds.). **Honey and healing**. Cardiff, Reino Unido: International Bee Research Association, 2001, p. 1-4.

KASSIM, M.; ACHOUI, B.; MANSOR, M.; YUSOF, K. M. The inhibitory effects of Gelam honey and its extracts on nitric oxide and prostaglandin E2 in inflammatory tissues. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1196-1201, 2010.

KENNEDY, M. **A brief history of disease, science and medicine: from the ice age to the genome project**. Califórnia, Estados Unidos: Writers Collectives, 2004, 528 p.

KHAN, F. R.; ABADIN, Z. U.; RAUF, N. Honey: nutritional and medicinal value. **International Journal of Clinical Practice**, v. 61, n. 10, p. 1705-1707, 2007.

KRAMER, A. et al. Konsensusempfehlung zur Auswahl von Wirkstoffen für die Wundantiseptik. **Hygiene & Medizin**, v. 29, n. 5, p. 147-157, 2004.

KRAŠOVEC, R.; JERMAN, I. Bacterial multicellularity as a possible source of antibiotic resistance. **Medical hypotheses**, v. 60, n. 4, p. 484-488, 2003.

KÜÇÜK, M. et al. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 526-534, 2007.

KWAKMAN, P. H. S. et al. How honey kills bacteria. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. v. 24, n. 7, p. 2576-2582, 2010.

KWAKMAN, P. H. S.; ZAAT, S. A. J. Antibacterial components of honey. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, v. 64, n. 1, p. 48-55, 2012.

LEVY, S. B. From tragedy the antibiotic era is born. In: LEVY, S. B. (Ed.). **The Antibiotic Paradox: How the Misuse of Antibiotics Destroys Their Curative Powers**, 2. Cambridge, Reino Unido: Perseus Publishin, 2002. p. 1-14.

LEVY, S. B., MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature medicine**, v. 10, p. S122-S129, 2004. Suplemento.

LISTER, J. On a new method of treating compound fracture, abcess, etc., with observations on the condition of suppuration. **Lancet**, v. 89, n. 2273, p. 357-359, 1867.

MAJOWICZ, S. E. et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clinical Infectious diseases: an Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**. v. 50, n. 6, p 882-889, 2010.

MANDAL, B. K.; and BRENNAND, J. Bacteraemia in Salmonellosis: a 15 year retrospective study from a regional infectious diseases unit. **British Medical Association**. v. 297, n. 6658, p 1242-1243, 1988.

MARTINEZ, J. L.; BAQUERO, F. Mutation frequencies and antibiotic resistance **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1771-1777, 2000.

MAURIZIO, A. From the raw material to the finished product: honey. **Bee World**, v. 43, n. 3, p. 66-81, 1962.

MAVRIC, E. et al. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, n. 4, p. 483-489, 2008.

DE MELLO PEREIRA, F.; DE ALMEIDA SOUZA, B.; DO RÊGO LOPES, M. T. **Instalação e manejo de meliponário**. Embrapa Meio Norte, 2010.

MERCKOLL, Patricia et al. Bacteria, biofilm and honey: a study of the effects of honey on 'planktonic' and biofilm-embedded chronic wound bacteria. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 41, n. 5, p. 341-347, 2009.

MINUSSI, L. C.; ALVES-DOS-SANTOS, I. Abelhas nativas versus *Apis mellifera* Linnaeus, espécie exótica (Hymenoptera, Apidae). **Bioscience Journal**, v. 23, n.1, p. 58-62, 2007. Suplemento.

MOLAN, P. C.; RUSSELL, K. M. Non- peroxide antibacterial activity in some New Zealand honeys. **Journal of Apicultural Research**, v. 27, n. 1, p. 62-67, 1988.

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

MOLAN, P. C. Honey as an antimicrobial agent. In: MIZRAHI, A.; LENSKY, Y. (Eds.). **Bee Products**. Nova Iorque, Estados Unidos: Plenum Press, 1997.p. 27-37.

MOLAN, P. C.; RHODES, T. Honey: A Biologic Wound Dressing. **Wounds**, v. 27, n. 6, 2015.

MOUDONI M.A.; PADILA-ZAKOUR, O.I.; WOROBO, R.W. Antimicrobial activity of honey against food pathogens and food spoilage microorganisms. **New York State Agricultural Experiment Station**, v. 1, p. 61-71, 2001.

NATARO, J. P.; KAPER, B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NEIDHARDT, F. Bacterial genetics. In: SHERRIS, J. C.; RAY, C. G.; RYAN, K. J. (Eds.) **Sherris Medical Microbiology** - An introduction to infectious diseases. 4.ed. Nova Iorque, Estados Unidos: McGraw Hill, 2004. p. 53-74.

NIKAIDO, H. Molecular Basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**. v. 67, n. 4, p. 593-656, 2003.

NISHIO, E. K. et al. Antibacterial activity of honey from stingless bees *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 and *S. postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Apicultural Research**, v. 54, n. 5, p. 452-460, 2016.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. São Paulo: Nogueirapis, 1997.

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

PALUMBI, S. R. Humans as the world's greatest evolutionary force. **Science**, v. 293, n.5536, p. 1786-1790, 2001.

PEREIRA, S.G. et al. 2014. Virulence factors and infection ability of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a hydrophobic facility and respiratory infections. **Journal of applied microbiology**. v, 116, n. 5, p. 1359-1368, 2014.

PEREZ, L.H.; RESENDE, J. V.; DE FREITAS, B. B. Câmbio e embargo europeu podem prejudicar exportações apícolas em 2006. **Mensagem Doce**, n. 86, p. 22-26, 2006.

PETERSON, L. R. Bad bugs, no drugs: no Escape revisited. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v, 49, n. 6, p. 992-993, 2009.

POSEY, D. A. Etnoentomologia de tribos indígenas da Amazônia. In: RIBEIRO, D. (Ed.). **Suma etnológica brasileira**. 2 ed. Petrópolis, Brasil: FINEP/Vozes, 1987. p. 251-271.

PRONI, E. A.; MACIEIRA, O. J. Abelhas indígenas sem ferrão: aspectos fitoecológicos e biodiversidade. In: MEDRI, MOACYR (Ed.). **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: Edição dos autores, 2002. p. 307-325.

PROVVEDI, R.; DUBNAU, D. ComEA is a DNA receptor for transformation of competent *Bacillus subtilis*. **Molecular microbiology**, v. 31, n. 1, p. 271-280, 1999.

RICE, L.; BONOMO, R. . Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: LORIAN, M. D. V. (Ed.). **Antibiotics in Laboratory Medicine**. 5 ed. Nova Iorque, Estados Unidos: Lippincott Williams & Wilkins, 2005. p. 441-476.

RADWAN, S. S.; EL-ESSAWY, A.; SARHAN, M. Experimental evidence for the occurrence in honey of specific substances active against microorganisms. **Zentralblatt für Mikrobiologie**, v. 139, n. 4, p. 249-255, 1984

SAMI, A.N. et al. Honey compared with silver sulfadiazine as burn wound dressing. **Annals of Pakistan Institute of Medical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 22-25, 2011.

SCHEPARTZ, A. I.; SUBERS, M. H. The glucose-oxidase of honey. I. Purification and some general properties of the enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta** , v. 85, n. 2, p. 228-237, 1964.

SEFTON, A. M. Sefton AM. Mechanisms of antimicrobial resistance : their clinical relevance in the new millennium. **Drugs**, v. 62, n. 4, p. 557-566, 2002.

SHENOY, V. P. et al. Honey as an antimicrobial agent against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from infected wounds. **Journal of global infectious diseases**, v. 4, n. 2, p. 102-105, 2012.

SHERLOCK, O. et al. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*,

Escherichia coli and *Pseudomonas aeruginosa*. **BioMed Central complementary and alternative medicine**, v. 10, n. 47, 2010.

SHOOTER, R. A. et al. Animal sources of common serotypes of *Escherichia coli* in the food of hospital patients. possible significance in urinary-tract infections. **Lancet**. v. 2, n. 7666, p. 226-228, 1970.

SILVER, L. L. Challenges of antibacterial discovery. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 71-109, 2011.

SINGH, S. B.; BARRET, J. F. Empirical antibacterial drug discovery-foundation in natural products. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 7, p. 1006-1015, 2006.

SILVA, R. A. et al. Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 17, n. 1, p. 113-120, 2008.

SMITH, H. W. Transfer of antibiotic resistance from animal and human strains of *Escherichia coli* to resident *E. coli* in the alimentary tract of man. **Lancet**. v. 1, n. 7607, p. 1174-1176, 1969.

SUBRAHMANYAM, M. Honey dressing for burns- an appraisal. **Annals of Burns Fire Disasters**, v. 9, n. 1, p. 33-35, 1996.

SUMMERS, A. O. Genetic Linkage and Horizontal Gene Transfer, the Roots of the Antibiotic Multi-Resistance Problem. **Animal Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 125-135, 2006.

TEMARU, E. et al. Antibacterial activity of honey from stingless honeybees (*Hymenoptera; Apidae; Meliponinae*). **Polish Journal of Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 281-285, 2007.

TODAR, K. Bacterial Resistance to Antibiotics. In: _____. **Todar's Online Textbook of Bacteriology**. Disponível em: <http://textbookofbacteriology.net/resantimicrobial_3.htm> (Ultimo acesso em 15 de novembro de 2016).

TONG, S. Y. et al. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clinical microbiology reviews**. v. 28, n. 3, p. 603-661, 2015.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. Drogas Atimicrobianas. In: _____(Eds.). **Microbiologia**. 10 ed., Porto Alegre, Brasil: Artmed, 2010. p. 553-583.

VENTURIERI, G. C. **Criação de abelhas indígenas sem ferrão**. Belém, Brasil: Embrapa Amazônia Oriental, 2004. 60 p.

VINSON, J.A. et al. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3630–3634, 1998.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **Journal of food science**, v. 73, n. 9, p. R117-R124, 2008. Suplemento.

VUONG, C.; OTTO; M. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 4, p. 481-489, 2002.

WAGNER, V. E. et al. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* Virulence and pathogenesis issues. In: CORNELIS, P. (ed.). **Pseudomonas genomics and molecular biology**. Norfolk, Reino Unido: Caister Academic Press, 2008. p. 129-158.

WESTON, R. J. Weston, R.J. (2000). The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. **Food Chemistry**, v. 71, n. 2, p. 235-239, 2000.

WHITE JR, J. W.; SUBERS, M. H.; SCHEPARTZ, 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, n. 1, p. 57-70, 1963.

WIESE, H. **Nova apicultura**. Porto Alegre, Brasil: Agropecuária, 1986. 493 p.

WINN, W.C; et al. The *Enterobacteriaceae*. In: _____. **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 6. ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006, p. 211-302.

YAO, L. et al. Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand Leptospermum honeys. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 159-168, 2003.

YUSOF, N. et al. Development of honey hydrogel dressing for enhanced wound healing. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, n. 11-12, p. 1767–1770, 2007.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ARTIGO

Os resultados e discussão, juntamente com a metodologia necessária ao desenvolvimento deste trabalho de mestrado, foram apresentados na forma de artigo.

ARTIGO

Potencial medicinal de méis: Propriedades antibacterianas dos méis das abelhas *Apis mellifera* Latreille africanizada e indígena sem ferrão *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836

Victor Hugo Clébis¹, Erick Kenji Nishio¹, Sara Scandorieiro¹, Vanessa Jacob Victorino², Luciano Aparecido Panagio³, Rubens Cecchini², Admilton Gonçalves de Oliveira Jr⁴, Lucy Megumi Yamauchi Lioni⁵, Edson Aparecido Proni⁶, Renata Katsuko Takayama Kobayashi¹, Gerson Nakazato^{1,*}

¹ Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

² Laboratório de Fisiopatologia dos Radicais Livres, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

³ Laboratório de Micologia Médica e Microbiologia Bucal, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

⁴ Laboratório de Microscopia Eletrônica e de Microanálise, Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

⁵ Laboratório de Biologia Molecular de Microrganismos, Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

⁶ Laboratório de Ecologia de Abelhas, Departamento de Biologia Animal e Vegetal, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

***Autor correspondente:** Gerson Nakazato, Laboratório de Bacteriologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Rodovia Celso Garcia Cid – PR 445 Km 380, s/n, Campus Universitário, Londrina, Paraná, 86057-970, Brasil. (gnakazato@uel.br)

Resumo

A resistência bacteriana aos diversos antibacterianos convencionais é um grave problema clínico, que requer a constante busca por novos antimicrobianos. Neste estudo foi avaliada a atividade antibacteriana dos méis produzidos pelas abelhas *Scaptotrigona bipunctata* (HSB) e *Apis mellifera* (HAM), contra bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, e *Pseudomonas aeruginosa*) e Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*). Seis ensaios foram utilizados para avaliar este efeito: 1) Poço-difusão em ágar; 2) Microdiluição em caldo, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM); 3) Ensaio de “Checkerboard” (determinação do tipo de atividade antibacteriana da combinação dos méis); 4) Curva de tempo e morte; 5) Microscopia eletrônica de varredura; 6) Produção de peróxido de hidrogênio. Halos de inibição foram observadas para HSB e combinação HSB/HAM, contra todas as cepas bacterianas utilizadas neste estudo. As CIMs para HAM variaram de 20 a 25%, e de 1,25 a 5%, para HAM e HSB, respectivamente. As curvas de tempo e morte mostraram que o HSB teve um efeito bactericida para *S. aureus*, e bacteriostático para *E. coli*, enquanto que o HAM mostrou um efeito bactericida para *E. coli* e bacteriostático para *S. aureus*. A combinação dos méis mostraram um efeito aditivo na atividade antibacteriana, reduzindo pela metade as CIMs de cada mel. Esta combinação também apresentou uma maior capacidade de produzir peróxido de hidrogênio do que os méis individualmente. Diferentes alterações morfológicas foram observadas na superfície bacteriana de *S. aureus* na presença dos méis. Esses resultados sugerem diferentes mecanismos de atividade antibacteriana do HSB e HAM, e que a combinação destes méis pode ser uma alternativa interessante no controle de infecções bacterianas.

Palavras-chave: Antibacterianos, mel, *Scaptotrigona bipunctata*, *Apis mellifera*, efeito aditivo.

1. Introdução

O avanço na elaboração de tratamentos para doenças é concomitante com o desenvolvimento das civilizações desde a Antiguidade. Dados empíricos da efetividade das substâncias usadas eram coletados, resultando nos primeiros manuais medicinais; documentos que e apareceram em diferentes civilizações antigas. Eles que descreviam várias enfermidades e diversos produtos efetivos no tratamento delas, mesmo sem o conhecimento da existência de patógenos como as bactérias (Eaton, 2015; Ferreira et al., 2008; Francia e Stobart, 2014).

O mel é mencionando vários desses manuscritos; sendo recomendado, entre outras coisas, para o tratamento de dores ou infecções. Outros relatos feitos na Antiguidade também estabeleciam algumas propriedades do mel conhecidas atualmente, como a heterogeneidade do potencial medicinal entre diferentes méis (Francia e Stobart, 2014; Eaton, 2015).

O mel, usado medicinalmente no começo do século XX, foi substituído pelos primeiros antibacterianos, como a penicilina. Entretanto, o uso indiscriminado de antibacterianos, juntamente com o aparecimento dessas moléculas em fômites como a água e alimentos, resultou no aparecimento de bactérias multirresistentes (Ferreira et al., 2008; Silver, 2011; Todar, 2011; Singh, 2006).

O surgimento de bactérias resistentes é um problema grave, considerado a terceira maior ameaça à saúde humana pela Organização Mundial de Saúde em 2010 (Sociedade Americana de Doenças Infecciosas, 2010), justificando a constante busca por novos compostos com atividade antimicrobiana.

Porém, procura por novas terapias para infecções nunca cessaram. Por exemplo, o estudo moderno das propriedades antibacterianas do mel ocorreu em paralelo ao desenvolvimento dos antibacterianos que hoje são usados, sendo iniciado por Van Ketel em 1982 (Dustmann, 1979). Alguns estudos atribuem diferentes propriedades medicinais ao mel, como sua capacidade antioxidante pela quelação de espécies reativas e redução da presença de íons férricos (Küçük et al., 2007; Viuda-Martos et al., 2008). Também é descrita pela literatura o seu efeito anti-inflamatório, por mecanismos como a inibição da prostaglandina E2 e redução do óxido nítrico, o que

diminui o edema formado e a dor; achado que permitiu o desenvolvimento de curativos a base de mel (Yusog, 2007; Kassim et al., 2010).

Quanto ao potencial antibacteriano do mel, após o estudo de Van Ketel; os estudos de White e colaboradores (1963) relacionaram o efeito antibacteriano do mel à presença do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), molécula que causa estresse oxidativo em células bacterianas. O H_2O_2 é produzido por uma enzima por eles chamada de “inhibine”, que viria ser conhecida como glucose peroxidase; uma enzima que catalisa a oxidação do açúcar presente no mel em H_2O_2 (Wilson e Turner, 1992; Bogdanov, 1997; Bizerra et al., 2012). A sua atividade enzimática é baixa no mel puro, e esta aumenta quando ele é diluído; o que controla a produção de H_2O_2 (Bang et al., 2003).

Além de fatores físicos como a acidez e a presença de H_2O_2 , estudos relacionam o potencial antibacteriano do mel com outras moléculas, principalmente em méis como o Manuka. Este mel produzido por abelhas *Apis mellifera* a partir da polinização de árvores Manuka (*Leptospermum scoparium*) contém moléculas antibacterianas, como metilglicoxal e bee-defensin-1, cuja presença varia entre lotes de mel e florada (Kwakman et al., 2010; Kwakman e Zaat, 2012). Essa diversidade de fatores antibacterianos torna o uso farmacológico do mel interessante; pois resulta em uma menor probabilidade do surgimento de cepas resistentes (Carnwath et al., 2014).

Neste estudo, analisamos o efeito antibacteriano dos méis de duas espécies de abelhas (*Apis mellifera* e *Scaptotrigona bipunctata*), assim como a associação desses méis, contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas causadoras de importantes infecções.

2. Material e métodos

2.1. Coleta do Mel

Os méis usados nesse estudo foram coletados no período de 2015 a 2016, de ninhos dos melipolinários de abelhas *S. bipunctata* Lepeletier 1836 (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) (HSB) e de *A. mellifera* Latreille africanizada (Hymenoptera: Apidae) (HAM), na Universidade Estadual de Londrina (Londrina- PR, Brasil) e na Fazenda Monte Sinai, (Mauá da Serra- PR, Brasil). Os méis foram coletados com seringas de vidro e espátulas de metal e, em seguida, foram depositados em frascos esterilizados para o armazenamento e transporte. Previamente aos experimentos, foram preparadas soluções estoque de cada mel pela diluição deles em água deionizada na proporção de 1:1 (v/v), que em seguida foram filtradas com um filtro com microporos de 0.22 µm (Millipore®).

2.2. Cepas bacterianas

As Bactérias utilizadas neste estudo foram: *Escherichia coli* ATCC 8739 e 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e 27853, *Salmonella enterica* sorovariedade Enteritidis ATCC 13076, *S. enterica* sorovariedade Typhimurium UK1, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e 29123, e *Staphylococcus epidermidis* cepa 1E4248. Todas as cepas bacterianas foram armazenadas em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid®) contendo 20 % de glicerol (Merck®), a uma temperatura de – 20 °C, até o momento de uso.

2.3. Ensaio por difusão em ágar (EDA)

O ensaio por difusão em ágar foi realizado segundo a metodologia descrita por Holder e Boyce (1994), com modificações. Primeiramente, cada cepa bacteriana cultivada em meio ágar Mueller-Hinton (MH) (Difco®), a uma temperatura de 37 °C, durante 24 h. Em cada ensaio, após a incubação, o cultivo foi suspenso em uma solução aquosa de salina (NaCl a 0,9%), resultando em uma solução com 1.5×10^8

unidades formadoras de colônia (o que corresponde a 0.5 da escala de McFarland). A solução foi semeada em placas de Petri contendo o meio ágar MH (Difco®) com o auxílio de um “swab” esterilizado. Foram adicionados 50 µL da solução estoque de cada mel em poços de 6 mm de diâmetros previamente perfurados no ágar. Em outro poço, adicionou-se 25 µL da solução estoque de cada mel. As placas de Petri foram incubadas a uma temperatura de 37°C, por 18-24 h e, depois, os diâmetros dos halos de inibição formados foram mensurados. Os testes foram realizados em triplicata.

2.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As CIMs foram determinadas pela técnica de microdiluição seriada em microplacas de 96 poços, de acordo com o protocolo do CLSI (2016). Após a diluição seriada de cada mel em caldo MH (Difco®) em uma placa de 96 poços, foi preparada uma solução aquosa de salina (NaCl 0.9%) da cepa a ser analisada contendo 0.5 de McFarland da mesma. Alíquotas de 10 µL dessa solução foram diluídas em microtubos contendo 990 µL de caldo MH. Deles, 50 µL foram então adicionados em cada poço da placa, resultando em poços com 7.5×10^5 UFC/mL da bactéria. As microplacas foram incubadas a uma temperatura de 37 °C, durante 18-24 h. Foi considerada a menor concentração inibitória aquela que inibe em 90 % da população bacteriana, o que corresponde a CIM₉₀. Os testes foram realizados em triplicata para cada cepa e as concentrações finais de cada mel variaram entre 0.08 e 25% (v/v).

2.5 Interação entre méis na atividade antibacteriana (Checkerboard)

O grau interação entre os méis na atividade antibacteriana foi determinado pelo ensaio de microdiluição em placas de 96 poços, com dois gradientes de diluição (um para cada mel) em meio MH, conforme o protocolo de Kelly e Masten (1976). As diluições ente os dois méis variaram entre 0.08 % e 12.5 %, e os testes foram realizados em triplicata para cada cepa de acordo com a metodologia anterior. A partir dos valores de CIMs individuais e da mistura, calculou-se o índice de concentração inibitória fracionada (FICI); descrito por Chin e colaboradores (1997) pela fórmula:

$$FICI = \frac{CIM \text{ associação}}{CIM \text{ mel HAM}} + \frac{CIM \text{ associação}}{CIM \text{ mel HSB}}$$

A partir da fórmula, a associação entre antibacterianos pode ser considerada, em relação ao efeito antibacteriano: Sinérgico, para $FICI \leq 0.5$; Aditivo, para $0.5 < FICI \leq 1.0$; Sem interação, para $1.0 < FICI \leq 4.0$; ou Antagônico, para $FICI > 4.0$.

2.6. Curva de tempo e morte

A avaliação da cinética do crescimento bacteriano, na presença dos méis, foi realizada por meio de uma curva de morte bacteriana em função do tempo, conforme o protocolo descrito pelo NCCLS (1999). Uma quantidade de 10^6 UFC/mL de MH caldo (Difco®) foi crescida na presença e ausência dos méis em diferentes concentrações, a uma temperatura de 37 °C, sem agitação. Alíquotas de cada microtubo, em diferentes tempos de incubação (0, 2, 5, 7, 10 e 24 h), foram diluídas e semeadas em meio MH ágar (Difco®), para posterior contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Uma curva de tempo-morte foi construída para posterior comparação do crescimento bacteriano na presença dos diferentes méis.

2.7. Dosagem de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ensaio de Concentrações Inibitórias Mínimas após Tratamento com Catalase

A dosagem de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nas amostras de mel foi realizada por meio da análise espectrofotométrica a 240 nm do consumo do H₂O₂ por catalase. Primeiramente, prepararam-se as amostras contendo caldo MH e os méis (assim como a mistura deles) em quantidades correspondentes aos “microtubos de tratamento” do ensaio de crescimento e morte para *S. aureus* ATCC 29231. Um volume de 100 µL foi adicionado nos poços de uma microplaca 96 poços (em triplicata), sendo então a leitura realizada no espectrofotômetro (Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer 1510), no comprimento de onda de 240 nm. Em seguida, foram adicionados 2 µL de solução da enzima catalase de fígado bovino (Sigma-Aldrich®) em

cada amostra, para uma concentração final de 10 unidades por poço. Após 3 min de reação, uma segunda leitura a 240 nm foi realizada para avaliação do consumo de H₂O₂ pela enzima catalase. As diferenças de absorvância entre as leituras para os tratamentos foram usadas para inferir quantitativamente a presença de H₂O₂ na amostra, com o auxílio de uma curva-padrão feita a partir de uma solução padrão de H₂O₂. Esta solução constitui de 1,000 mM de H₂O₂ em solução tampão de fosfato de potássio 50 mM (pH 7.0), e foi submetida a mesma quantidade de catalase e aos mesmo intervalos de reação para a leitura.

Para o ensaio da atividade antibacteriana dos méis tratados com catalase, foram realizados ensaios de microdiluição seriada (determinação da CIM) e ensaio de checkerboard, com as cepas *S. aureus* ATCC 29213 e *E. coli* ATCC 8739, na concentração de 2860 unidades de catalase/mL. A metodologia usando a catalase foi adaptada segundo as recomendações de Temaru e colaboradores (2007). Nesses ensaios, entretanto, as concentrações dos méis variaram entre 0.31 % e 33 %. Os testes foram realizados em triplicata.

2.8. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a observação das alterações morfológicas bacterianas na presença dos méis foi realizado a MEV. Uma suspensão de salina 0.9% contendo 10⁸ UFC/mL colônias de *S. aureus* ATCC 29231 foi cultivada em 1 mL de MH caldo durante 5 h, a uma temperatura de 37 °C, sem agitação. Após a incubação, a suspensão foi centrifugada e o “pellet” foi ressuspendido em 50 µL de tampão fosfato (pH 7.2). A nova suspensão bacteriana foi colocada sobre uma lamínula de vidro previamente revestida com poli-L-lisina 1% e, em seguida, cada amostra foi fixada por imersão em 500 µL de um tampão cacodilato de sódio 0.1 M (pH 7.2) contendo 2 % de glutaraldeído e 2 % paraformaldeído, durante 20 h. Em seguida, as lamínulas foram submetidas ao processo de pós-fixação 1 % de OsO₄ durante 2 h; e em desidratadas em diferentes gradientes de álcool (79, 80, 90 e 100° GL). Após a desidratação alcóolica, foi feito o ponto crítico de CO₂ (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer) e revestimento com ouro no metalizador (BALTEC SDC 050 SputterCoater). O material foi visualizado em um microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 200) nos aumentos de 5,000x e 25,000x.

2.9 Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa BioEstat (versão 5.0). Os testes usados para a curva de crescimento e morte são a Análise de variância (um critério), e teste t de Tukey (para as diferenças entre as médias); e foram considerados como significativos resultados com $p < 0.05$. No caso da dosagem de peróxido de hidrogênio, em especial foi utilizando o programa GraphPad 5.0, sendo os dados deste experimento analisados pelo teste de One-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni como pós-teste. Foi também adotado $p < 0.05$ como significativo.

3. Resultados e Discussão

3.1. Ensaio de difusão em ágar (EDA)

A aplicação do EDA, cujos resultados estão presentes na tabela 03 demonstrou a capacidade do HSB em formar halos de inibição (18.0 ± 1.58), enquanto que não foram observados halos de inibição resultantes do tratamento com o HAM (dados não mostrados). Um motivo para a ausência de halos é possivelmente a maior higroscopicidade do HAM devido ao teor de açúcares, assim como a predominância da frutose entre os açúcares presentes (Schmidt, 1997; Oliveira e Santos, 2011). Diferente do HAM, o mel Manuka proveniente da abelha *A. mellifera*, é capaz formar halos de inibição (Tan et al., 2009). Isso indica que este mel possui compostos capazes de difusão através do meio MH que não são presentes no HAM. O EDA com a mistura entre os méis (HAM e HSB) também resultou na formação de halos (15.2 ± 1.47). Entretanto, não houve diferença significativa entre as médias dos halos dos dois tratamentos, mesmo com a quantidade do HSB na mistura ter sido reduzida pela metade, um indicativo de seu efeito antibacteriano da combinação entre os méis.

3.2. Concentração Inibitória Mínima

O valor médio da CIM (tabela 03) do HSB para as cepas analisadas foi de 3,06 (± 0.51), enquanto que para o valor médio do HAM foi 21,67 ($\pm 0,83$). Diferentes autores apontam valores de CIM do mel Manuka para diversas cepas entre 8.75 % e 25 % (m/v) (Tan et al., 2009; Henriques et al., 2010; Mandal e Mandal, 2011). Adotando a densidade média do mel como 1.47 (g/mL), com base nos estudos de Boateng e Diunase (2015), a faixa de CIM variou de 5.95 a 17 % (v/v). Essa faixa está acima dos valores de CIM obtidos para o HSB, o que sugere um potencial clínico para o HSB. O HAM, com CIMs variando entre 20 e 25 % (v/v).

Além da CIM do HSB e HAM, verificou-se uma redução considerável da CIM da mistura dos méis pelo teste de Checkerboard. Para as bactérias Gram-negativas, o mel foi capaz de reduzir a CIM do HAM pela metade. E para Gram-positivas, o uso do mel HAM também teve como resultado, a redução da CIM do HSB pela metade. Esta particularidade da interação dos méis na mistura sugere uma diferença no espectro de ação entre eles; assim como o potencial da viabilização do uso clínico deles através da formulação de misturas com diferentes méis.

Os valores da FICI da mistura foram muito próximos de 0.5 para todas as cepas, e apesar de interação aditiva, existe uma tendência para o sinergismo na atividade antibacteriana. Nishio e colaboradores (2016) mostrou efeito sinérgico entre dois méis de abelhas indígenas (*S. bipunctata* e *S. postica*) para as mesmas cepas bacterianas com valores de CIM muito similares ao nosso estudo. Porém, a atividade antibacteriana do mel da abelha *S. postica* foi muito maior do que a de *Apis mellifera*. Apesar do efeito aditivo da combinação do HSB com HAM (*A. mellifera*), os valores da FIC foram próximos, sugerindo que associações de antimicrobianos (no nosso caso, méis) podem ser realizadas com antimicrobianos com baixa atividade antibacteriana e apresentar satisfatória atividade antibacteriana.

Outro aspecto importante foi a metodologia empregada, que mostrou ser muito importante para a avaliação da atividade antibacteriana, quando comparada com o EDA. Apesar da higroscopicidade do HAM mencionada anteriormente no EDA, na técnica de microdiluição seriada em caldo, não interferiu na determinação da CIM, demonstrando a atividade antibacteriana do HAM, mesmo sendo baixa.

Tabela 01- Diâmetros dos halos de inibição e concentrações inibitórias mínimas dos méis contra diferentes cepas bacterianas.

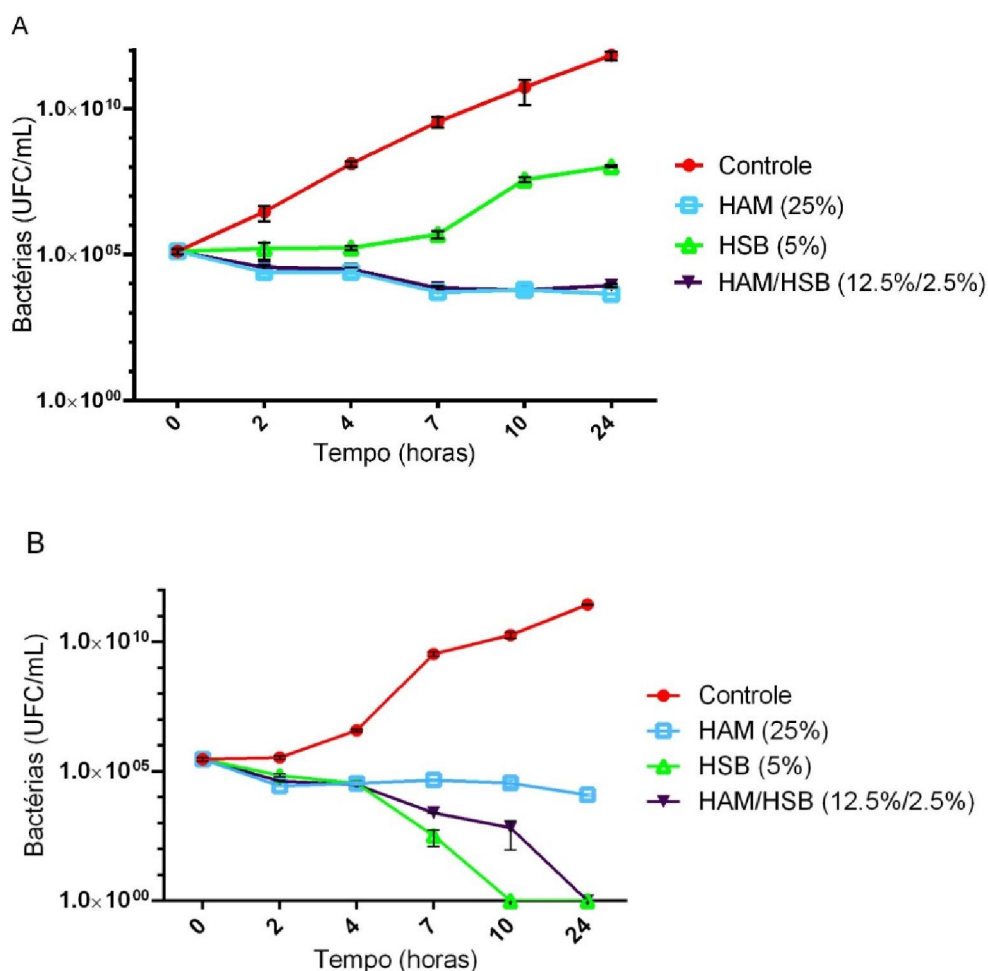
Microrganismo	Medida do halo teste- EDA (Média ± EP)		CIM % (v/v)		Checkerboard	
	HSB	HSB/HAM	HSB	HAM	HSB/HAM	FICI
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	21.3(±0.39)	18.8(±1.64)	2.50%	20%	0.08%/10.0%	0.532
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	13.4(±0.30)	09.9(±0.15)	5.00%	25%	0.08%/12.5%	0.532
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	14.0(±1.86)	10.5(±0.77)	2.50%	20%	1.25%/0.62%	0.531
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	12.7(±1.33)	09.3(±0.79)	5.00%	25%	02.5%/1.25%	0.505
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	23.0(±0.88)	17.6(±1.79)	2.5%	20%	1.25%/0.08%	0.504
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	21.7(±2.02)	18.2(±2.43)	1.25%	25%	0.62%/0.08%	0.503
<i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium UK1	23.5(±1.92)	21.8(±2.15)	5.00%	20%	0.08%/10.0%	0.516
<i>Salmonella entérica</i> Serovar Enteritidis ATCC 13076	12.4(±1.33)	14.9(±0.66)	2.50%	20%	0.08%/10.0%	0.532
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 1E4248	20.8(±1.39)	15.6(±2.92)	1.25%	20%	062%/0.08%	0.504

Legenda: EDA: Ensaio de difusão em ágar. EP: Erro Padrão. CIM: Concentração Inibitória Mínima. CIF: Concentração Inibitória Fracionada. ATCC: American Type Culture Collection HSB: Mel de *Scaptotrigona bipunctata*. HAM: Mel de *Apis mellifera*. HAM/HSB: Mistura entre os méis das abelhas *Scaptotrigona bipunctata* e *Apis mellifera*.

3.3 Curva de tempo e morte

As cinéticas dos crescimentos bacterianos na presença dos méis para as bactérias *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29231 foram analisadas através das curvas de tempo e morte (figuras 03 e 04, respetivamente).

Figura 01- Curva de tempo e morte das cepas *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 submetidas a diferentes tratamentos com méis (em \log_{10}).



Legenda: (A) Curva de crescimento e morte para a cepa *Escherichia coli* ATCC 8739. (B) Curva de crescimento e morte para a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. UFC: Unidades Formadoras de colônia. HSB: Mel de *Scaptotrigona bipunctata*. HAM: Mel de *Apis mellifera*. HAM/HSB: Mistura entre os méis das abelhas *Scaptotrigona bipunctata* e *Apis mellifera*. As concentrações dos tratamentos foram baseadas nas CIM previamente obtidas.

As curvas de tempo e morte dos tratamentos aplicados à bactéria Gram-negativa mostraram algumas diferenças entre os tratamentos em função do tempo. Analisando os tratamentos pelo tempo a partir do tempo de 2 h, o número de UFC no tratamento com o mel HAM e a mistura foram significativamente inferiores ao controle e ao tratamento com HSB ($p < 0,05$), e não houve diferença significativa entre eles. O tratamento HSB reduziu o crescimento bacteriano, sendo a contagem de UFC significativamente menor que o controle ($p < 0,05$). Ambos os casos de diferença significativa foram observados a partir de 2 h após o experimento, tempo próximo no qual são visto efeitos do mel Manuka no crescimento bacteriano (Henriques et al., 2010). Diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos tempos anteriores foram observadas apenas nos tempos de 2 e 7 h, nos tratamentos com o mel HAM e com a mistura; enquanto que o mel HSB mostrou essa diferença nos tempos 7, 10 e 24 h. Esses dados mostram uma atividade do HAM maior que o HSB.

A figura 04 mostra as curvas de crescimento da bactéria Gram-positiva submetida a diferentes tratamentos. As quantidades de UFC dos tratamentos com o HAM e a mistura foram significativamente inferiores ($p < 0.05$) ao do controle. Esses dados, juntamente as informações das curvas da figura 03, indicam que HAM possui um efeito mais antibacteriano de cinética mais veloz que HSB. Entretanto, a contagem de UFC para o tratamento com HSB apresenta-se significativamente inferior à contagem para o controle a partir de 4 horas e não demonstra diferença significativa em relação ao número de UFC dos outros tratamentos nos tempos 0, 2 e 4 h. Nos tempo de 7 e 10 h, a curva tratada com a mistura apresentou uma contagem de UFC significativamente inferior ($p < 0.05$) ao HAM e o HSB demonstrou uma quantidade de UFC significativamente inferior a todos os outros tratamentos ($p < 0.05$). Não foram observadas UFC a partir do tempo 10 no tratamento com HSB e no tempo de 24 h para o tratamento com a mistura, não havendo diferença significativa entre HSB e a mistura 24 após o início.

As curvas (Figuras 03 e 04) mostraram que o HAM possui efeito bacteriostático para *S. aureus* e reduz a viabilidade celular de *E. coli*, e o HSB bactericida para *S. aureus* e bacteriostático para *E. coli*. Esses resultados demonstram que as atividades antibacterianas de cada mel varia de acordo com a cepa bacteriana, como também sugerem que os mecanismos de ação desses méis são diferentes.

No caso do mel Manuka, o estudo da cinética do efeito antibacteriano em *S. aureus* estima que a na concentração de 6.80 % (v/v) reduz dois “logs” após 7 h de tratamento (Henriques et al., 2010), tempo semelhante ao observado na curvas tratadas com mel HSB e com a mistura.

Existem poucos trabalhos envolvendo combinação de méis na atividade antibacteriana (Nishio et al., 2016). O efeito aditivo foi verificado nos ensaios de curva de tempo e morte. A mistura mostrou ser mais eficiente para *E. coli* do que *S. aureus*, provavelmente devido ao intenso efeito bactericida do HAM para esta cepa.

3.4 Produção de Peróxido de Hidrogênio e teste de CIM após tratamentos com catalase

Todos os tratamentos apresentaram diferença significativa (Figura 05). A produção de peróxido de hidrogênio foi a menor o HAM, enquanto que foi maior a mistura dos méis (HAM/HSB). Interessantemente a produção da espécie reativa aumentou quando os méis foram misturados, mesmo sendo a mistura tendo uma menor concentração do mel HAM e HSB que seus respectivos tratamentos. Tal ocorrência se deve ao efeito aditivo observado em outros testes, uma que a maior disponibilidade de açúcares pela adição do HAM poderia ser usada pelas enzimas presentes no HSB.

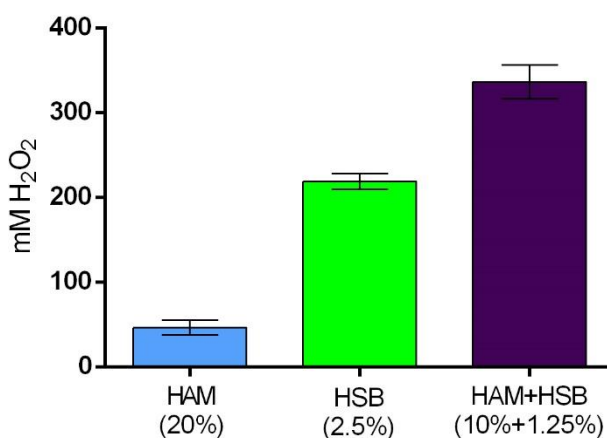
As CIMs obtidas após o tratamento com catalase (tabela 04) reforçam o papel antibacteriano do peróxido de hidrogênio, uma esses valores aumentaram tanto contra Gram-positivas quanto Gram-negativas. Tais resultados mostram a necessidade de análises dos fatores que regulam a produção de peróxido de hidrogênio no mel para seu uso clínico.

Tabela 02- Concentrações inibitórias mínimas dos méis contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, após tratamento com catalase.

Cepa bacteriana	CIM	
	HSB	HAM
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	20%	33%
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	10%	33%

Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima. CIF: Concentração Inibitória Fracionada. ATCC: American Type Culture Collection HSB: Mel de *Scaptotrigona bipunctata*. HAM: Mel de *Apis mellifera*.

Figura 02- Produção de peróxido de hidrogênio (em mM H₂O₂).

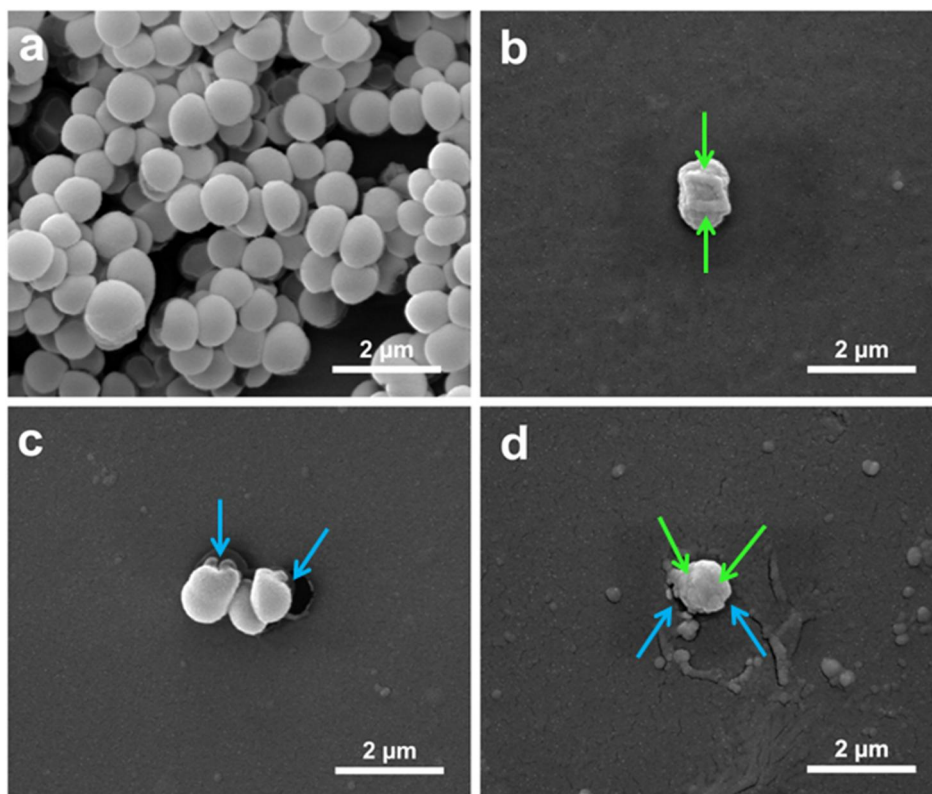


Legenda: mmH₂O₂: moléculas de peróxido de hidrogênio produzidas em milimolares. HSB: Mel de *Scaptotrigona bipunctata*. HAM: Mel de *Apis mellifera*. HAM + HSB: Mistura entre os méis das abelhas *Scaptotrigona bipunctata* e *Apis mellifera*. As concentrações de cada tratamento estão em parênteses.

3.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Observou-se nas imagens, além da redução populacional de bactérias na presença dos méis (figura 6b, 6c, e 6d), a formação de protuberâncias na superfície celular (figura 6b e 6d); efeito semelhante àquele causado por beta-lactâmicos como a cefalosporina (Kleiner e Perkins, 1970). Tal alteração sugere a degradação da parede celular por moléculas como o H_2O_2 e estão presentes em modelos de tratamento do mel Manuka em bactérias de *P. aeruginosa* (Henriques et al., 2010). Henriques e colaboradores (2011) mostraram que o mel Manuka possui a capacidade de inibir o processo de divisão celular de *S. aureus*, resultado na formação de septos completos. Packer e colaboradores (2012) sugeriram que esse mel é capaz de alterar o transcriptoma da bactéria, afetando inclusive a maquinaria de transcrição. Assim, em nosso estudo, observamos alterações morfológicas superficiais diferentes de outros méis, como o Manuka.

Figura 03- Imagens de microscopia eletrônica de varredura de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 na presença dos méis das abelhas *Scaptotrigona bipunctata* e *Apis mellifera*.



Legenda: (a) Controle negativo, sem tratamento (aumento 5,000x). (b) Células tratadas com 2.5 % de mel HSB (aumento 5,000x). (c) Células tratadas com 20 % de mel HAM (aumento 5,000x). (d) Células tratadas com a mistura de 10 % do mel HAM e 1.25 % de mel HSB (aumento 5,000x). μm : micrometros. As protuberâncias são marcadas por setas verdes e os sulcos marcados por setas azuis.

4. Conclusão

A associação dos méis de abelhas *Apis mellifera* africanizada e *Scaptrigona bipunctata* mostrou-se uma interessante alternativa sem alterar sua capacidade antibacteriana é uma interessante alternativa para redução da quantidade de mel dessa última, uma vez que sua produção é baixa e possui um valor de mercado mais elevado que o primeiro. Portanto, ao estudar a atividade dos méis, verificamos a importância dos ensaios utilizados para o entendimento de possíveis mecanismos de ação antibacteriana do mel, como: sensibilidade bacteriana, cinética de crescimento, alterações morfológicas superficiais e de quantidade peróxido de hidrogênio produzido.

5. Referências Bibliográficas

AMERICAN SOCIETY FOR INFECTIOUS DISEASES. The 10 X '20 Initiative: Pursuing a Global Commitment to Develop 10 New Antibacterial Drugs by 2020. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 8, p. 1081-1083, 2010.

BANG, L. M.; BUNTTING, C.; MOLAN, P. The Effect of Dilution on the Rate of Hydrogen Peroxide Production in Honey and Its Implications for Wound Healing. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 9, n. 2. p. 267-273, 2003.

BIZERRA, F. C.; DA SILVA JR, P. I.; HAYASHI, M. A. F. Exploring the antibacterial properties of honey and its potential. **Frontiers in microbiology**, v. 3, 2012.

BOGDANOV, S. et al. Determination of sugars by HPLC. **Apidologie (extra issue)**, p. 1-59, 1997.

CARNWATH, et al. The antimicrobial activity of honey against common equine wound bacterial isolates. **The Veterinary Journal**. v. 199, n. 1. p. 110-114, 2014

CHIN, N. X.; WEITZMAN, I.; DELLA-LATTA, P. *In vitro* activity of fluvastatin, a cholesterol-lowering agent, and synergy with fluconazole and itraconazole against *Candida* species and *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 4. p 850-852, 1997.

CLINICAL & LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard, Ninth Edition**. Pensilvânia, Estados Unidos: Wayne, 2016.

DUSTMANN, J. H. Antibacterial effect of honey. **Apiacta**, v. 14, n. 1, p. 7-11, 1979.

EATON, C. V. You can never tell with bees. In: _____. **Manuka: The Biography of an Extraordinary Honey**. Nova Zelândia, Austrália: Exisle, 2014. p. 30-55.

FERREIRA, M. V. C.; PAES, V. R.; LICHTENSTEIN, A. Penicilina: oitenta anos. **Revista de Medicina**, São Paulo, v. 84, n. 4, p. 272-276, 2008.

FRANCIA, S.; STOBART, A. Early Greek Medicine: Evidence of Model, Methods and *Materia medica*, In: _____. **Critical Approaches to the History of Western Herbal Medicine**. Nova York, Estados Unidos: A&C Black, 2014, p. 27-46.

HENRIQUES, A. F.; et al. The intracellular effects of manuka honey on *Staphylococcus aureus*. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 29, n. 1. p. 45-50, 2010.

HENRIQUES, A. F.; et al. The effect of manuka honey on the structure of *Pseudomonas aeruginosa*. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 30, n. 2. p. 167-171, 2011.

HOLDER, I. A.; BOYCE, S. T. Agar well diffusion assay testing of bacterial susceptibility to various antimicrobials in concentrations nontoxic for human cells in culture. **Burns: journal of the International Society for Burn Injuries**, v. 20, n. 5, p. 426-429, 1994.

JENKINS, R.; BURTON, N.; COOPER, R Effect of manuka honey on the expression of universal stress protein A in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 37, n. 4, p. 373-376, 2011.

KASSIM, M.; ACHOUI, B.; MANSOR, M.; YUSOFF, K. M. The inhibitory effects of Gelam honey and its extracts on nitric oxide and prostaglandin E2 in inflammatory tissues. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1196-1201, 2010.

KELLY, M. T.; MATSEN, J. M. *In vitro* activity, synergism, and testing parameters of amikacin, with comparisons to other aminoglycoside antibiotics. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 9, n. 3, p. 440-447, 1976.

KÜÇÜK, M. et al. Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 526-534, 2007.

MANDAL, D. M.; MANDAL, S. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. 154-160, 2011.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). **Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents**. Approved guideline M26-A. Pensilvânia, Estados Unidos: Wayne, 1999.

NISHIO, E. K. et al. Antibacterial activity of honey from stingless bees *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 and *S. postica* Latreille, 1807 (Hymenoptera: Apidae: Meliponinae) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal of Apicultural Research**, v. 54, n. 5, p. 452-460, 2016.

OLIVEIRA, E. N. A.; SANTOS, D. C. Análise físico-química de méis de abelhas africanizada e nativa. **Revista Instuto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 2, p. 132-138, 2011.

SCHMIDT, J. O. Bee Products: Chemical Composition and Application. In: Mizrahi, A.; Lensky, Y. (Eds.). **Bee Products: Properties, Applications and Apitherapy**. Nova York, Estados Unidos: Plenum Press, 1997

TAN, H. T. et al. The antibacterial properties of Malaysian tualang honey against wound and enteric microorganisms in comparison to manuka honey. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, n. 34, 2009

TEMARU, E. et al. Antibacterial activity of honey from stingless honeybee (Hymenoptera; Apidae; Meliponinae). **Polish journal of microbiology**, v. 56, n. 4, p. 281-285, 2007.

TODAR, K. Bacterial Resistance to Antibiotics. In: _____. **Todar's Online Textbook of Bacteriology**. Disponível em: <http://textbookofbacteriology.net/resantimicrobial_3.htm> (Ultimo acesso em 15 de novembro de 2016).

VIUDA-MARTOS, M. et al. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. **Journal of food science**, v. 73, n. 9, p. R117-R124, 2008. Suplemento.

WILSON, R.; TURNER, A. P. F. Glucose oxidase: an ideal enzyme. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 7, n. 3, p. 165-185, 1992.

YUSOF, N. et al. Development of honey hydrogel dressing for enhanced wound healing. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 76, n. 11-12, p. 1767-1770, 2007.

6 CONCLUSÃO

Os méis de abelhas *Apis mellifera* africanizada e *Scaptrigona bipunctata* demonstraram diferentes propriedades antibacterianas como: halos de inibição, concentrações inibitórias mínimas, tempo de ação antibacterianos, produção de peróxido de hidrogênio e alterações morfológicas causadas. A mistura entre os méis mostrou-se uma interessante alternativa ao possibilitar a redução das concentrações utilizadas sem alterar sua capacidade antibacteriana dos componentes. Tal capacidade faz da mistura uma interessante alternativa para redução da quantidade de mel HSB; cuja produção pelas abelhas indígenas é baixa, o que eleva seu preço. Nesse estudo também foi possível averiguar a importância dos ensaios utilizados para analisar as diferentes das propriedades bacterianas dos méis, assim como a presença desses fatores na mistura entre os méis.