



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL DE
ABELHAS *Apis mellifera* L. e *Melipona subnitida* L. FRENTE
AMOSTRAS BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES DE
Staphylococcus aureus* E *Pseudomonas aeruginosa

FRANCISCO VICENTE DE ANDRADE NETO
Biomédico

MOSSORÓ – RN – BRASIL
Agosto - 2010

FRANCISCO VICENTE DE ANDRADE NETO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL DE
ABELHAS *Apis mellifera* L. e *Melipona subnitida* L. FRENTE
AMOSTRAS BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES DE
Staphylococcus aureus E *Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural
do Semi-árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como
parte das exigências para obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto

MOSSORÓ – RN – BRASIL
Agosto - 2010

**Ficha catalográfica preparada pelo setor de classificação e catalogação da
Biblioteca “Orlando Teixeira” da UFERSA**

A553a Andrade Neto, Francisco Vicente.

Atividade antimicrobiana do mel de abelhas *Apis mellifera* L. e *Melipona subnitida* L. frente amostras bacterianas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. / Francisco Vicente Andrade Neto. -- Mossoró: 2010.

53 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animais Área de concentração: Microbiologia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Pró-Reitoria de Pós-Graduação.

Orientador: Prof.º Dr. Sc. Sidnei Miyoshi Sakamoto

1.Atividade antimicrobiana. 2.Resistência bacteriana.
3.*Apis mellifera*. 4.*Melipona subnitida*. I.Título.

CDD:633.3

Bibliotecária: Marilene Santos de Araújo
CRB-5/1033

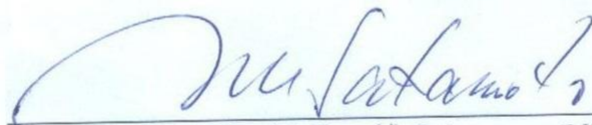
FRANCISCO VICENTE DE ANDRADE NETO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL DE
ABELHAS *Apis mellifera* L. e *Melipona subnitida* L. FRENTE
AMOSTRAS BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES DE
Staphylococcus aureus E *Pseudomonas aeruginosa***

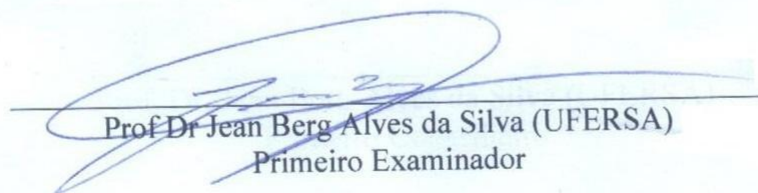
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural
do Semi-árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como
parte das exigências para obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal.

APROVADA EM: 25/08/2010

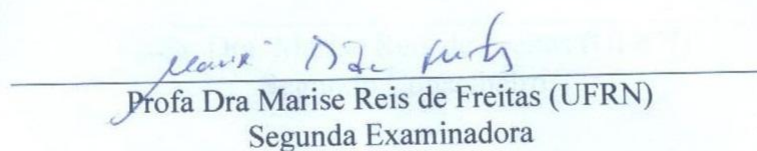
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Sidnei Miyoshi Sakamoto (UFERSA)
Orientador



Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva (UFERSA)
Primeiro Examinador



Profa. Dra. Marise Reis de Freitas (UFRN)
Segunda Examinadora

Aos verdadeiros mestres e sábios

“A sabedoria consiste na percepção de que a consciência divina está dentro de você, e que todo o amor, luz e poder do infinito se encontram à sua disposição, não vinda de livros, mas das experiências de vidas acumuladas”.

DEDICO

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

FRANCISCO VICENTE DE ANDRADE NETO – Brasileiro, nascido em Catolé do Rocha – PB, em 18 de setembro de 1967. Coursou o ensino fundamental na Escola de 1º Grau Joaquim da Silveira Borges, o ensino médio na Escola Estadual Professor Abel Freire Coelho, em Mossoró. É graduado em Ciências Biológicas Modalidade Médica pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, Bacharel em Microbiologia e Imunologia Médicas e Especialista em Epidemiologia Hospitalar pelo Núcleo de Ensino e Saúde Coletiva – NESC/UFRN/ANVISA; Por vários anos foi membro das Comissões de Controle de Infecção Hospitalar dos Hospitais Casa de Saúde São Lucas e Hospital do Coração de Natal. Realizou vários cursos de extensão, destacando-se o de Medidas de Prevenção e Controle da Resistência Microbiana e Programa de Uso Racional de Antimicrobianos em Serviços de Saúde. Atualmente é servidor público concursado exercendo a função de Técnico do Laboratório de Microbiologia da FACS/UERN; responsável técnico pelo Laboratório de Microbiologia do Centro de Análises Clínicas e Imunológicas de Mossoró – CACIM e Professor da disciplina de Microbiologia e Coordenador dos Laboratórios da Faculdade de Enfermagem Nova Esperança – FACENE/RN.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os meus familiares, pelo apoio e compreensão, em especial a minha esposa Dêneri e aos meus filhos Leonardo, Renato, Lissa e LÍlian que foram a fonte de inspiração, a força e a razão por que vencemos. Obrigado pela compreensão nos momentos em que estive ausente;

Agradeço a minha mãe Maria do Céu que me apoiou nas horas difíceis dessa jornada e aos meus irmãos Luciara, Juçara e Júnior que, apesar da distância, estão sempre presentes no meu coração;

Agradeço ao professor e orientador Sakamoto, pela paciência, respeito, pela amizade e pela confiança a mim atribuída, estando sempre pronto para ajudar, proporcionando novos conhecimentos e desafios;

Obrigado aos demais professores e profissionais da saúde, prof. Dr. Domingues Fotenelle, profa. Dra. Marise Reis, Dra. Flávia Rossi, Dr. Jesaias Rodrigues, prof. Dr. Marcos Leão, profa. Dra. Eveline Pipollo, Dra. Rosângela Moraes, Dr. Getúlio Vale, Dr. Juarez Vale, Prof. Dr. Fábio Marques, Dra. Lucia Calich, prof. Dr. Kleber Giovanni Luz e a todos os outros envolvidos, mesmo indiretamente, mas indispensáveis à realização deste trabalho;

Obrigada ao pessoal da Faculdade de Ciências da Saúde – FACS/UERN, Curso de Medicina, em especial ao Diretor Prof. Dr. Antonio Leite, que concedeu liberdade e muito apoiou para realização deste trabalho.

Obrigado a todos os funcionários do Departamento de Ciência Animal e a todos os colegas, pela amizade.

Minha gratidão ao pessoal dos laboratórios Centro Integrado de Microbiologia e Centro de Análises Clínicas e Imunológicas de Mossoró, com os quais compartilhei momentos muito agradáveis ao longo deste período, muito obrigado a todos, por tudo mesmo! Agradeço em especial a Suely Cabral e Eulália Maria, que me ajudaram indiretamente nos experimentos.

Agradeço ao meu avô materno Pedro da Várzea (*in memorian*), que com suas virtudes, entre elas a simplicidade, nos ensinou a superar dificuldades e preconceitos até o fim de sua vida;

Ao meu avô paterno, o lúcido Chico Manduca, meu divã, divino e sempre amigo, minha eterna gratidão;

Um agradecimento especial ao meu pai José Francisco de Andrade “o careca” (*in memorian*) que, sempre esteve e estará presente na minha educação, na minha formação como ser humano e, por toda minha vida.

EPÍGRAFE

“A atenção é a mais importante de todas as faculdades para o desenvolvimento da inteligência humana”.

(Charles Darwin)

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL DE ABELHAS *Apis mellifera* L. E *Melipona subnitida* L., FRENTE AMOSTRAS BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES DE *Staphylococcus aureus* E *Pseudomonas aeruginosa*.

NETO, Francisco Vicente de A. **Atividade antimicrobiana do mel de abelhas *Apis mellifera* L. e *Melipona subnitida* L. frente amostras bacterianas multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.** 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-árido, Mossoró – RN, 2010.

RESUMO: Nos últimos anos, a resistência bacteriana a múltiplas drogas tem aumentado devido ao uso indiscriminado de antibióticos, amplamente utilizados no tratamento de infecções. Essa situação tem forçado à busca de novas alternativas como substâncias naturais, com a finalidade desenvolver novos princípios com atividades antibacterianas reconhecidas. Os produtos naturais têm sido utilizados há milhares de anos pela medicina popular para diversos propósitos. Dentre eles está o mel, produto resultante da coleta e exsudatos de várias plantas pelas abelhas. Além de seu valor nutricional, o mel vem recebendo uma maior atenção pela comprovação de seus efeitos medicinais através de suas propriedades terapêuticas, especialmente a atividade antimicrobiana. Desta forma, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* exercida pelo mel das abelhas *Apis mellifera* L. e *Meliponea subnitida* L. sobre os microorganismos *Staphylococcus aureus* Resistente a Metilcilina (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes isolados de amostras hospitalares. As amostras de mel utilizadas foram obtidas de colméias mantidas na região de Serra do Mel, RN, Brasil, e do Centro Tecnológico de Apicultura (CETEC) da UFERSA, Mossoró, RN, Brasil. Dados das análises físico-químicas foram utilizadas para caracterização dos méis de *Apis mellifera* L., além da cor, consistindo em mel de cor clara (mC), âmbar claro (mAC) e âmbar escuro. O método de Kirby e Bauer, difusão em Agar de Mueller Hinton, foi utilizado para avaliação da atividade antimicrobiana do mel, utilizando poços de 06 mm de diâmetro, em presença de 06 isolados bacterianos. Para controle do experimento, em paralelo foram realizados antibiogramas com diferentes antibióticos comerciais, utilizando as linhagens ATCC 25953 e ATCC 27853. Os resultados dos testes demonstraram uma suscetibilidade para o MRSA, atingindo halos de inibição de até 31 mm de diâmetro. Porém, para a *Pseudomonas aeruginosa*, as zonas de inibição chegaram até 19 mm, consideradas menores quando comparadas as produzidas sobre o MRSA, devido, provavelmente, a fatores de resistência intrínsecos à *Pseudomonas aeruginosa*. Portanto, este estudo apontou até o momento para um potencial terapêutico deste produto natural, em especial a atividade antimicrobiana do mel de *Apis mellifera* L., demonstrando ser mais eficiente do que o mel de *Melipona subnitida*.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade antimicrobiana, resistência bacteriana, *Apis mellifera*, *Melipona subnitida*.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HONEY BEES *Apis mellifera* L. AND *Melipona subnitida* L. FRONT BACTERIAL SAMPLES MULTIRESISTANT *Staphylococcus aureus* AND *Pseudomonas aeruginosa*.

NETO, Francisco Vicente de A. **Antimicrobial activity of honey bees *Apis mellifera* L. and *Melipona subnitida* L. front bacterial samples multiresistant of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.** 2010. Dissertation (Master in Animal Science) - Universidade Federal Rural do Semi-árido Mossoró – RN, 2010.

ABSTRACT: In recent years, bacterial resistance to multiple drugs has increased due to the indiscriminate use of antibiotics, widely used to treat infections. This situation has challenged scientists to search for new alternatives such as natural substances, in order to develop new guidelines with antibacterial recognized. Natural products have been used for thousands of years by the popular medicine for several purposes. Among them is the honey, a product resulting from collection and exudates of various plants by bees. Besides its nutritional value, honey is receiving greater attention by the scientific evidence of its medicinal effects through its therapeutic properties, especially the antimicrobial activity. Thus, this study aims to evaluate the in vitro antimicrobial activity exerted by the honey bee *Apis mellifera* L. and *Melipona subnitida* L. on the microorganisms *Metilcilina Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital samples. The honey samples used were obtained from hives maintained in the region of Serra do Mel, RN, Brazil, and the Technological Center of Beekeeping (CETEC) of UFERSA, Mossoró, RN, Brazil. Data on the physical and chemical properties were used for characterization of honey from *Apis mellifera* L., in addition to color, consisting of honey-colored (mC), light amber (mAC) and dark amber. The method of Kirby and Bauer, diffusion in Mueller Hinton agar was used to evaluate the antimicrobial activity of honey, using wells 06 mm in diameter, in the presence of 06 bacterial isolates. To control the experiment, were conducted in parallel with different antibiograms commercial antibiotics, using the strains ATCC 25953 and ATCC 27853. The test results showed a susceptibility to MRSA, reaching inhibition zones of up to 31 mm in diameter. However, for *Pseudomonas aeruginosa*, the zones of inhibition reached 19 mm, considered minor when compared to produce about MRSA, probably due to factors intrinsic resistance to *Pseudomonas aeruginosa*. Therefore, this study identified to date for a therapeutic potential of this natural product, in particular the antimicrobial activity of honey from *Apis mellifera* L., proving to be the more efficient than honey from *Melipona subnitida*.

KEY WORDS: Antimicrobial activity, bacterial resistance, *Apis mellifera*, *Melipona subnitida*.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	07
ABSTRACT	08
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE QUADROS	12
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍGLAS E SÍMBOLOS	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 PRINCÍPIOS ATIVOS NATURAIS	16
3.2 PRODUÇÃO DE MEL	17
3.3 COMPOSIÇÃO DO MEL	19
3.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO MEL	20
3.5 PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS DO MEL	21
3.5.1 Atividade antimicrobiana do mel	21
3.6 AGENTES ANTIMICROBIANOS	25
3.7 AGENTES ETIOLÓGICOS	27
3.8 RESISTÊNCIA BACTERIANA	31
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 LOCAIS DOS EXPERIMENTOS	33
4.2 SELEÇÃO DO MEL	34
4.2.1 Análises microbiológicas	35
4.2.2 Análises físico-químicas	36
4.3 ANTIBIÓTICOS	37
4.4 SELEÇÃO DOS MICROORGANISMOS	37
4.4.1 Subcultivo e padronização do inóculo	37
4.5 ENSAIOS DE ANTIBIOSE	39
4.5.1 Resultados dos ensaios de antibiose	40
4.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS MÊIS	40
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 LEITURA E MENSURAÇÃO DOS RESULTADOS	42
6 CONCLUSÃO	47
7 REFERÊNCIAS	48

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Mapa político do Estado do Rio Grande do Norte localizando o Município de Serra do Mel.	34
FIGURA 2 – Potes de mel de <i>Apis mellifera</i> L., ilustrando a variedade de cores	35
FIGURA 3. À direita: potes de mel de <i>Meliponea subnitida</i> L.	35
FIGURA 4 – Preparação dos pocinhos nas placas de Agar de Mueller Hinton	38
FIGURA 5 – Inoculação do mel nos pocinhos	38
FIGURA 6 – Caracterização da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR	40
FIGURA 7 – Caracterização do <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA	40
FIGURA 8 – Halos de inibição produzidos pelos méis sobre MRSA (placa 01)	40
FIGURA 9 – Halos de inibição produzidos pelos méis sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR (placa 01)	41
FIGURA 10 – Halos de inibição produzidos pelos méis sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> MR (placa 01)	41
FIGURA 11 – Medição dos halos de inibição produzidos pelos méis sobre MRSA	41
FIGURA 12 – Representação gráfica do halo de inibição em <i>mm</i> produzido pelos méis de <i>Apis mellifera</i> L. sobre as bactérias MRSA1 e MRSA2	44
FIGURA 13 – Representação gráfica do halo de inibição em <i>mm</i> produzido pelos méis de <i>Apis mellifera</i> L. sobre as bactérias MRSA3 e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1	45
FIGURA 14 – Representação gráfica do halo de inibição em <i>mm</i> produzido pelos méis de <i>Apis mellifera</i> L. sobre as bactérias <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2 e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3	45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Composição média do mel de abelha_____	20
TABELA 2 – Infecções causadas por bactérias sensíveis à atividade antimicrobiana do mel_____	25
TABELA 3 – Zona de diâmetro (halos de inibição) para <i>Staphylococcus aureus</i> _____	29
TABELA 4 – Perfil de suscetibilidade da cepa ATCC 25953(<i>Staphylococcus aureus</i>)____	39
TABELA 5 – Perfil de suscetibilidade da cepa ATCC 27853(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	39
TABELA 6 – Resultados dos testes de controle com antibióticos comerciais_____	39

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Contagem de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C dos
méis de *Apis mellifera* L. e *Meliponea subnitida* L. utilizados no experimento_____35

QUADRO 2 – Contagem de bolores e leveduras dos méis de *Apis mellifera* L. e
Meliponea subnitida L. utilizados no experimento_____36

QUADRO 3 – Análises físico-químicas dos méis de *Apis mellifera* L. e *Meliponea*
subnitida L. utilizados no experimento_____36

QUADRO 4 – Relação dos microorganismos e o sítio infeccioso_____37

QUADRO 5 – Demonstração gráfica da inibição do crescimento bacteriano por méis
de *Apis mellifera* L. frente isolados de MRSA e *Pseudomonas aeruginosa* (halos de
inibição em mm)._____43

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

ATCC – *American Type Culture Collection*
CLSI – *Clinica and Laboratory Standards Institute*
NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
MRSA – *Metilcilin Resistant Staphylococcus aureus*
ESBL – *Extended-spectrum beta-lactamase*
DNA – *Ácido Desoxirribonucleico*
CETEC – *Centro Tecnológico de Apicultura*
PBP – *Proteínas Ligadoras de Penicilina*
CDC – *Center for Disease Control and Prevention*
NNIS – *National Nosocomial Infections Surveillance*
OXA – Oxacilina
VAN – Vancomicina
IPM – Imipenem
MEM – Meropenem
CAZ – Ceftazidima
POL – Polimixina
ATM – Aztreonam
CFO – Cefoxitina
PIT – Piperacilina + Tazobactam
CIP – Ciprofloxacina
BHI – *Brain Heart Infusion Broth Medium*
TSI – *Agar Tríplice de Ferro e Açúcar*
MC – Mel claro
MAC – Mel âmbar claro
MAE – Mel âmbar escuro
MJ – Mel de jandaíra
AA – Atividade antimicrobiana
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
H₂O – Molécula de Água
S1 – *Staphylococcus aureus*(cepa 01)
S2 – *Staphylococcus aureus* (cepa 02)
S3 – *Staphylococcus aureus* (cepa 03)
P1 – *Pseudomonas aeruginosa* (cepa 01)
P2 – *Pseudomonas aeruginosa* (cepa 02)
P3 – *Pseudomonas aeruginosa* (cepa 03)
MR – Multirresistente
µl – Microlitros
ml – Mililitros
µg – Micrograma
mm – Milímetros
°C – Grau Célcus
(p/v) – peso/volume
NMP – Número mais provável
UFC – Unidade Formadora de Colônia

1.INTRODUÇÃO

Apesar do grande desenvolvimento da indústria farmacêutica, especialmente na produção de medicamentos quimioterápicos, a partir de 1941, atualmente a medicina fitoterápica continua a ser muito utilizada, readquirindo certo valor desde que foram noticiadas as conseqüências do abuso de vários compostos químicos, como os antibióticos. Desde então, muitos pacientes foram curados de infecções potencialmente fatais usando-se mais de um esquema terapêutico. Porém, a utilização indiscriminada de tais fármacos resultou no aparecimento de inúmeros microrganismos resistentes, o que tornou necessário o emprego, cada vez maior, de novos quimioterápicos (GOODMAN & GILMAN, 2007).

As doenças infecciosas estão entre as principais causas de morte da população humana. E nos últimos anos, a resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas, comumente comercializadas e utilizadas na prática clínica no tratamento de doenças infecciosas, tem sido relatada. O surgimento de microrganismos resistentes pode ter várias origens, sendo uma delas decorrente do próprio tipo de vida do ser humano. O principal fator é, sem dúvida, o consumo excessivo e inapropriado dos antibióticos pelo homem, outros animais e na agricultura. A prescrição do antibiótico é geralmente empírica e sem a identificação prévia do agente patogênico através de exames laboratoriais. Ao mesmo tempo, o aumento da migração da população e o transporte de animais ou de produtos de origem animal trazem doenças para áreas onde nunca haviam se instalado, resultando no espalhamento de microrganismos resistentes aos antibióticos (LOHNER & STAUDEGGER, 2001).

Segundo Brito (2001) a medicina empírica é prática comum na cultura popular, a despeito das orientações medicamentosas atuais serem baseadas em investigações e comprovações científicas, representando cada vez mais para a população leiga uma perspectiva de ampliação e incremento do arsenal terapêutico. Essa situação tem forçado os cientistas à busca de novas alternativas como substâncias naturais, com a finalidade procurar novas drogas e princípios com atividades antimicrobianas reconhecidas, existentes nos extratos e óleos essenciais de plantas, utilizados no tratamento de diversas enfermidades (PÉREZ, D., 1998). Portanto, apesar da disponibilidade de um grande número de antibióticos de última geração, torna-se ainda fundamental buscar compostos que possam atuar como novas drogas a serem utilizadas no combate as doenças infecciosas (LOHNER & STAUDEGGER, 2001).

O conhecimento sobre os produtos naturais sempre tem acompanhado a evolução do

homem através dos tempos. Registros existentes da medicina romana, egípcia, persa e hebraica apontam que os produtos naturais eram utilizados de maneira extensiva para curar praticamente todas as doenças, até então, conhecidas pelo homem (MATOS, 1999). Os recursos terapêuticos disponíveis até o século XIX eram exclusivamente oriundos de plantas medicinais e extratos vegetais, tornando-se objeto de estudo científico, a partir do século XX, com a tendência de se isolar os princípios ativos, no que se refere às suas variadas propriedades medicinais, inclusive quanto à atividade antimicrobiana. No Brasil, se observa um uso disseminado de substâncias naturais com objetivo de tratamento de várias doenças, principalmente infecções de pele e respiratórias (BRITO et al., 2001; LOGERCIO et al., 2005).

Um agente promissor nesse sentido é o mel, produto resultante da coleta e exsudatos de várias plantas pelas abelhas. O primeiro estudo sobre os efeitos antimicrobianos do mel foi relatado por Van Ketel em 1892. Desde então vários outros estudos têm sido realizados sobre este assunto, na tentativa de identificar os agentes antimicrobianos em mel e da gama de organismos sensíveis a esta ação antimicrobiana (JOHNSON et. al., 2005; KACÁNIOVÁ et al., 2009; COOPER et. al., 2005; GHORI et al., 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* exercida pelo mel de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) e abelhas indígenas sem ferrão (*Melipona subnitida* L.) sobre os microorganismos *Staphylococcus aureus* Resistente a Metilcilina (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes isolados de amostras provenientes de pacientes hospitalares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a atividade antimicrobiana das amostras de mel com diferentes características físico-químicas frente a isolados hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes, de diferentes topografias infecciosas em humanos.
- Detectar uma possível atividade antimicrobiana das amostras de mel frente a isolados hospitalares de *Staphylococcus aureus* Resistente a Metilcilina (MRSA).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PRINCÍPIOS ATIVOS NATURAIS

Atualmente a medicina tradicional tem crescido em todos os sentidos, mas a importância dada aos produtos naturais como alternativas terapêuticas vem aumentando a cada dia, e o homem tem se beneficiado da ciência que lhes permitiu conhecer inúmeras substâncias e processos organizados pela natureza para desenvolver diversos outros compostos de uso medicinal. Como as plantas produzem inúmeras substâncias biologicamente ativas, tem-se nos produtos de origem vegetal uma fonte importante de recursos. Produtos naturais, quer como compostos puros, como o mel, o própolis e a geléia real produzidos pelas abelhas ou extratos vegetais padronizados, proporcionam oportunidades ilimitadas para novos medicamentos, devido à disponibilidade de diversidade química em sua composição (OLIVEIRA e AKISSUE, 1992; COS et al., 2006).

Os produtos naturais têm sido utilizados há milhares de anos pela medicina popular para diversos propósitos. Muitas das terapias milenares de civilizações antigas utilizaram os produtos das abelhas como valiosos recursos terapêuticos e/ou conservativos. Nos últimos tempos o mel tem ganhado popularidade como um composto saudável, sendo utilizado como alimento e também por proporcionar benefícios à saúde humana prevenindo doenças como inflamação, cardiopatias e até mesmo o câncer. Curiosamente, o mel tem sido reivindicado para reduzir a inflamação, debridamento de tecido necrosado, reduzir edema, e promover a angiogênese e epitelização. Mais recentemente, tem havido uma série de relatórios de mel sendo utilizado com sucesso como curativo para feridas, incluindo queimaduras, úlceras, feridas cirúrgicas infectadas, infecções necrotizantes de tecidos moles, feridas meningocócica e abdominais e, no tratamento e prevenção do resfriado comum e várias infecções do trato respiratório (JOHNSON et. al., 2005; COOPER et. al., 2005; GHORI et al., 2009).

Vários estudos têm sido propostos para validar esta cultura popular sobre as propriedades terapêuticas do mel, e em tempos mais recentes tem-se observado um renascimento do seu uso entre outros produtos fornecidos pelas abelhas como medicamento. Encontra-se nos produtos das abelhas, como o mel e própolis, atividades biológicas essenciais à vida humana e a longevidade como um todo: antiinflamatória, antimicrobiana, citotóxica contra células tumorais, antioxidante, hepatoprotetora, proteção do pâncreas e do baço, controle da diabetes, mau colesterol, controle do

excesso de triglicerídios entre outras inúmeras atividades. O mel como a maioria dos produtos naturais, pode ter uma grande variação em componentes terapêuticos em função da sua origem (BASUALDO et al., 2007; MUILI et al., 2008).

As plantas produzem o néctar, usado pelas abelhas para originar o mel e outros produtos. Elas transformam o néctar por meio da evaporação da água e da adição de enzimas, de forma que, os compostos bioativos da planta de origem do néctar podem ser transferidos para o mel. A capacidade antioxidante e a composição do mel dependem da fonte floral, das condições ambientais, etc. Assim, a origem floral do mel desempenha um papel importante em suas propriedades biológicas. Em consequência, não seria espantoso acreditar que a proveniência do mel pode determinar suas propriedades antibacterianas (BASUALDO et al., 2007; MUILI et al., 2008).

3.2 PRODUÇÃO DE MEL

A apicultura é uma atividade agropecuária alternativa que vem despertando grande interesse no Brasil e principalmente na região Nordeste, gerando nos últimos anos grandes benefícios sociais, ecológicos e econômicos, como uma das atividade mais rentáveis do País, e seu crescimento tem se baseado no aproveitamento de floradas silvestres nativas (MILFONT et al., 2009). Além disso, o Brasil possui potencial para a obtenção de grandes quantidades de produtos apícolas, devido às condições climáticas bastante favoráveis na maior parte do seu território; extensas áreas ocupadas com cobertura vegetal natural diversificada ou substituída por várias culturas agrícolas, pomares comerciais e reflorestamentos que apresentam interesse apícola. Uma vantagem competitiva que a apicultura brasileira possui é o elevado grau de tolerância as pragas e doenças que as abelhas africanizadas apresentam e que tantos prejuízos tem causado em outras importantes regiões apícolas mundiais (PEREZ et al., 2004; APICULTURA, 2004).

As abelhas são insetos da ordem das Himenópteras, que surgiram na terra há mais de 50 milhões de anos. No Brasil, além da *Apis mellifera* L. introduzida por imigrantes europeus no século XIX, são também encontradas abelhas sociais nativas, pertencentes à subfamília Meliponinae. Estas são popularmente conhecidas como abelhas-indígenas-sem-ferrão, compreendendo mais de 200 espécies diferentes, algumas das quais frequentemente criadas para a produção de mel (DEMERA et al., 2004; GONÇALVES et al, 2005). As abelhas meliponíneas são as espécies borá (*Tetragona clavipes* L.), jataí (*Tetragonisca angustula* L.), jandaíra

(*Melipona subnitida* L.), mandaçaia (*Melipona quadrifasciata* L.), mirins (*Plebéia* sp.) e urucu nordestina (*Melipona scutellaris* L.) (NOGUEIRA-NETO, 1997).

O mel para consumo humano é definido, segundo a instrução normativa nº11 (BRASIL, 2000), como “o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes das partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam madurar nos favos da colméia” (mel de melato) (SILVA et al., 2006).

Dos produtos fornecidos pelas abelhas, o mel é sem dúvida o mais conhecido e difundido. Foi um dos primeiros alimentos do homem e praticamente todas as civilizações antigas o utilizaram como suplemento alimentar e recurso medicinal, graças as suas inúmeras propriedades atribuídas. Atualmente utiliza-se fartamente do mel sob diversas formas e associações, sem desconhecer suas qualidades farmacológicas como fitoterápicos e seu valor nutricional, pois além de sua qualidade como alimento o mel é dotado de inúmeras propriedades terapêuticas (MULLAI et al., 2007; GONÇALVES et al, 2005; SILVA et al., 2006).

O mel é considerado o produto apícola mais fácil de ser explorado, sendo também o mais conhecido e aquele com maiores possibilidades de comercialização. Além de ser um alimento, é também utilizado em indústrias farmacêuticas e cosméticas, pelas suas conhecidas ações terapêuticas. No entanto, os princípios científicos aplicados ao mel começam quando o apicultor retira o favo da colméia, e a partir daí efetiva a colheita e o respectivo processamento dentro de normas técnicas e altamente higiênicas, para que o produto alcance o consumidor com todas as suas qualidades essenciais, sem outras interferências prejudiciais (SILVA et al., 2006; SOUSA et al., 2008).

3.3 COMPOSIÇÃO DO MEL

O mel é uma substância natural espessa e doce produzida pelas abelhas a partir do néctar das flores ou de secreções sacarínicas de partes vivas de plantas ou das excreções de plantas, que as abelhas recolhem, transformam e combinam com substâncias específicas próprias. É também definido como néctar e exsudação açucarada de plantas, que são coletadas e modificadas pelas abelhas através da evaporação da água e da adição de enzimas, as quais armazenam e deixam maturar nos favos da colméia (OLAITAN et al., 2007; AL-WALI, 2004; LERRER et al., 2007).

A composição do mel é bastante variável, sendo influenciada por sua origem floral e geográfica, assim como pelas condições climáticas do local de produção, sendo, por isso, classificado como um alimento complexo do ponto de vista biológico e analítico. O mel é constituído essencialmente de vários açúcares, representando 95 a 99% do mel de matéria seca, predominantemente D-frutose (38,2%) e D-glicose (31,3%) (OLAITAN et al., 2007), como também de outros componentes e substâncias como maltose, sacarose, oligossacarídeos, carboidratos, minerais, ácidos orgânicos, derivados de carotenóides, terpenóides, flavonóides, ácidos fenólicos, enzimas glucose oxidase, catalase, ácido ascórbico e partículas sólidas coletadas pelas abelhas.

A aparência do mel, seu sabor e aroma dependem da origem floral, processamento, armazenamento, fatores climáticos durante o fluxo de néctar, tempo de amadurecimento do mel na colméia e conteúdo de minerais. Apresenta uma coloração que varia do amarelo-claro a marrom-escuro, podendo ser bastante viscoso ou até mesmo sólido e, em função do tratamento o mel pode ser fluido, espesso ou cristalino. Variedades de mel podem ser identificadas por sua cor, gosto, sabor e maneira de cristalização. Em circunstâncias excepcionais, o sedimento do mel é analisado pelo conteúdo de grãos de pólen. Outras características úteis na identificação do tipo de mel incluem condutividade específica e componente do flavor específico da variedade (RYBAK, 2004; PEREIRA et al. 2003; MULLAI et al., 2007; LURLINA et al., 2005). A água é o segundo componente mais importante do mel. Seu conteúdo é fundamental, pois afeta o armazenamento do mel. O teor de água final depende de inúmeros fatores ambientais durante a produção, tais como clima e umidade no interior da colméia, mas também sobre as condições do néctar e o tratamento do mel durante a extração e armazenamento (OLAITAN et al., 2007).

Tabela 1 - Composição média do mel de abelha (SILVA et al., 2006)

Valor calórico e composição centesimal		Minerais		Vitaminas	
Calorias (kcal/100g)	304	Cálcio (mg/100g)	6	Vit. C (mg/100g)	0,5
Umidade (g/100g)	17,10	Fósforo (mg/100g)	4	Riboflavina (mg/100g)	0,038
Carboidratos totais (g/100g)	82,40	Sódio (mg/100g)	4	Niacina (mg/100g)	0,121
Frutose (g/100g)	38,50	Potássio (mg/100g)	52	Ac. Pantotênico (mg/100g)	0,068
Glicose (g/100g)	31,00	Ferro (mg/100g)	0,42	Vit. B-6 (mg/100g)	0,024
Maltose (g/100g)	7,20	Zinco (mg/100g)	0,22	Folato total (mg/100g)	2
Sacarose (g/100g)	1,50	Magnésio (mg/100g)	2		
Outros carboidratos (g/100g)	4,00	Selênio (mcg/100g)	0,8		
Fibras (g/100g)	0,2	Cobre (mg/100g)	0,036		
Proteína total (g/100g)	0,30	Manganês (mg/100g)	0,080		

Fonte: USDA

3.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO MEL

Existem muitas variações em relação as características dos méis produzidos em diferentes regiões do Brasil, seja em relação às suas características organolépticas (aroma, sabor e cor), seja em relação à composição físico-química, visto que vários fatores podem interferir na sua qualidade, como condições climáticas, estágios de maturação, espécie de abelha, processamento e armazenamento, além do tipo de florada. Este conjunto de características tem possibilitado o desenvolvimento de grandes projetos, obtendo-se mel sem qualquer contaminação química. Contudo, estas mesmas características que possibilitam ao País um grande potencial produtivo, proporcionam uma grande variação na composição desse produto. Devido a esta diversidade de fatores, os estudos voltados para a caracterização físico-química dos méis são de extrema importância para a criação de padrões de qualidade, subsidiando a sua melhoria e dando garantias do produto ao consumidor (MALIKA et al., 2004; SILVA et al., 2004; ALVES et al, 2005; BALTRUAIKYTE et al., 2007). Essas características também são utilizadas no sentido de fornecer informações que possam contribuir para o conhecimento do produto, dentre elas: os açúcares, umidade, atividade diastásica, hidroximetilfurfural, proteínas, cinzas. pH, acidez, índice de formol, condutividade elétrica, viscosidade e cor (ALVES et al, 2005).

As características físico-químicas observadas no mel proveniente da flor do cajueiro são marcantes e permitem caracterizá-lo como um produto próprio das áreas de cajucultura, sendo, portanto, típico da região Nordeste do Brasil. Sua coloração escura, acidez total acentuada e a quantidade de aminoácidos relativamente alta podem, juntamente com outros parâmetros, como o polínico e sensorial, ser características importantes na denominação da origem geográfica deste mel, agregando assim valor à produção regional (BENDINI et al., 2008).

O mel das abelhas sem ferrão (nativas) é um produto que tem apresentado uma demanda crescente de mercado, pelo sabor peculiar e pelas propriedades terapêuticas a ele atribuídas, obtendo preços mais elevados que o das abelhas do gênero *Apis* em diferentes regiões do Brasil. Entretanto, ainda existem poucos estudos sobre as características físico-químicas, que possibilitem definir padrões de qualidade para a sua comercialização (KEER et al., 1996; MARTINS et al., 1997).

3.5 PROPRIEDADES TERAPÊUTICAS DO MEL

Durante as últimas décadas, a utilização indiscriminada de antibióticos em diversos setores da agricultura, bem como da saúde humana, vem favorecendo a emergência de linhagens de microorganismos patogênicos apresentando resistência aos mais variados antibióticos. Frente à necessidade de desenvolvimento de novas classes de antibióticos, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas com produtos naturais, seja de origem vegetal como animal, visando à detecção e caracterização de compostos químicos com propriedades terapêuticas, entre elas a antimicrobiana. (GONÇALVES et al, 2005) Como alternativa aos agentes terapêuticos tradicionais, uma ampla variedade de substâncias naturais têm sido utilizadas, dentre as quais o uso tópico de substâncias com elevada osmolaridade como o mel, sendo o açúcar e seus derivados citados como agentes cicatrizantes e antimicrobianos (SILVA et al., 2006; BALTRUAIKYTE et al., 2007; ALVES et al, 2008; CASTRO et al, 2009).

3.5.1 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL

Dentre as propriedades farmacológicas do mel, a atividade antimicrobiana tem despertado interesse entre os pesquisadores devido ao seu potencial de aplicabilidade em casos clínicos, como poder cicatrizante e antioxidante. Nesse sentido, o uso do mel de abelha como elemento terapêutico têm mostrado resultados promissores. Contudo, os efeitos terapêuticos variam de acordo com os seus constituintes e variedades de compostos. O mel tem sido relatado a ter um efeito inibitório para cerca de 60 espécies de bactérias, incluindo aeróbias e anaeróbias, Gram-positivas e Gram-negativas, como o *Staphylococcus aureus* e a *Pseudomonas aeruginosa*, considerada um patógeno oportunista (ALVES et al, 2008; OLAITAN et al., 2007; LEE et al., 2008; CASTRO et al, 2009; LURLINA et al., 2005; LERRER et al., 2007; KWAKMAN, P.H.S. et. al., 2010).

O mel tem sido utilizado desde os tempos antigos para o tratamento de algumas doenças respiratórias e para a cura de feridas cutâneas, ou seja, ele tem a capacidade de neutralizar a ação de vários microorganismos, além de ser considerado um alimento de alto teor energético. A capacidade de o mel poder inibir o crescimento bacteriano pode ser devido a diversos fatores distintos, e essa atividade antibacteriana pode ser explicada pelo elevado teor de minerais –

muitos dos quais fatais para um grande número de microorganismos – e pela própria ação física do produto na presença de bactérias, quando ocorre um processo semelhante a osmose, o mel rouba água de certas bactérias sem a qual não podem sobreviver. Vários mecanismos têm sido descritos para explicar sua atividade antimicrobiana e seu efeito curativo, podendo ser devido às propriedades físicas e químicas. Os embasamentos existentes relacionados à atividade antimicrobiana do mel são controversos. Segundo Molan (1992), os fatores físicos, como sua alta osmolaridade e acidez do mel, e os fatores químicos relacionados com a presença de substâncias inibidoras, estão entre as características físicas que contribuem para sua ação bactericida e bacteriostática. Compostos voláteis, ácidos orgânicos, cera de abelha, néctar, pólen e própolis, incluindo entre outros compostos, duas importantes classes de flavonóides e os ácidos fenólicos (ácido caféico e ácido ferúlico) são importantes fatores químicos que também fornecem propriedades antibacterianas ao mel. Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana. Entretanto, tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuar sobre sistemas biológicos. Conseqüentemente, muitas dessas propriedades atuam de forma benéfica para a saúde humana. Atualmente, já foram identificadas mais de quatro mil substâncias pertencentes ao grupo dos flavonóides. Algumas enzimas secretadas por glândulas do aparelho digestivo das abelhas são introduzidas no néctar já a partir de sua coleta, como a glicose-oxidase, que converte a glicose em glicolactona, produzindo também o peróxido de hidrogênio, este último considerado por muitos autores como sendo responsável pela atividade antimicrobiana constatada no mel (BASUALDO et al., 2007; MULLAI et al., 2007; OLAITAN et al., 2007; KWAKMAN et al., 2008; LEE et al., 2008; LURLINA et al., 2005; COOPER et al., 2005; MALIKA et al., 2004; GONÇALVES et al., 2005).

Muitos compostos já foram identificados no mel, porém, até o momento, as suas propriedades farmacológicas, especialmente à atividade antimicrobiana, antiinflamatória, e cicatrizante, foram as mais estudadas. Os embasamentos existentes relacionados à atividade antimicrobiana do mel são controversos. Segundo Molan (1992), os responsáveis pela atividade antimicrobiana são os fatores físicos, como sua alta osmolaridade e acidez, e os fatores químicos relacionados com a presença de substâncias inibidoras, como o peróxido de hidrogênio, e substâncias voláteis, como os flavonóides e ácidos fenólicos.

Outros estudos, também constataram uma correlação direta entre a redução no conteúdo de peróxido de hidrogênio e a redução na atividade antimicrobiana de méis expostos a luz, concluindo-se que, quanto mais secreções as abelhas adicionam ao néctar ou a soluções açucaradas, mais ricas estas ficam em glicose oxidase e, conseqüentemente, a quantidade de peróxido de hidrogênio se torna maior, incrementando desta forma a atividade antimicrobiana destes méis. Entretanto outros autores (MOLAN & RUSSELL, 1988), após efetuarem a remoção enzimática do peróxido de hidrogênio contido no mel monofloral, constataram que o mesmo continuava inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus*. Baseado nestes experimentos, estes mesmos autores sugeriram que substâncias antibacterianas adicionais, e não apenas o peróxido de hidrogênio, proveriam uma significativa parcela da atividade antimicrobiana do mel. Estes outros fatores estariam relacionados com as fontes florais do mel ZUMLA & LULAT (1989), sugerem que o efeito osmótico e o baixo pH encontrados no mel, contribuem para o rompimento da parede da célula bacteriana. E, entre outros, a presença de flavonóides, juntamente com o acúmulo de peróxido de hidrogênio estariam sinergisticamente atuando na atividade antimicrobiana final do mel (GONÇALVES et al, 2005; BALTRUITYTE, 2007).

O mel contém ácidos (o pH médio é cerca de 3,9 e varia entre 3,1 a 4,5) que contribuem para a sua resistência a danos causados por microorganismos. O mel contém muito mais ácido glucônico do que qualquer outro ácido; ele é produzido pela ação, sobre a glicose, da enzima glicose-oxidase, proveniente das glândulas hipofaríngeas das abelhas e está em equilíbrio com a glicolactona. Este tipo de equilíbrio caracteriza a acidez lactônica (RACOWSKI et al, 2007).

A enzima invertase adicionada pelas abelhas transforma 3/4 da sacarose inicial do néctar coletado nos açúcares invertidos em glicose e frutose, ao mesmo tempo, que açúcares superiores são sintetizados, não estando presentes no material vegetal original. Esta ação é contínua até que o “amadurecimento” total do mel ocorra. Dessa forma, pode-se definir o amadurecimento do mel como a inversão da sacarose do néctar pela enzima invertase e sua mudança simultânea de concentração (CAMARGO et al., 2003).

A enzima glicose-oxidase, excretada pelas abelhas, é a responsável pela conversão da glicose, na presença de água e oxigênio, em ácido glucônico (principal composto ácido do mel) e peróxido de hidrogênio, ambos considerados potentes agentes antioxidantes que atacam a membrana citoplasmática dos microorganismos, preservando e mantendo a esterilidade do mel durante a maturação. A principal substância antibacteriana do mel é o peróxido de hidrogênio,

capaz de proteger o mel contra a decomposição bacteriana até que seu conteúdo de açúcares esteja alto o suficiente para fazê-lo e cuja quantidade presente é dependente tanto dos níveis de glicose-oxidase, quanto de catalase, uma vez que a catalase destrói o peróxido de hidrogênio (WESTON et al., 2000).

O Peróxido de hidrogênio é um agente antimicrobiano muito conhecido, inicialmente aclamado por suas propriedades bactericidas e desinfetantes quando utilizado pela primeira vez em atividades clínicas. (MOLAN, 1992). Apesar da concentração de peróxido de hidrogênio no mel ser muito baixa ele é considerado eficaz como um agente antimicrobiano.

O peróxido de hidrogênio e acidez é produzido pela reação:



Pesquisas têm mostrado que muitas bactérias patogênicas são sensíveis a atividade antimicrobiana do mel. Mais recentemente tem havido uma série de relatos de mel sendo utilizado com sucesso como curativo para feridas, incluindo queimaduras, úlceras, feridas infectadas, infecções necrotizantes de tecidos moles, infecções abdominais. Uma análise de experimentos controlados que envolvem o uso do mel com poder curativo, mostrou ser superior aos anti-sépticos e ou antibióticos de uso sistêmico para cicatrização de feridas, manutenção da esterilidade e erradicação da infecção. Em outros estudos, alguns méis foram testados para exercer uma ação antimicrobiana contra um amplo espectro de microorganismos, incluindo bactérias resistentes a antibióticos como o *Staphylococcus aureus* resistente a metilcilina, *Enterococcus* sp. resistente à vancomicina e outros bastonetes gram negativos multirresistentes (COOPER et al, 1999; JOHNSON et al, 2005; SILVA et al., 2006).

A resistência microbiana do mel nunca foi relatada, o que torna um promissor agente antimicrobiano. No entanto, a atividade *in vitro* do mel contra bactérias resistentes aos antibióticos e suas aplicações relatadas como bem sucedidas no tratamento de algumas infecções crônicas que não respondem à terapia antibiótica, têm atraído uma importante atenção dos pesquisadores (BOUKRAA, 2008).

As doenças infecciosas estão entre as principais causas de morte da população humana. Esse fato é devido, em grande parte, ao surgimento de microorganismos multirresistentes aos antibióticos. Bactérias resistentes a antibióticos representam uma grave ameaça para a saúde pública. Para todos os tipos de antibióticos, incluindo a última grande instância de drogas, a

frequência de resistência bacteriana está aumentando cada vez mais em todo o mundo. Ainda mais alarmante, atualmente poucos antibióticos estão sendo desenvolvidos, pois muitas indústrias farmacêuticas deixaram o campo de descoberta de novos antibióticos. Portanto, estratégias alternativas de antimicrobianos são urgentemente necessárias (LOHNER & STAUDEGGER, 2001).

A Tabela 2 mostra alguns dos patógenos sensíveis a ação do mel e as possíveis infecções causadas por estes (SILVA et al., 2006).

Tabela 2 - Infecções causadas por bactérias sensíveis a atividade antimicrobiana do mel.

PATOGENOS	INFECÇÕES
<i>Bacillus anthracis</i>	Anthrax
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Difteria
<i>Escherichia coli</i>	Diarréia, infecções urinárias, etc.
<i>Haemophilus influenzae</i>	Infecções respiratórias, sinusites, etc.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pneumonia
<i>Listeria monocytogenes</i>	Meningite
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculose
<i>Pasteurella multocida</i>	Mordidas de animais infectados
<i>Proteus species</i>	Infecções urinárias e de ferimentos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infecções urinárias e de ferimentos
<i>Salmonella species</i>	Diarréia
<i>Salmonella cholerae-suis</i>	Septicemia
<i>Salmonella typhi</i>	Febre tifóide
<i>Salmonella typhimurium</i>	Infecções de ferimentos
<i>Serratia marcescens</i>	Septicemia
<i>Shigella species</i>	Disenterias
<i>Staphylococcus aureus</i>	Infecções de ferimentos
<i>Streptococcus faecalis</i>	Infecções urinárias
<i>Streptococcus mutans</i>	Cáries dentárias
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Meningites, pneumonia e sinusites
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Febre reumática, infecção de garganta
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera

(SILVA et al., 2006).

3.6 AGENTES ANTIMICROBIANOS

O conceito substâncias derivadas de um organismo vivo podem exterminar outros (antibiose) é quase tão antigo quanto a ciência da microbiologia. Na verdade, a aplicação da antibioticoterapia, sem que fosse reconhecida como tal, é consideravelmente antiga. O triunfo dos antibióticos sobre as bactérias patogênicas é uma das mais bem sucedidas histórias da medicina moderna. No sentido mais estrito, os antibióticos são substâncias químicas antibacterianas produzidas por diversas espécies de microorganismos (bactérias, fungos e actinomicetos),

utilizadas para o tratamento de moléstias infecciosas, suprimindo o crescimento de outros microorganismos, podendo eventualmente matá-los. Os antibióticos diferem bastante em suas propriedades físicas, químicas e farmacológicas, espectro antimicrobiano e mecanismo de ação. Muitos antimicrobianos foram identificados quimicamente e outros foram sintetizados em laboratório, os quimioterápicos, aumentando muito o arsenal terapêutico (ALTERHUM, 2004; GOODMAN & GILMAN, 2007).

A essência da quimioterapia é a toxicidade seletiva, matar ou inibir o microorganismo sem afetar o hospedeiro. Os antibióticos e os quimioterápicos interferem com diferentes atividades da célula bacteriana, causando a sua morte, efeito bactericida, ou somente inibindo o seu crescimento, produzindo um efeito bacteriostático. Do ponto de vista clínico, tanto os bactericidas como os bacteriostáticos são extremamente eficientes. As interações dos antimicrobianos com a célula bacteriana podem ocorrer no nível da parede, membrana citoplasmática, síntese de proteínas e síntese de ácidos nucleicos. Três condições devem ser preenchidas para que um antimicrobiano iniba ou mate uma bactéria: a existência de um alvo, o antimicrobiano deve ter a capacidade de atingir o alvo e não pode ser inativado antes de atingi-lo. A partir desse princípio, as bactérias podem ser classificadas em sensíveis e resistentes aos antimicrobianos. A resistência pode ser natural ou adquirida. A natural corresponde a uma característica da espécie bacteriana e todas as amostras desta espécie têm esta propriedade. Na adquirida, somente parte das amostras é resistente. Devendo ficar claro que o antimicrobiano não induz a resistência, sendo essa aquisição decorrente de uma alteração genética que se expressa bioquimicamente (VENONESE et al, 2002; GOODMAN & GILMAN, 2007).

Há várias classes de antibióticos disponíveis para uso clínico, como penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclinas, quinolonas e sulfonamidas; porém, muitas doenças infecciosas vêm tornando-se de difícil tratamento.

Os antibióticos estão entre os medicamentos mais comumente prescritos e também utilizados de forma incorreta. A consequência inevitável do uso disseminado é o aparecimento de patógenos resistentes, levando a uma necessidade cada vez maior de novos antimicrobianos. Entretanto, o ritmo de desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas diminuiu drasticamente, com a introdução de um pequeno número de novos fármacos anualmente na prática clínica, dos quais poucos são realmente novos. A demanda por novos antimicrobianos também é decorrência do alto custo e dos inúmeros efeitos colaterais das drogas atualmente disponíveis. Acredita-se que

a redução do uso inapropriado dos antibióticos constitua a melhor maneira de controlar a resistência (WANNMANCHER, 2004; ALTERHUM, 2004; GOODMAN & GILMAN, 2007; NASCIMENTO et al, 2000).

3.7 AGENTES ETIOLÓGICOS

As infecções bacterianas têm tido um papel marcante na história da humanidade. Desde tempos remotos diversos agentes bacterianos têm sido responsáveis por doenças endêmicas ou epidêmicas que tiveram efeitos devastadores sobre a população. As infecções bacterianas podem ser divididas em dois grandes grupos: exógenas e endógenas. São consideradas exógenas as infecções cujos agentes atingem o hospedeiro a partir de um reservatório ou fonte externa, e endógenas as infecções causadas por agentes da flora normal do próprio hospedeiro. Quando a bactéria se instala com sucesso no hospedeiro, ela o infecta, podendo vir ou não a provocar a doença. Muitas bactérias são parte da flora normal que o homem abriga em vários dos seus órgãos e, em geral, causam apenas infecção. Os agentes infecciosos para sobreviverem e se multiplicarem necessitam de condições apropriadas. Os locais que tais condições existem são os reservatórios, que pode ser o próprio homem ou um outro animal. Porém, uma característica importante dos agentes infecciosos é a sua capacidade de dinamicamente mover-se entre hospedeiros diversos, eventualmente causando doenças, quando encontra um indivíduo susceptível (ALTERHUM, 2004; PEREIRA, 2003; MURRAY, 2006; ZANON, 2007).

Entre os agentes infecciosos que colonizam os seres humanos, estão os cocos gram-positivos, os quais formam um grupo heterogêneo de aproximadamente 21 gêneros. A forma esférica, a reação do método de Gram e a ausência de endósporos são características comuns que eles compartilham. Dentre os vários gêneros de cocos, estão os aeróbios catalase-positivos, tendo como destaque os *Staphylococcus*, estando presentes na pele e nas membranas mucosas dos seres humanos, em outros mamíferos e em aves. Atualmente o gênero compreende 32 espécies e 15 subespécies, muitas das quais podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. O gênero *Staphylococcus* é constituído por importantes patógenos humanos, sendo as espécies mais comuns o *Staphylococcus epidermidis*, o *Staphylococcus saprophyticus* e o *Staphylococcus aureus* causando um amplo espectro de doenças sistêmicas potencialmente fatais; infecções cutâneas, de tecidos moles, ossos e das vias urinárias; e infecções oportunistas. A espécie mais comumente associada a doença humana é o *Staphylococcus aureus*, o membro mais virulento e

mais bem conhecido do gênero (VENONESE et al, 2002; MURRAY et al., 2006; KONEMAN et al., 2008; ROSSI et al., 2005)

O *Staphylococcus aureus* é um agente etiológico importante associado à infecções adquiridas, tanto na comunidade como em hospitais, e que se tornou um paradigma das infecções bacterianas. Considerado um dos principais patógenos humanos, destaca-se por sua patogenicidade que o capacita a produzir doenças tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto em hígidos e por sua fácil disseminação intra-hospitalar associada à resistência aos antibióticos (MENEGOTTO & PICOLI, 2007).

As infecções causadas pelo *Staphylococcus aureus* são de extrema relevância pela capacidade das cepas desenvolverem resistência à oxacilina (metilcilina), antibiótico amplamente utilizado no tratamento de infecções relacionadas, visto que entre as infecções comunitárias e nosocomiais aquelas produzidas pelos *Staphylococcus aureus* metilcilina resistente (MRSA) tem lugar de destaque por constituir um sério problema, pela sua frequência, morbidade e mortalidade e principalmente pelas dificuldades de tratamento. Essa resistência constitutiva à oxacilina é determinada pela presença de um gene localizado no cromossomo, o gene *mecA*, que altera a estrutura das *proteínas ligadoras de penicilina* (PBP) presentes na membrana, reduzindo a eficácia dos antibióticos beta-lactâmicos, sem relação com a produção de beta-lactamases. Estes organismos são denominados de *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina (MRSA) (ROSSI et al, 2005; COLLI et al., 2009). Dentre os fatores de risco para infecção por MRSA considera-se o tempo de internação, terapia prolongada com antibióticos, presença de feridas, uso de cateter e contato com pessoas que apresentam estes fatores de risco. O contato direto com essas infecções propicia a disseminação dessa bactéria, porém pode ser prevenida através da higienização e da assepsia rigorosa das mãos, principalmente dos profissionais de saúde que são o veículo mais comum para a transmissão do MRSA (HARDY et al., 2004).

Dados do *National Nosocomial Infections Surveillance* (NNIS), do *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), mostram que, desde 1999, a proporção de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina (MRSA) ultrapassa a 50% entre os pacientes internados em UTI. No Brasil, os índices de cepas MRSA são também, em média, bastante elevados (40% a 80%), principalmente nas cepas isoladas em UTI. Muitos estudos têm documentado, também, aumento de custos associados a infecções por MRSA em hospitais. O aumento de custo pode estar

associado à hospitalização prolongada, necessidade de antimicrobianos mais caros e gastos indiretos com as medidas de controle da infecção (ROSSI et al., 2005).

Até então estritamente nosocomial, o MRSA tornou-se um dos patógenos mais importantes em infecções hospitalares, porém, nos últimos dez anos, infecções por esta bactéria resistente começam a aparecer também na comunidade. MRSA adquirido na comunidade (CA-MRSA) é um patógeno potencialmente emergente que vem apresentando frequência crescente de isolados. Embora as infecções por CA-MRSA sejam geralmente cutâneas, doenças invasivas como bacteremias, pneumonias e osteomielites já foram descritas (MAEDA et al., 2008; MENEGOTTO & PICOLI, 2007).

Diversos métodos têm sido utilizados para a detecção da resistência em *Staphylococcus aureus*. Nesse processo, os laboratórios de microbiologia assumem um papel de vital importância, pois deflagram a suspeita da resistência, fundamental para o controle. Métodos fenotípicos auxiliam na identificação de MRSA, pois essas cepas apresentam resistência à oxacilina com concentração inibitória mínima entre 1 a 34 µg/ml. O teste do disco de cefoxitina com concentração de 30 µg/ml, introduzido em 2004, fornece pontos de corte alternativos para a detecção de resistência em *Staphylococcus aureus* é fundamental como marcador e é utilizado como teste confirmatório desta resistência (COLLI et al 2009; ROSSI et al., 2005).

Tabela 3: Zona de diâmetro (halos de inibição) para *Staphylococcus aureus*

	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	Zona de Diâmetro (halos de inibição em mm)		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Oxacilina 1mcg	≥ 13	11 a 12	≤ 10
Cefoxitina 30mcg	≥ 20		≤ 19

Fonte: Tabela do CLSI- M100 S20 – Janeiro 2010

Os bacilos gram-negativos aeróbios clinicamente importantes podem ser artificialmente classificados em quatro grupos gerais: aeróbios facultativos e microaerófilos fermentadores, aeróbios não-fermentadores (*Pseudomonadaceae*), *Haemophilus* e gêneros relacionados e, bacilos incomuns ou fastidiosos. As *Pseudomonas* e os bacilos relacionados constituem uma mistura complexa de patógenos oportunistas de vegetais, animais e seres humanos. Apesar da existência de muitos gêneros, somente poucos são comumente isolados e de interesse, sendo 75%

representados por *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii* e *Moraxella catarrhalis* (MURRAY et al., 2006; STROHL et al, 2004; KONEMAN et al., 2008; MARTINS et al 2004; VENONESE et al, 2002; ZANON, 2007).

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo aeróbio gram-negativo não-fermentador de glicose, movidos por flagelos, pertencente a família *Pseudomonadaceae*. Sua epidemiologia reflete a predileção por um meio ambiente úmido, crescendo facilmente em vários nichos como solos, água, plantas e animais, e faz parte da microbiota normal dos seres humanos, podendo ser encontrada na pele, garganta e nas fezes de indivíduos sadios. *Pseudomonas aeruginosa* pode ser considerado um importante patógeno oportunista, uma vez que causa infecções crônicas nos pulmões de pacientes com a doença genética fibrose cística. A *Pseudomonas aeruginosa* têm recebido atenção pela frequência com que está relacionada a doenças em pacientes com comprometimento imunológico, acompanhado de procedimentos invasivos, queimaduras e feridas operatórias, que se tornam porta de entrada para esta espécie e, por está associada a uma ampla variedade de infecções como bacteremias; infecções do trato urinário; infecções do trato respiratório, e infecções de ouvido e oculares (ANDRADE et al., 2002; MARTINS et al., 2004; BRAGA et al, 2004; MATA et al., 2007; BRITO et al., 2000; ANDRADE et al., 2002; BOUKRAA, 2008; BIELECKI, 2008).

A *Pseudomonas aeruginosa* possui muitos fatores de virulência, incluindo componentes estruturais como polissacarídeos extracelulares, que podem impedir a fagocitose, prejudicando a difusão de antibióticos, além de toxinas e enzimas. A maioria das cepas também produz um ou mais pigmentos, sendo o mais comum a piocianina, que retarda o crescimento de outras bactérias, facilitando sua colonização. Outra de suas particularidades é resistência intrínseca a muitos antibióticos e a capacidade de sofrer mutação para cepas ainda mais resistentes durante o tratamento. Embora tenham sido identificados vários mecanismos e resistência, a mutação das proteínas porinas constitui o principal mecanismo de resistência. Devido às mutações e seleções naturais relacionadas ao uso excessivo de antibióticos, algumas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* tornaram-se capazes de produzir potentes beta-lactamases, enzimas que inativam e destroem antibióticos, como por exemplo, as penicilinas e cefalosporinas, incluindo os carbapenêmicos, convertendo-se em grande ameaça aos pacientes hospitalizados durante um curso terapêutico. O surgimento de cepas multirresistentes aos antimicrobianos em hospitais

indica que, tanto hoje como ontem, a *Pseudomonas aeruginosa* necessita de uma vigilância bacteriológica constante para que se possa detectar variações e padrões de suscetibilidade, já que seus clones resistentes permanecem por muitos anos no ambiente hospitalar devido à transferência de pacientes para pacientes e a elevada percentagem de mortalidade e morbidade, tornando-a um dos principais patógenos na luta contra as infecções nosocomiais (BRAGA et al, 2004; ANDRADE et al., 2002; MURRAY, 2006; MATA et al., 2007; MARQUES et al., 2007; BOUKRAA, 2008; BIELECKI et al., 2008).

No âmbito hospitalar, a *Pseudomonas aeruginosa* é um dos microorganismos mais importantes causadores de infecções nosocomiais, em particular, respiratórias e da ferida cirúrgica. Ela produz uma série de enzimas para auxiliar na invasão, causando deterioração dos tecidos no local da infecção. A *Pseudomonas aeruginosa* pode se desenvolver dentro do tecido da ferida e produzir níveis suficientes de toxinas elaboradas que anulam os fatores imunes do hospedeiro, particularmente fibrina e moléculas de colágeno, que são essenciais para a regeneração do tecido. Contudo, o controle das infecções causadas por este microorganismo é de grande importância na reparação tecidual e cicatrização de feridas (MULLAI et al., 2007).

3.8 RESISTÊNCIA BACTERIANA

Os fenômenos genéticos básicos – mutação gênica, replicação e recombinação – são semelhantes em todas as formas de vida, pois todos os organismos celulares apresentam um único tipo de molécula com material genético, o DNA. Uma característica clinicamente importante gerada dos estudos de genética microbiana é a capacidade de a bactéria transferir seus genes, especialmente aqueles relacionados à resistência a antibióticos, para outra espécie, relacionada ou não. A troca de DNA entre células permite o intercâmbio de genes e características entre essas células, produzindo assim novas cepas bacterianas. Essa transferência pode ser vantajosa para o receptor, permitindo o fluxo de genes de resistência a antibióticos de populações bacterianas não patogênicas para populações patogênicas, gerando conseqüências graves para a saúde pública (MURRAY et al, 2004; STROHL et al, 2004; VENONESE et al, 2002).

A resistência bacteriana ocorre devido a inúmeros mecanismos complexos e ainda não completamente entendidos. Algumas bactérias são capazes de evitar a rota metabólica inibida por sulfonamidas e trimetoprima. A inativação enzimática ocorre com quase todos os *Staphylococcus aureus*, os quais produzem beta-lactamases que degradam a penicilina, sendo atualmente o

microrganismo que apresenta maior capacidade de multirresistência (MULLIGAN, 1993). De forma similar, 90% dos isolados clínicos de *Moraxella catarrhalis*, patógeno responsável por infecções respiratórias comunitárias, produzem beta-lactamase, que degrada penicilina, amoxicilina, ampicilina e outros beta-lactâmicos. Os aminoglicosídeos e o cloranfenicol também são inativados por enzimas específicas. *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus* ssp. possuem capacidade de alterar o sítio de ação dos antibióticos. Este é o mecanismo responsável pela resistência a aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclinas e quinolonas. As bactérias podem tornar-se resistentes à ação dos antimicrobianos devido a alterações no transporte do antibiótico através da membrana bacteriana. Esse mecanismo é mais comum em bactérias gram negativas do que em bactérias gram-positivas, pois a principal barreira à difusão de antibióticos na célula bacteriana é a membrana externa, estrutura inexistente em organismos gram-positivos (NIJSTEN et al., 1993; BARROS et al., 2001).

A transferência resistência bacteriana pode ser efetivada por mecanismos diversos, podendo estabelecer-se entre microrganismos de uma mesma população ou de diferentes populações, como da microbiota animal para humana e vice-versa (NIJSTEN et al., 1993). Atualmente o microrganismo que apresenta maior capacidade de multirresistência é o *Staphylococcus aureus* (MULLIGAN, 1993). Os bastonetes gram-negativos multirresistentes produtores de β -lactamases do tipo amp-C e ESBL, representam um desafio emergente ao tratamento de infecções provocadas por elas, destacando-se a *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (SHAH et al., 2004; HAUSER; SRIRAM, 2005).

Entre as bactérias gram-negativas, em especial, a *Pseudomonas aeruginosa* é um organismo altamente adaptável. Ela pode crescer em uma ampla variedade de substratos e alterar as suas propriedades em resposta às mudanças no ambiente. Portanto, *Pseudomonas aeruginosa* possui uma capacidade adicional considerável em comparação com a genética outros microrganismos. Isso explica a sua natureza altamente adaptável, incluindo a capacidade de desenvolver resistência aos antibióticos que são usados extensivamente (LAMBERT, 2002).

O surgimento de resistência antimicrobiana em patógenos bacterianos, representa um problema muito sério, que ameaça por fim a era antibiótica. O desenvolvimento de resistência é um fenômeno biológico natural, que se seguiu à introdução de antimicrobianos na prática clínica, sendo acentuado pelo uso desmedido, constante e irracional desses agentes, interferindo no

tratamento efetivo das infecções (GOODMAN et al., 2007; GILMAN, 2007; BACCARO et al., 2002; LINHARES-RODRIGUES; MARTINEZ-MENDEZ, 2005; WAGENLEHNER, 2005).

De acordo com Lambert (2002), o uso extensivo de antibióticos para tratar infecções por *Pseudomonas aeruginosa* tem gerado uma pressão seletiva para incentivar o desenvolvimento de resistência. Em geral resistência se deve a uma combinação de fatores:

- É intrinsecamente resistente aos antimicrobianos devido à baixa permeabilidade de sua parede celular.
- Tem a capacidade genética para manifestar a um vasto repertório dos mecanismos de resistência.
- Pode tornar-se resistentes por mutações cromossômicas em genes que regulam genes de resistência.

Pode adquirir genes de resistência adicionais de outros organismos através de plasmídeos, transposons e bacteriófagos.

A emergência de resistência bacteriana entre os patógenos mais frequentemente isolados e o conseqüente impacto na morbidade, mortalidade e custos tem sido observada nos últimos anos e necessita medidas de atenção. A disseminação desenfreada da resistência a antibióticos exige uma conduta mais responsável diante do seu uso. O criterioso uso de antibióticos, o conhecimento de parâmetros de farmacodinâmica e farmacocinética dos antimicrobianos, os dados de vigilância regionais e o reconhecimento da sociedade em geral como risco para a aquisição de infecções com patógenos resistentes são extremamente importantes e constituem um permanente desafio na clínica médica atual (SANTOS, 2004; TAVARES, 1996; WANNMACHER, 2004).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAIS DO EXPERIMENTO

Os méis foram previamente analisados quanto às características físico-químicas e microbiológicas no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – UFERSA e a avaliação da atividade antimicrobiana dos méis foi realizada no Laboratório de Microbiologia do Centro de Análises Clínicas e Imunológicas de Mossoró – CACIM.

Foram analisadas doze amostras de méis de origens diferentes: mel de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) e mel de abelhas indígenas sem ferrão, jandaíra (*Melipona subnitida* L.), obtidos de colméias mantidas na região do Município de Serra do Mel, RN, Brasil, e da Estação Experimental da UFERSA, na comunidade de Alagoinha, Mossoró, RN, Brasil, onde hoje já está instalado o Centro Tecnológico de Apicultura (CETEC), provenientes de diferentes floradas.



Figura 1. Mapa político do Estado do Rio Grande do Norte localizando os Municípios de Mossoró e Serra do Mel

Fonte: www.brasil_natal.com.br

Foram utilizadas 12 amostras de cada tratamento, sendo classificadas da seguinte forma: mC = mel de *Apis mellifera* L. de cor Clara; mAC = mel de *Apis mellifera* L. de cor âmbar clara, mAE = mel de *Apis mellifera* L. de cor âmbar escuro e mJ = mel de *Melipona subnitida* L. (Mel de Jandaíra).

4.2 SELEÇÃO DO MEL

A caracterização dos méis provenientes das diferentes floradas foi importante como parte de uma estratégia de reconhecimento e para valorização do produto apícola, determinando sua identidade à região, além de agregar valores.

As análises microbiológicas e físico-químicas para caracterização dos méis foram realizadas no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal da UFERSA e, posteriormente, acondicionados em recipientes estéreis e armazenados ao abrigo da luz.



Figura 2. À esquerda: potes de mel de *Apis mellifera* L., ilustrando a variedade de cores, em razão das diferentes fontes florais que o originaram

Figura 3. À direita: potes de mel de *Meliponea subnitida* L.

4.2.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas foram realizadas seguindo a metodologia descrita nas normas internacionais a fim de avaliar tais condições pela presença ou ausência dos microorganismos coliformes totais (a 35°C) e termotolerantes (a 45°C), além de bolores e leveduras. Os resultados obtidos estão expressos nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1 – Contagem de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C dos méis de *Apis mellifera* L. e *Meliponea subnitida* L. utilizados no experimento.

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS (coliformes a 35° e coliformes a 45°C)												
Méis	mJ A	mJ B	mJ C	mC A	mC B	mC C	mAC A	mAC B	mAC C	mAE A	mAE B	mAE C
NMP/ml	9,4	< 3,0	6,2	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0	< 3,0

MJ=mel de jandaíra, MC=mel claro, MAC=mel âmbar claro, MAE=mel âmbar escuro

Resultados expressos em NMP/g ou ml.

Intervalo de confiança (95%)

Quadro 2 – Contagem de bolores e leveduras dos méis de *Apis mellifera* L. e *Meliponea subnitida* L. utilizados no experimento.

ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS (bolores e leveduras)												
Méis	mJ A	mJ B	mJ C	mC A	mC B	mC C	mAC A	mAC B	mAC C	mAE A	mAE B	mAE C
UFC/ml	$5,0 \times 10^3$	$6,0 \times 10^3$	$3,5 \times 10^4$	< 10	$1,2 \times 10^2$	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10

mJ=mel de jandaíra, mC=mel claro, mAC=mel âmbar claro, mAE=mel âmbar escuro
Resultados expressos em UFC/g ou ml.

4.2.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As características físico-químicas do mel foram utilizadas no sentido de fornecer dados importantes, contribuindo assim para uma melhor caracterização e conhecimento do produto, visando comparar os resultados obtidos com padrões citados por órgãos oficiais nacionais e internacionais, auxiliando também no controle e na garantia da qualidade.

As análises físico-químicas seguiram os métodos estabelecidos pela legislação brasileira, que se encontram descritos na Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000) e, apresentaram os resultados expressos, abaixo, no quadro 3.

Quadro 3 – Análises físico-químicas dos méis de *Apis mellifera* L. e *Meliponea subnitida* L. utilizados no experimento.

ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS												
Méis Parâmetros	mJ A	mJ B	mJ C	mC A	mC B	mC C	mAC A	mAC B	mAC C	mAE A	mAE B	mAE C
Cor (nm)	7	7	2	41	37	41	63	71	73	87	107	104
Densidade (kg L ⁻¹)	1,36	1,36	1,35	1,45	1,42	1,36	1,39	1,39	1,36	1,42	1,42	1,38
Umidade (%)	25,3	26,4	24,9	18,3	17,7	21,5	18,6	18,9	18,9	17,3	17,2	17,7
Cinzas(%)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,05	0,08	0,2	0,1	0,2	0,1	0,3	0,2
Ph	2,32	2,29	2,37	3,73	3,70	3,67	3,90	3,25	3,75	3,73	3,75	3,76
Acidez (meq.kg ⁻¹)	22,4	23,66	20,33	26,13	45,00	23,32	50,00	77,50	41,01	52,00	46,00	55,00
HMF (mg.kg ⁻¹)	16,7	15	17,63	16,32	17,96	8,23	17,36	13,69	17,06	9,13	7,33	11,40
Sól. Insol.	0,1	0,1	0,1	0,020	0,180	0,100	0,180	0,210	0,240	0,600	0,350	0,150
Açúcares R. (g/100g)	54,3	50,9	57,9	68,46	68,15	60,0	68,57	65,56	48,23	80,85	46,36	50,10
Sacarose (g/100g)	5,2	5,7	5,1	4,3	4,6	5,6	4,4	5,7	7,7	5,8	5,8	5,9
Condutiv. (mS cm ⁻¹)	165	143,3	171	464,5	377,4	211,5	452,8	509,3	460,0	418,2	465,0	448,0
Lund (ml)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,8	0,2	0,6	1,0	0,6	0,6	0,7	0,6
Lugol	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
Fiehe	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

mJ=mel de jandaíra, mC=mel claro, mAC=mel âmbar claro, mAE=mel âmbar escuro HMF=Hidroximetilfurfuraldeído, Neg=Negativo
Fonte: Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – UFERSA

4.3 ANTIBIÓTICOS

Foram utilizados discos de sensibilidade, da marca Difco® (sensidisc®) contendo os seguintes antibióticos, nas respectivas concentrações: oxacilina 1 µg (OXA), cefoxitina 30 µg (CFO), vancomicina 30 µg (VAN), ceftazidima 30 µg (CAZ), piperacilina+tazobactam 110 µg (PIT), ciprofloxacina 5 µg (CIP), aztreonam 30 µg (ATM), polimixina 5 µg (POL), sendo testados contra os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* (OXA, CFO e VAN) e *Pseudomonas aeruginosa* (CIP, POL, PIT, CAZ, ATM).

4.4 SELEÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Foram utilizadas seis amostras bacterianas, de origem humana obtidas a partir de culturas microbiológicas de material coletado de diversos sítios infecciosos, conforme o quadro 4, abaixo, sendo três amostras de *Staphylococcus aureus* Resistentes a Metilcilina (MRSA) e três amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, com diferentes características fenotípicas, contudo uma delas apresentando um perfil considerado de multirresistência.

Quadro 4 – Relação dos microorganismos e o sítio infeccioso

AMOSTRAS BACTERIANAS		
Nº da amostra	Microorganismo	Sítio Infeccioso
S1	MRSA	Ferida cirúrgica
S2	MRSA	Trato respiratório (nasal)
S3	MRSA	Ferida cirúrgica
P1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ferida cirúrgica
P2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Trato respiratório(pulmão)
P3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Trato urinário

Fonte: Centro de Análises Clínicas e Imunológicas de Mossoró – CACIM

4.4.1 SUBCULTIVO E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

As amostras de MRSA e *Pseudomonas aeruginosa* foram subcultivadas em caldo nutritivo (BHI - Brain Heart Infusion – Acumedia®), semeadas em Agar sangue de carneiro e Agar Mac Conkey – Acumedia®, respectivamente e, incubadas a 35 °C por 24 horas em estufa bacteriológica microcontrolada. Após este período foi feita a triagem das colônias de microrganismos utilizando os meios Agar Sal de Manitol – Acumedia®, para *Staphylococcus aureus* e Agar TSI (Tríplice de Ferro e Açúcar – Acumedia®), para *Pseudomonas aeruginosa*. As colônias foram isoladas e suspensas em solução salina estéril 0,9% (p/v) até obter-se uma

turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala de Mac Farland, medido em no aparelho *densimat* bioMerieux®.

Os meios de culturas utilizados nos experimentos foram produzidos no laboratório, seguindo rigorosamente a metodologia descrita pelo fornecedor. Porém, para determinar sua eficiência todos os lotes dos meios foram submetidos a controle de qualidade. Tanto o controle de esterilidade como o de desenvolvimento de microrganismos, utilizando as cepas padrões da American Type Culture Collection (ATCC) fornecidas pelo Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ), da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC).

Na perfuração dos poços nas placas de Agar de Mueller Hinton, foram utilizados pequenos cilindros, medindo 6mm de diâmetro. Após esse procedimento, as suspensões das amostras de microrganismos foram semeadas nas placas de Petri, previamente identificadas, utilizando swab estéril e, após um intervalo de 15 minutos, os poços foram preenchidos com 50µl de cada mel. Um poço contendo solução salina estéril a 0,9% (p/v) e placas contendo os discos com antibióticos comerciais para cada estirpe bacteriana testada, além das linhagens ATCC, foram utilizados para o controle do experimento. Foi mantida uma distância mínima de 40 mm entre os poços para evitar interferência entre os halos de inibição. As placas foram incubadas a 35° C em estufa de cultura, e após 24 horas, utilizando-se um paquímetro e um halômetro, realizou-se a leitura dos resultados, consistindo na medição do diâmetro dos halos de inibição, incluindo o próprio poço de 6 mm.



Figura 4 – Preparação dos poços nas placas de Agar de Mueller Hinton
Fonte: arquivo pessoal



Figura 5 – Inoculação do mel nos poços
Fonte: arquivo pessoal

4.5 ENSÁIOS DE ANTIBIOSE

A determinação do perfil de suscetibilidade dos microorganismos foi realizada empregando-se o método de difusão em Agar de Mueller Hinton, utilizando os antimicrobianos comerciais *Oxacilina*, *Cefoxitina*, e *Vancomicina* e, *Imipenem*, *Aztreonam*, *Ceftazidima*, *Polimixina*, *Piperacilina+tazobactam* e *Ciprofloxacina*, baseando-se na técnica descrita por Bauer et al, (1966), utilizando discos de papel. As linhagens ATCC 25953 de *Staphylococcus aureus* e a ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa* foram utilizadas como controle de referência em todos os experimentos realizados (CSLI, 2007).

4.5.1 – RESULTADOS DOS ENSAIOS DE ANTIBIOSE

Tabela 4 – Perfil de suscetibilidade da cepa ATCC 25953 (*Staphylococcus aureus*)

Cepa	Resistente	Sensível
ATCC 25953	AMP, PEN	AZI, ERI, CF, CPM, CFO, CRO, CIP, CLO, IPM, OXA, RIF, VAN, LZD, CLI.

AZI=Azitromicina, ERI=Eritromicina, CF=Cefalotina, CPM=Cefepime, CFO=Cefoxitina, CRO=Ceftriaxona, CIP=Ciprofloxacina, CLO=Cloranfenicol, IPM=Imipenem, OXA=Oxacilina, RIF=Rifampicina, VAN=Vancomicina, LZD=Linezolid e CLI=Clindamicina.

Tabela 5 – Perfil de suscetibilidade da cepa ATCC 27853 (*Pseudomonas aeruginosa*)

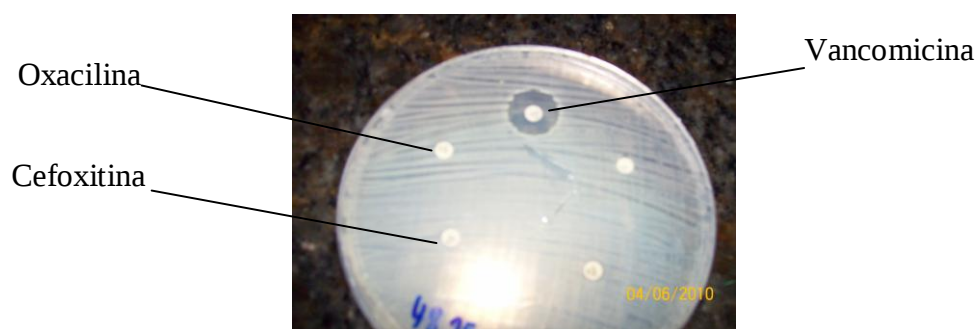
Cepa	Resistente	Sensível
ATCC 25953		PTZ, POL, ATM, CIP, LEV, AMI, GEN, TOB, CAZ, COM, IPM, MEM.

PTZ=Piperacilina+tazobactam, POL=Polimixina, ATM=Aztreonam, CIP=Ciprofloxacina, LEV=Levofloxacina, AMI=Amicacina, GEN=Gentamicina, TOB=Tobramicina, CAZ=Ceftazidima, CPM=Cefepime, IPM=Imipenem e MEM=Meropenem.

Tabela 6 – Resultados dos testes de controle com antibióticos comerciais

Microorganismo	Resistente	Sensível
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> P1	TAC, MEM, IPM, AMI, CAZ, CPM, CIP	ATM, PTZ, POL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> P2	CAZ, CPM, CIP	ATM, MEM, IPM, POL, PTZ, AMI TAC
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> P3	MEM, IPM, AMI, CAZ, CPM, CIP	ATM, POL, PTZ, TAC
MRSA – S1	OXA, CFO	VAN
MRSA – S2	OXA, CFO	VAN
MRSA – S3	OXA, CFO	VAN

Referência: Tabela do CLSI– M100 S20 – Janeiro 2010

Figura 6 – Caracterização fenotípica da *Pseudomonas aeruginosa* MRFigura 7 – Caracterização fenotípica do *Staphylococcus aureus* MRSA

Fonte: arquivo pessoal

4.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS MÉIS

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos méis foi empregada a técnica de *Pour plate* (KONEMAN et al, 2008), difusão em Agar de Mueller Hinton, utilizando pocinhos com 06mm de diâmetro. Vale salientar que os experimentos foram realizados em triplicata, para que a fidedignidade fosse mantida e evitar interferência ou manipulação dos resultados.

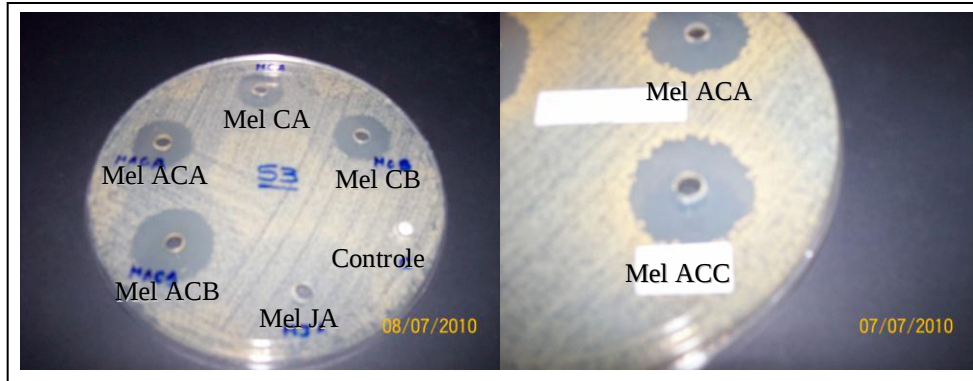


Figura 8 – Halos de inibição produzidos pelos méis sobre MRSA
 Legendas: Mel ACA: mel âmbar claro A; Mel ACB: mel âmbar claro B; Mel ACC: mel âmbar claro C;
 Mel CA: mel claro A; Mel CB: mel claro B; Mel JA: mel jandaíra A.
 Fonte: arquivo pessoal

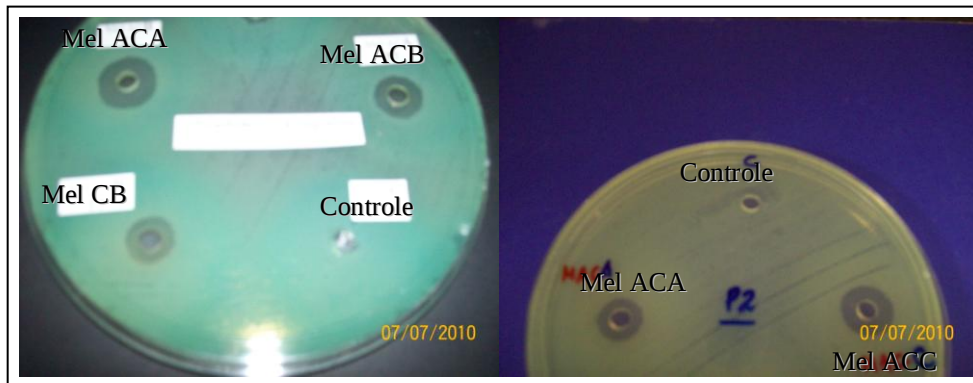


Figura 9 – Halos de inibição produzidos pelos méis sobre *Pseudomonas aeruginosa* MR
 Legendas: Mel ACA: mel âmbar claro A; Mel ACB: mel âmbar claro B; Mel CA; Mel CB: mel claro B.
 Fonte: arquivo pessoal

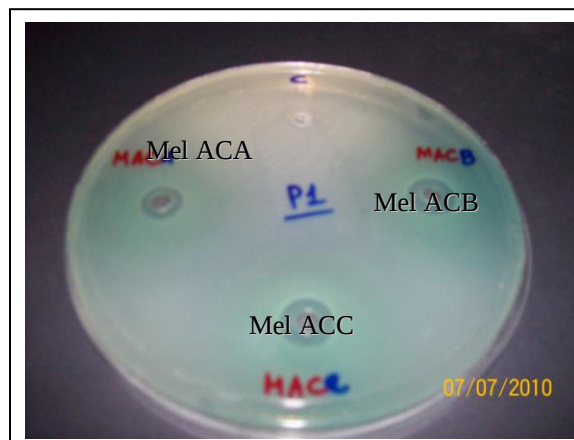


Figura 10 – Halos de inibição produzidos pelos méis sobre *Pseudomonas aeruginosa* MR
 Legendas: Mel ACA: mel âmbar claro A; Mel ACB: mel âmbar claro B; Mel ACC: mel âmbar claro C.
 Fonte: arquivo pessoal

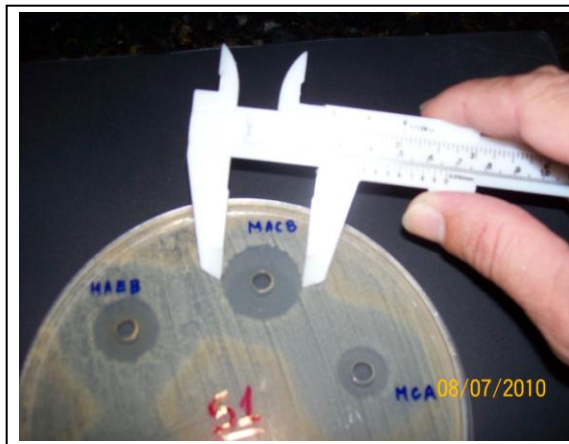


Figura 11 – Medição dos halos de inibição produzidos pelos méis sobre MRSA

Fonte: arquivo pessoal

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando análise de variância Two-Way ANOVA, para comparar a atividade antibacteriana entre os diferentes méis e entre os diferentes isolados de bactérias. O teste de Bonferroni para verificar quais grupos foram diferentes entre si. o nível de confiança adotado foi de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 LEITURA E MENSURAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos dos ensaios de antibiose com os méis de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) e abelhas indígenas sem ferrão, jandaíra (*Melipona subnitida* L.), seguem abaixo relatados.

Após a leitura dos halos de inibição, selecionaram-se algumas placas para documentação fotográfica, conforme figuras 7, 8, 9 e 10.

O quadro 05 apresenta os resultados de inibição dos méis frente às amostras bacterianas (MRSA e *Pseudomonas aeruginosa*) testadas, com formação de zonas de inibição de até 31 mm de diâmetro.

Quadro 05 – Análise comparativa da atividade antibacteriana, expressa pela medição dos halos de inibição (em mm), com relação ao tipo de mel e ao isolado bacteriano.

Isolado	mCA	mCB	mCC	mAC A	mAC B	mAC C	mAE A	mAE B	mAE C
MRSA 1	21,667±0,577 ^{aA}	22,000±1,000 ^{aA}	22,667±0,577 ^{aA}	29,667±0,577 ^{aB}	29,333±0,577 ^{aB}	30,333±0,577 ^{aB}	22,667±1,155 ^{aA}	23,000±1,000 ^{aA}	22,000±1,000 ^{aA}
MRSA 2	22,333±0,577 ^{aA}	22,667±0,577 ^{aA}	23,333±0,577 ^{aA}	30,333±0,577 ^{aB}	30,667±0,577 ^{aB}	30,333±0,577 ^{aB}	22,333±0,577 ^{aA}	21,333±1,155 ^{aA}	20,667±0,577 ^{aA}
MRSA 3	22,333±0,577 ^{aA}	22,667±0,577 ^{aA}	23,000±0,000 ^{aA}	29,333±0,577 ^{aB}	30,667±0,577 ^{aB}	30,333±0,577 ^{aB}	22,667±0,577 ^{aA}	22,333±0,577 ^{aA}	20,000±1,000 ^{aA}
P aeruginosa 1	12,333±0,577 ^{bA}	12,333±0,577 ^{bA}	12,000±0,000 ^{bA}	14,667±0,577 ^{bB}	16,333±0,577 ^{bB}	16,333±0,577 ^{bB}	13,667±0,577 ^{bA}	13,333±0,577 ^{bA}	12,667±0,577 ^{bA}
P aeruginosa 2	12,000±0,000 ^{bA}	11,667±0,577 ^{bA}	12,667±0,577 ^{bA}	15,667±0,577 ^{bB}	17,000±1,000 ^{bB}	17,667±0,577 ^{bB}	12,667±0,577 ^{bA}	13,333±0,577 ^{bA}	13,000±0,000 ^{bA}
P aeruginosa 3	11,333±0,577 ^{bA}	12,333±0,577 ^{bA}	11,667±0,577 ^{bA}	15,000±0,000 ^{bB}	18,333±0,577 ^{bB}	17,333±0,577 ^{bB}	13,667±0,577 ^{bA}	13,333±0,577 ^{bA}	12,667±0,577 ^{bA}

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna representam amostras estatisticamente diferentes (Bonferroni, $p < 0,05$); letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam amostras estatisticamente diferentes (Bonferroni, $p < 0,05$)

Legendas: mCA=mel claro A; mCB=mel claro B; mCC=mel claro C; mACA=mel âmbar claro A; mACB=mel âmbar claro B; mACC=mel âmbar claro C; mAEA=mel âmbar escuro A; mAEB=mel âmbar escuro B; mAEC=mel âmbar escuro C;

O presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* exercida pelo mel de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.) e abelhas indígenas sem ferrão (*Melipona subnitida* L.) sobre os microorganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes isolados de amostras provenientes de pacientes hospitalares. Sendo testados aleatoriamente somente na concentração de 100%.

Analisando os resultados obtidos nos experimentos realizados, podemos afirmar que as amostras de méis desenvolveram atividades antimicrobianas diferentes, variando com a sua cor, provavelmente pelo tratamento recebido pelas abelhas, ou seja, o local em que o mel foi produzido, sendo esse parâmetro o principal fator para sua caracterização. Foram utilizados méis de *Apis mellifera* L de cor clara (mC), âmbar claro (mAC) e mel âmbar escuro.

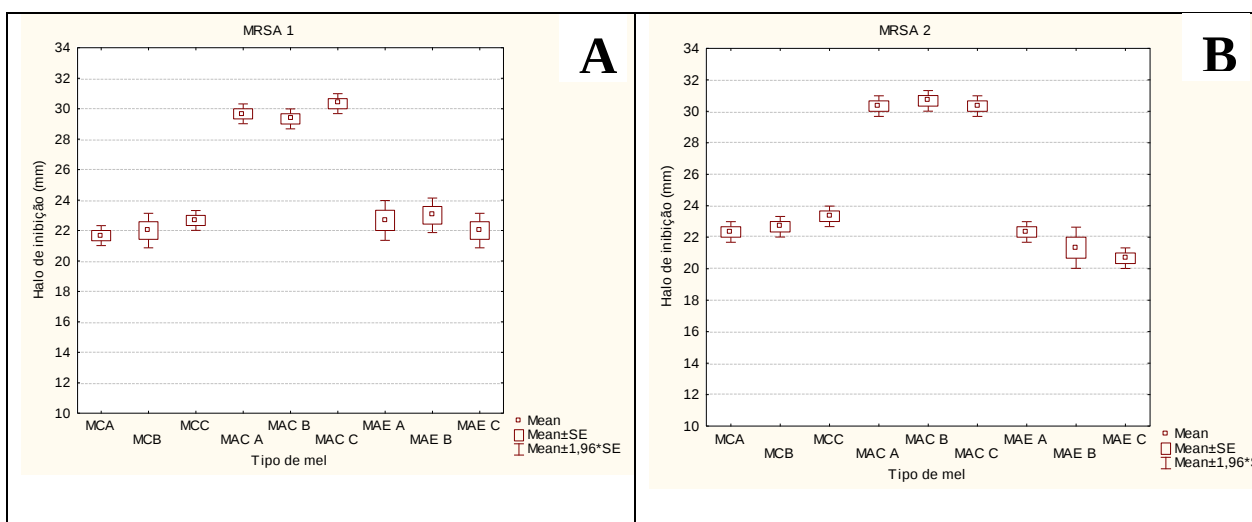
Entre os parâmetros físico-químicos analisados destacou-se o baixo pH, variando entre 3,25 a 3,90 e a elevada acidez, principalmente nos méis de cor âmbar, variando entre 41,01 meq/kg e 77,50 meq/kg para méis de *Apis mellifera* L.

Com relação à atividade antibacteriana evidenciada a partir da observação e medida das zonas de inibição dos méis sobre os microorganismos testados, os méis de cor âmbar claro apresentaram uma atividade bem maior em relação aos méis de cor clara e âmbar escuro, chegando a medir até 31mm de diâmetro, apresentando um elevado grau de inibição contra os isolados de MRSA.

As bactérias gram positivas (*Staphylococcus aureus*) foram as mais susceptíveis aos méis de *Apis mellifera* L.. Segundo Olaitan (2007), essa inibição evidenciada, pode ser devido a acidez

do mel puro, a qual constitui um fator importante na ação antimicrobiana do peróxido de hidrogênio, que é produzido enzimaticamente no mel, sobre os microrganismos.

Em um trabalho semelhante, utilizando a metodologia de difusão em agar, Basualdo et al (2007), inoculando 50µl de mel em poços de 4 mm, constatou que todas as amostras de mel puro produziram uma inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*. Alguns tipos de méis tiveram sua atividade antimicrobiana diminuída quando diluídas a 50%, apresentando um diâmetro médio da zona de inibição de 7,3 mm. Quando testado puro, outras amostras apresentaram uma maior zona inibição, chegando a 22 mm de diâmetro. Nenhuma inibição do crescimento bacteriano foi evidenciada quando o mel foi diluído em 30 ou 10%. Com relação a atividade dos méis sobre a *Pseudomonas aeruginosa*, o mesmo estudo constatou uma baixa atividade, inibindo apenas 03 de 15 amostras (20%). Portanto, os resultados apresentados pelas amostras de mel em relação ao *Staphylococcus aureus* podem ser importantes, dado que nas últimas décadas tem havido um considerável aumento nas dificuldades de tratar infecções de pele e tecidos subjacentes associados a esse microorganismo.



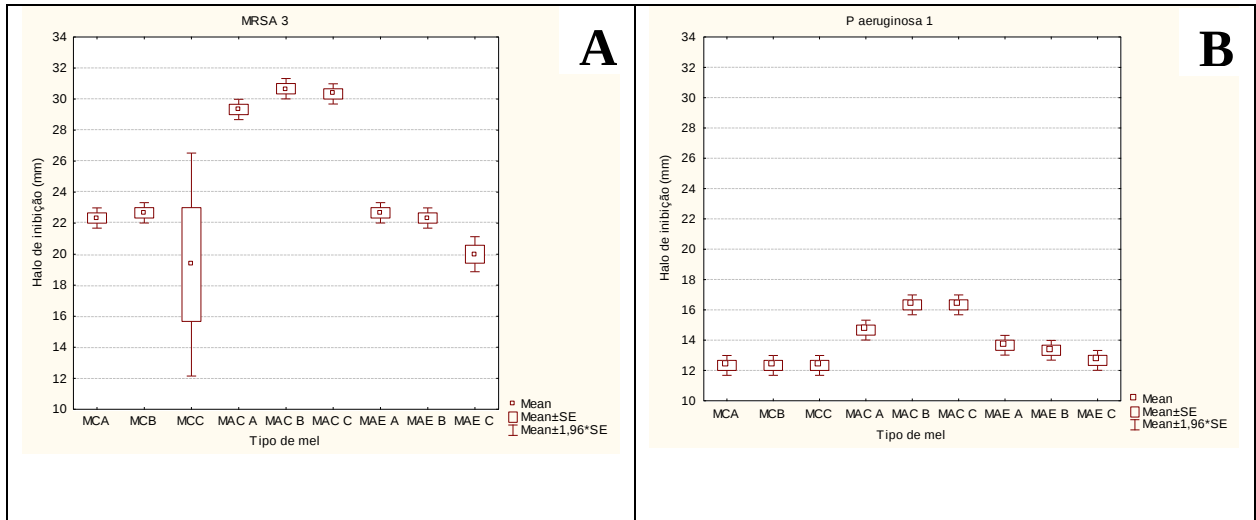


Figura 13A – Demonstração gráfica da inibição do crescimento bacteriano por méis de *Apis mellifera* L. frente isolados de **MRSA3 – S3**.(halos de inibição em mm).

Figura 13B – Demonstração gráfica da inibição do crescimento bacteriano por méis de *Apis mellifera* L. frente isolados de **Pseudomonas aeruginosa1 – P1**.(halos de inibição em mm).

Legendas:mCA=mel claro A; mCB=mel claro B;mCC=mel claro C: mACA=mel âmbar claro A; mACB=mel âmbar claro B; mACC=mel âmbar claro C; mAEA=mel âmbar escuro A; mAEB=mel âmbar escuro B; mAEC=mel âmbar escuro C;

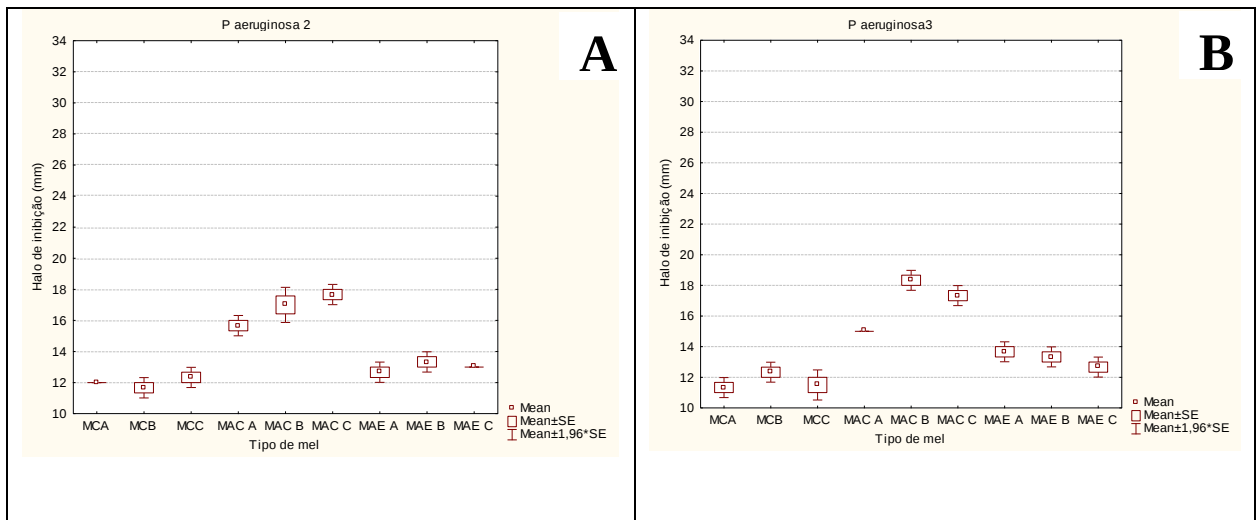


Figura 14A – Demonstração gráfica da inibição do crescimento bacteriano por méis de *Apis mellifera* L. frente isolados de **Pseudomonas aeruginosa2 – P2**.(halos de inibição em mm).

Figura 14B – Demonstração gráfica da inibição do crescimento bacteriano por méis de *Apis mellifera* L. frente isolados de **Pseudomonas aeruginosa3 – P3**.(halos de inibição em mm).

Legendas:mCA=mel claro A; mCB=mel claro B;mCC=mel claro C: mACA=mel âmbar claro A; mACB=mel âmbar claro B; mACC=mel âmbar claro C; mAEA=mel âmbar escuro A; mAEB=mel âmbar escuro B; mAEC=mel âmbar escuro C;

Na avaliação da atividade antibacteriana dos méis de *Apis mellifera* L sobre *Pseudomonas aeruginosa*, constatou-se que os de cor âmbar, principalmente os méis âmbar claro, apresentaram um grau de inibição satisfatório, o halo chegando a medir 19 mm de diâmetro, demonstrando um menor grau de inibição em relação aos resultados obtidos com o *Staphylococcus aureus*.

Nas figuras 07 e 10 pode-se constatar que em isolados de MRSA os méis de *Apis mellifera* L. mostrou-se mais eficaz do que em *Pseudomonas aeruginosa*.

Malika et al (2004) estudando a atividade antimicrobiana de quatro tipos de méis, através do método de difusão em agar de Mueller Hinton, utilizando pocinhos de 4 mm de diâmetro e 04 mm de profundidade, inoculou 100µl das diferentes concentrações de 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 de cada amostra nos poços. Verificou, após a incubação das placas por 24 horas e medida do diâmetro dos halos de inibição, que os méis de diferentes floradas utilizados apresentaram boa atividade antimicrobiana sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* nas diluições de 1:2 e 1:4, e *Pseudomonas aeruginosa* na concentração de 1:2.

Ao contrário dos méis de *Apis mellifera* L foi observado uma ausência de inibição sobre os microrganismos testados com o mel de *Melipona subnitida* L, tanto *Staphylococcus aureus*-MRSA quanto *Pseudomonas aeruginosa*, mesmo com concentração de 100%. Tal fato foi evidenciado durante o experimento com as análises microbiológicas dos méis de jandaíra, pois, os dados confrontados nos Quadros 1 e 2 demonstram a presença de bactérias do grupo coliformes e leveduras nas amostras analisadas, comprovando assim, sua ineficácia em relação a atividade antimicrobiana.

Segundo Al-Waili (2004), isso se deve ao fato de que moléculas de açúcar existentes no mel se ligam às moléculas de água para que bactérias tenham água suficiente para sobreviver, diminuindo ou anulando a ação antibacteriana, além do baixo pH e acidez.

Fontes da literatura indicam consideravelmente que a atividade antibacteriana de mel depende da fonte floral; conseqüentemente, o mel pode ser distinguido pela sua composição vegetal predominante. É interessante notar que as cores das amostras dos méis foram diferentes. Isto sugere que a fonte floral do mel pode ser menos importante para a sua atividade antibacteriana e, por conseguinte, o mais provável é que a os produtos originados do metabolismo das abelhas, definem as propriedades antimicrobianas do mel. Possíveis desvios na identificação

da fonte floral das amostras dos méis também devem ser considerados (BALTRUAITYTE, 2007).

Neste caso, além da produção de H_2O_2 pelas abelhas, e acidez do mel, as diferenças estruturais entre bactérias gram positivas e bactérias gram negativas, como composição da membrana e parede celular bacteriana, também podem está relacionadas com a atividade antimicrobiana exercida pelos méis de abelhas *Apis mellifera* L. e *Melipona subnitida* L.

A atividade antimicrobiana do mel sugere que este artifício faz parte da defesa das abelhas contra microorganismos. Nos resultados alcançados neste estudo, como também em informações obtidas da literatura, a atuação química e biológica dos méis de abelhas, não pode apontar uma substância individualmente, pois diferentes combinações de substâncias podem ser fundamentais à atividade antibacteriana. Contudo, a maioria dos resultados impetrados é muito animadora, pois podemos empregar o mel de *Apis mellifera* L. na prevenção ou tratamento de infecções causadas por alguns microorganismos tanto em humanos como em animais, apesar dos grandes obstáculos que teremos de enfrentar para que se possa atingir este objetivo.

6. CONCLUSÃO

Após a análise dos resultados obtidos no presente trabalho, foi possível concluir que os méis de *Apis mellifera* L. provenientes dos diferentes tratamentos, evidenciados pela cor do mel, possuem uma variabilidade na sua atividade antimicrobiana.

Os méis de *Apis* utilizados no presente estudo apresentaram uma notada atividade antimicrobiana contra os microorganismos que foram testados, principalmente sobre o MRSA e, uma atividade inibitória mais reduzida para *Pseudomonas aeruginosa*. Porém, para os méis de *Melipona subnitida* L. não se observou nenhuma atividade antimicrobiana para as bactérias testadas. (Os isolados de MRSA, incluídos nesse estudo, foram inibidos em 100 % dos méis de *Apis mellifera* L.) Essa espécie têm se mostrado sensível em diferentes concentrações, para alguns desses méis, principalmente os méis de cor âmbar claro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTERHUM, Flávio. **Mecanismo de Ação dos Antimicrobianos e Mecanismos de Resistência**. Microbiologia. 2^a ed., editora Atheneu - São Paulo. p. 79-84, 2004.
- AL-WAILI, NOORI S. **Investigating the Antimicrobial Activity of Natural Honey and Its Effects on the Pathogenic Bacterial Infections of Surgical Wounds and Conjunctiva**. *J Med Food* 7 (2) 2004, 210–222.
- ALVES, R. M. O. et al., **Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona mandacaia* smith (hymenoptera: apidae)**. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 25(4): 644-650, out.-dez. 2005
- ALVES, D. F. S. et al. **Efeitos da aplicação tópica do mel de *Melipona subnitida***. Revista Col. Bras. Cir. V.35, n.3, mai./jun., 2008.
- ANDRADE E, NAVARRO P, RODRIGUÉZ J et.al. **Evaluación bacteriológica de infecciones por *Pseudomonas aeruginosa***. *Antibiot. infecc* 2002.10 (1): 29-32.
- APICULTURA. Instituto Centro de Ensino tecnológico. 2.ed. Fortaleza: Edição Demócrito Rocha; Ministério da Ciência e Tecnologia, 56 p.11., 2004.
- BASUALDO, C. ; SGROY, VERONICA; FINOLA, MONICA S. ; MARIOLI, JUAN M.. **Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds**. Elsevier.Veterinary Microbiology, 124 (2007) 375–381.
- BARROS, E. et al **Antimicrobianos: consulta rápida**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed Editora. 2001. 428 p.
- BALTRUAIKYTE,V.; VENSKUTONIS, P. R.; ^EKSTERYTE, V. **Antibacterial activity of honey and beebread of different origin against *S. aureus* and *S. epidermidis***. *Biotechnol.* 45 (2) 201-208 (2007).
- BASSON, N.J. and GLOBER, S.R. **Antimicrobial activity of two South African honeys produced from indigenous *Leucospermum cordifolium* and *Erica* species on selected microorganisms**. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2008, 8:41
- BIELECKI, P.; GLIK, J.; KAWECKI, M. **Towards understanding *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infections by profiling gene expression**. *Biotechnol Lett* (2008) 30: 777-790.
- BRASIL. Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento. Instrução Normativa 11, de 20 de outubro de 2000. **Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel**. Disponível na Internet http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/anexo_intrnorm11.htm.
- BOUKRAA, LAÏD. **Additive Activity of Royal Jelly and Honey Against *Pseudomonas aeruginosa***. *Alternative Medicine Review*. Volume 13, Number 4, 2008.

BRITO, N.M.B. et al. **Efeitos do óleo de copaíba na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos.** Revista Paraense de medicina, Belém, v.15. n.1, p 2832, 2001.

BRITO A, Landaeta J, Roldán Y et al. **Resistencia da Pseudomonas aeruginosa a la gentamicina, tobramicina amikacina em Venezuela.** Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiologia. 2000. 20 (1):42-45.

BRAGA, KELLY A.M. et al., **Microorganismos mais freqüentes em unidades de terapia intensiva.** Revista Médica Hospitalar Ana Costa. 9(4) Out/Dez 2004.

BENDINI, J N. & SOUZA, D. C. **Caracterização físico-química do mel de abelhas proveniente da florada do cajueiro.** Ciência Rural, Santa Maria, v.38, n.2, mar-abr, 2008.

CASTRO, A. U., NETO, N.M.A., VIANA, J. A.. **Uso tópico do mel de abelha, oxitetraciclina e hidro cortisona, na reparação de feridas cutâneas, por segunda intenção, em coelhos.** Revista Ceres. v.56(1): 038-044, jan./fev. 2009

CAMARGO, R.C.R.; LOPES, M.T.R.; PEREIRA, F.M.; VILELA, S.L.O. **Produção de Mel.** Net. Piauí: julho de 2003.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards. 2010. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twentieth Informational Supplement.** Reproduced with permission, from CLSI publication M100-S20. Vol. 30, No. 1, January, 2010.

COLLI, V.C., PIZZOLITO, A.C., RADDI, M.S.G. **Determinação da resistência de Stahylococcus aureus: um desafio?** Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl. 2009; 30(1): 9-102.

COOPER, R.A.; MOLAN, P.C.; HARDING, K.G. **Antibacterial activity of honey against strains of Staphylococcus aureus from infected wounds.** J R Soc Med 1999; 92: 283-285.

COS, P.J., V. Arnold, V.B. Dirk and M. Louis. **Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger In vitro proof-of-concept.** J. Ethnopharmacology, 106(3): 290-302. 2006.

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

GHORI, IFRA AND AHMAD, SHEIKH SAEED. **Antibacterial activities of honey, Sandal oil and black papper.** Pak. J. Bot., 41(1): 461-466, 2009.

GONÇALVES, A. I., FILHO, A. A., MENEZES, H.. **Atividade antimicrobiana da abelha nativa sem ferrão Nannotrogonia testaceicornis (Hymenoptera: Apidae, Meliponini).** Arq. Inst. Biol. São Paulo. V.72, n.4, p.455-459, out./dez., 2005.

GOODMAN, Louis Sanford & GILMAN, Alfred: **Princípios Gerais de Terapia Antimicrobiana**. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 11^a ed. Mc Graww Hill - Rio de Janeiro, 2007.

HARDY, K.J., HAWKEY F.G., OPPENHEIM B.A. **Methicilin resistance Staphylococcus aureus in the critically ill;** *British Jornal of Anaesthesia*. v.92: p.121-130, 2004.

JOHNSON, W.D. et al. **Randomized, controlled trial of topical exit-site application of honey (medihoney) versus mupirocin for the prevention of catheter-associated infecctions in hemodialysis patients.** *J Am Soc Nephrol* 16: 1456-1462, 2005.

KAČÁNIOVÁ, MIROSLAVA M., MELICH, VLADIMÍRA KŇAZOVICKÁ, SOŇA FELŠÖCIOVÁ, JANKA SUDZINOVÁ. **The antimicrobial activity of honey and propolis against yeasts *Candida* species.** *Lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologii*, vol.42 (2) (2009), Timișoara.

KEER, W.E.; CARVALHO, G.A.; NASCIMENTO, V.A. **Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação.** Belo Horizonte: Acangaú, 1996. 144p.

KONEMAN, Elmer W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER; WINN, W. C. **Diagóstico Microbiológico-texto e atlas colorido.** 6^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2008.

KWAKMAN, PAULUS H. S. et al., **Medical-Grade Honey Kills Antibiotic-Resistant Bacteria In Vitro and Eradicates Skin Colonization.** *Bactericidal Activity of Medical Honey • CID* 2008;46 (1 June).

LAMBERT, P.A., **Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*.** *J R Soc Med* 2002;95 (Suppl. 41):22–26

LERRER, B. et al. **Honey and royal jelly, like human milk, abrogate levitin-dependent infection-preceding *Pseudomonas aeruginosa* adhesion.** *The ISME Journal* (2007) 1, 149-155.

LEE, HYUNGJAE; CHUREY, JOHN J.; WOROBO, RANDY W. **Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey.** *International Journal of Food Microbiology* (2008)

LOHNER , K.; STAUDEGGER, E. **Are we on the threshold of the post-antibiotic era?. In .Development of novel antimicrobial agents: Emerging strategies.** Lohner, K. (ed), Horizon Scientific Press, England, pp 1-15, 2001.

LOGERCIO, A.P.; BATTISTIN, A.; **Atividade antibacteriana de extrato hidroalcoólico de folhas de jambolão.** *Ciência Rural*, Santa Maria, v.35, n.2, p371-376 - 2005.

LURLINA, MIRIAM O. and FRITZ, ROSALIA. **Characterization of microorganisms in Argentinean honeys from different sources.** International Journal of Food Microbiology 105 (2005) 297– 304.

MAEDA, YASUNORI et al. **Antibacterial activity of honey against community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA).** Complementary therapies in clinical practice (2008) 14, 77-82.

MARTINS ST , Moreira M, Furtado GHC et al. **Application of control measures for infections caused by multi-resistant gram-negative bacteria in intensive care unit patients.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2004.99(3):331-334.

MARTINS, M.L.; BASTOS, E.M.A.F.; MATOS, J.H.G.; SILVA, G.C.; **Atividade antibacteriana em méis (*Apis mellifera*) e nativa (*Melípona scutellaris*, *Melípona subnitida*, *Scaptotrigona bipunctata*) do estado do Ceará.** Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v.11, n.5, 1997.

MARQUES, P.B. et al. **Perfil de suscetibilidade à antibióticos de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas no centro de diagnóstico da Unimed Belém-Pará.** RBAC, vol.39(3):175-177, 2007.

MATOS, F. J. A. **Plantas da Medicina Popular do Nordeste: propriedades e atribuídas e confirmadas.** Fortaleza: EUFC, 1999.

MALIKA, N.; MOHAMED, F.; MALIKA, A. C. **Antimicrobial of natural honey from aromatic and medicinal plants on antibiotic-resistant strains of bacteria.** Int. J. Agri. Biol., vol. 6, No. 2, 2004.

MATA, P.T.G., ABEGG, M.A. **Descrição de caso de resistência a antibióticos por *Pseudomonas aeruginosa*.** Arq. Mudi.2007; 11(2): 20-25.

MENEGOTTO, F. R. & PICOLI, S. U. ***Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa de descolonização em hospital.** RBAC, vol.39(2): 147 – 150, 2007.

MILFONT, M. de O. et al. **Produção de mel por abelhas africanizadas em plantio de mamoneira.** Ciência Rural, Santa Maria, v.39, n.04, p.1206-1211. Jul.2009.

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. The nature of the antibacterial activity.** Bee World, 73(1): p.5-28, 1992.

MUILI, E.M., MAINGI, .M., MACHARIA, J., **Antimicrobial Properties of Propolis and Honey from the Kenyan Stingless bee, *Dactylurina Schimidti*.** Apiacta, 43, 49-61, 2008

MULLAI, VENKATACHALAM and MENON, THANGAM. **Bactericidal Activity of Different Types of Honey Against Clinical and Environmental Isolates of *Pseudomonas aeruginosa***. The journal of alternative and complementary medicine. Volume 13, Number 4, 2007, pp. 439–441

MURRAY, Patrick R., et all. **Genética Bacteriana**. Microbiologia Médica. 5ª ed.,- Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

MURRAY, Patrick R., et all. **Staphylococcus e Microorganismos Relacionados**. Microbiologia Médica. 5ª ed.,- Rio de Janeiro: Elsevier. p.215 - 230, 2006.

MURRAY, Patrick R., et all. **Pseudomonas e Microorganismos Relacionados**. Microbiologia Médica. 5ª ed., - Rio de Janeiro: Elsevier. p.349 - 357, 2006.

MURRAY, Patrick R., et all. **Enterobacteriaceae**. Microbiologia Médica. 5ª ed.,- Rio de Janeiro: Elsevier. p.315 - 330, 2006.

NCCLS - National Committte for Clinical Laboratory Standards. 2003. ***Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests***. Aproved standard M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão** – São Paulo: Nogueirapis, 1997. 446p.

OLAITAN, PETER B., ADELEKE, OLUFEMI E., OLA, IYABO O. **Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes**. African Health Sciences Vol 7 No 3 September 2007.

OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. São Paulo: Atheneu, 1992.

PEREIRA, E. A., QUEIROZ, A. J. de M., FIGUEIREDO, R. M. Comportamento reológico de mel de abelha urucu. Revista Ciências Exatas e Naturais. v.5, n.2, jul./dez. 2003.

PEREIRA, Maurício Gomes. **Doenças Infecciosas**. Epidemiologia, teoria e prática. Guanabara Koogan, 7ª ed. - Rio de Janeiro. p.419-448, 2003.

PEREZ L. H., et al. **Exportações brasileiras de mel natural no período 2001-2003**. Informações Econômicas. V.34, n.6, p.28-37, 2004.

PÉREZ, D. **Resistência bacteriana a antimicrobianos: su importância em la toma de decisiones em la práctica diária**. Información Terapêutica del Sistema Nacional de Salud. Vol 22, Nº 3 – 1998.

RACOWSKI Ilana et al. **Ação antimicrobiana do mel em leite fermentado**. Revista Analytica. Nº30, Agosto/Setembro 2007.

ROSSI F., ANDREAZZI, D. **Resistência bacteriana: Interpretando o antibiograma**. Editora Ateneu, São Paulo, 2005.

RYBAK-CHMIELEWSKA H. Honey. In: TOMASIK, P. (Ed) **Chemical and functional properties of food saccharides**. Boca Raton: CRC Pres, 2004, 440p.

SANTOS, B.A. **As infecções respiratórias em crianças e a resistência bacteriana: um desafio para o pediatra**. Revista da AMRIGS, Vol. 48, Nº 2: 73 - 152 / Abril - Junho 2004

SILVA, R. A. et al. **Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha**. Alim. Nutri., Araracuara. v.17, n.1, p.113-120, jan./mar. 2006.

SILVA, C. L.; QUEIROZ, A. J. de M., FIGUEIREDO, R. M. **Caracterização físico-químicas de méis produzidos no estado do Piauí para diferentes floradas**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.8. n.2/3, p260-265, 2004.

SOUSA, R. S., MELLO, J. G. C. **Pesquisa de sujidades e matérias estranhas em mel de abelhas (*Apis mellifera* L.)**. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 28(1): 32-33, jan.-mar. 2008.

SOUZA, B. A. et al. **Avaliação microbiológica de amostras de mel de trigoníneos (Apidae: Trigonini) do Estado da Bahia**. Ciênc. Tecnol., Campinas, 29(4): 798-802, out.-dez. 2009.

STROHL, W. A. et al. **Genética Bacteriana**. Microbiologia Ilustrada - Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 2a. ed. São Paulo: Atheneu; 1996.

VERONESE, Ricardo; FOCACCIA, Roberto, et al. **Tratado de Infectologia**. - São Paulo: Ed. Atheneu, 2002.

WANNMACHER, L. **Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida?** Brasília, 2004. v.1,n.4. (Boletim de Saúde, 4).

WESTON, R. J.; BROCKLEBANK, K. L.; LU, Y. **Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys**. Food Chemistry (70): p.427-35, 2000.

ZANON, Uriel & MARANGONI, Denise Vantil. **Complicações Infeciosas Hospitalares**. Doenças Infeciosas: Conduta Diagnóstica e Terapêutica. 2ª ed. Guanabara Koogan - Rio de Janeiro, p.96-110, 2007.

ZUMLA, A. & LULAT, A. **Honey – a remedy rediscovered**. Journal of the Royal Society of Medicine, v.82, p. 384-385, 1989.