



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



EDNA DÓRIA PERALTA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E COMPOSIÇÃO
QUÍMICA DE MÉIS DO ESTADO DA BAHIA**

Feira de Santana, BA

2010

EDNA DÓRIA PERALTA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E COMPOSIÇÃO
QUÍMICA DE MÉIS DO ESTADO DA BAHIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Angélica Maria Lucchese

Feira de Santana, BA

2010

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

P482a Peralta, Edna Dória
Atividade antimicrobiana e composição química de méis do Estado da Bahia/ Edna Dória Peralta. – Feira de Santana, 2010.
265f. : il.

Orientador: Angélica Maria Lucchese

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana, 2010.

1.Mel – Atividade antimicrobiana – Bahia. 2.Mel – Composição química I.Lucchese, Angélica Maria. II. Universidade Estadual de Feira de Santana. III. Título.

CDU: 638.167:615.324

A Violeta Victoria e Gabriela, motivos maiores da minha aventura, e a Jaime Arturo meu cúmplice e companheiro de estrada, dedico.

AGRADECIMENTOS

As palavras se tornam pouco expressivas para agradecer a todos e a cada um dos que me acompanharam. Na verdade foram tempos árduos, porém ricos de experiências marcantes e proveitosas, onde cada um teve o seu papel.

Por isso, deixo aqui registrado o meu agradecimento, de modo especial:

A Deus, por tudo.

À minha família, que sempre me incentivou. A meu esposo Jaime, e às minhas princesas Violeta e Gabriela pela compreensão, afeto, e por estarem ao meu lado (eu sei). Aos meus pais Corina Santana Dória e Josino da Costa Dória “In memoriam”, pela lição de vida que deixaram, pelos exemplos de perseverança, responsabilidade, honestidade e justiça; aos meus irmãos, muito especialmente a Hildete, Ana Cláudia, Ivonete e meu sobrinho Marcos, pelo companheirismo, união e carinho recebidos. Valeu mesmo!

À Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), pela oportunidade.

À Dr.^a Angélica Maria Lucchese (a Prof.^a), pela amizade, apoio e sobretudo pela orientação segura, imprescindível para a realização desse trabalho. Obrigada pela confiança ao aceitar a tarefa, pela paciência e por sua luz.

À Prof.^a Dr.^a Ana Paula Uetanabaro, co-orientadora, pelo apoio nos testes microbiológicos, pelas amostras, momentos de descontração e carinho. Ana, saber que você “estava aí” era como um bálsamo...

Ao Prof.^o Dr. Francisco de Assis Ribeiro dos Santos, co-orientador, pelas amostras de mel, e pela atenção de sempre. Francis, você foi muito importante.

Aos professores: Dr.^a Carla Cardeal, Dr.^a Susana Modesto, doutorando Alexandre Espeleta, Drs. Tereza, Heyddi e Ricardo, pelas conversas tão proveitosas e amigáveis. Obrigada pela atenção.

À mestranda Manuela Dória, “minha quase filha”, graduada em Ciências Farmacêuticas e que em seu projeto de Monografia também fez estudo da atividade antimicrobiana de méis de abelhas sem ferrão. Pela ajuda, discussões, posters, resumos, troca de informações e experiências e pelas caminhadas ao LAPEM (Deus! Quanto sol...), agradeço e desejo-lhe muito sucesso.

À companheira de Pós, doutoranda Fátima Albinati e seu esposo Dr. Ricardo Albinati amigos de infância desde 2002... Deixo-lhes aqui um agradecimento especial pelo apoio generoso de sempre e pela torcida. Amo vocês!

Ao PPGBiotech, especialmente ao secretário Helton, por sua competência e receptividade. Helton, você foi simplesmente providencial!

À Prof.^a Dr.^a Favizia Freitas de Oliveira, do Depto. de Biologia (UEFS) que identificou alguns exemplares de abelhas.

Ao Dr. Paulino Oliveira do LABIO, pelas amostras de mel, análises polínicas e companhia no Congresso de 2005. Eram meus primeiros passos...

Ao Dr. José Alfredo de Carvalho (UFRB), pelas amostras de mel de abelhas nativas e à doutoranda Cerilene Santiago Machado pelas gestões na aquisição de amostras.

Aos amigos do Lafiqui (DTEC), pela torcida e apoio logístico oferecido.

Ao vice-reitor, Prof.^o Washington Moura, pelas “boas vibrações”, ao Prof.^o Carlos Correa pelas palavras de incentivo, e ao Prof.^o Aroldo Benatti (Diretor - DEXA) pelo apoio providencial.

Ao pessoal do LAPRON (Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos) e do LAPEM (Laboratório de Pesquisas em Microbiologia), muito especialmente a Carla Ribeiro (Carlinha, você foi 10!), a Alice (“fera” no MIC), a Susana, Jacque Miranda, Isabella, Clarissa e Goreth, pelo companheirismo e auxílio constantes. Meninas, vocês foram imbatíveis, e eu uma privilegiada; aos colegas Cléber e Getúlio pela disponibilidade irretocável, e a João Vasconcelos Neto, “meu fotógrafo favorito”, pela disponibilidade em registrar nosso trabalho.

Pela amizade de sempre, a Gi, Indira, Catinha (só faltou o vinho...), Rodrigo, Manoelito, Cristiana, Wagner, Carlos e Carlos Eduardo, entre outros companheiros tão importantes...

A Josie “Morena” e seu noivo João Anísio, pelo companheirismo e pelas amostras da 2.^a fase; a Josie “Loira”, pelas eternas águas milliQ, tão essenciais e tão longínquas, e ao Alex Miranda, por “acertar a mão no HPLC”. Vocês foram imprescindíveis.

Ao Prof.^o Luciano Vaz, ao Drs. Cássio van den Berg (UEFS) e Carlos Ledo (EMBRAPA), pela inestimável ajuda com a análise estatística.

Aos Drs. Sandra Assis, Antônio Azeredo, Hugo e Carla Branco do Depto. de Farmácia por disponibilizarem o cromatógrafo líquido com foto diodo.

Aos colegas do LABEXA, pelo apoio e descontração nos lapsos de ócio.

Ao Prof.^o Esequias Freitas (DLET) pela foto tão generosamente cedida.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente me ajudaram de alguma forma a construir esse sonho.

Obrigada mesmo!

“A felicidade é uma escolha que às vezes requer esforço”.
Anônimo.

“No porto de antes, apreensivo, eu tentava imaginar as dificuldades e lutas futuras. No de agora, dono do tempo que eu conquistara, simplesmente admirava o que estava ao redor e desfrutava do que estava feito. Não era a sensação de uma batalha ganha, de uma luta em que os obstáculos foram vencidos. Muito mais do que isso, era o prazer interior de ter realizado algo que tanto desejei, de ter feito e visto o que fiz e vi”.

Amyr Klink, em “Mar sem fim”.

RESUMO

A resistência microbiana tem estimulado pesquisas com o mel, eficaz no tratamento de várias afecções humanas. Apesar disso, estudos sobre suas propriedades biológicas no Brasil são escassos, e principalmente para méis da Bahia não foram encontrados registros até o momento. Assim neste trabalho a atividade antimicrobiana e a composição química de amostras de mel coletadas no estado da Bahia foram avaliadas. O Capítulo 1 deste trabalho avalia 37 amostras de méis de *Apis mellifera* e 16 de abelhas sem ferrão (*Friseomelita doederleinei*, *Tetragonisca angustula*, *Melipona asilvai*, *Melipona scutellaris*, *Melipona quadrifasciata* e *Plebeia sp.*), coletadas na Bahia, de 2005 a 2008. O Capítulo 2 trata da comparação entre dois períodos de produção de mel de *A. mellifera* da mesma colméia do município de Canarana, Bahia. A atividade antimicrobiana dos méis foi determinada pelo método de difusão em ágar e Concentração Inibitória Mínima, e a cepa de *S. aureus* foi a mais sensível. As amostras foram testadas contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Parâmetros como pH, acidez, atividade de água (aw), cor, presença de peróxidos e compostos fenólicos foram analisados. Foi realizada análise de correlação de Spearman para verificação de possíveis relações entre os parâmetros físico-químicos e a atividade antimicrobiana. O perfil fenólico das amostras foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência e os dados tratados por análise multivariada de coordenadas principais. Os resultados mostram que méis de abelhas do estado da Bahia possuem atividade antimicrobiana e que esta atividade não pode ser atribuída a um único parâmetro.

Palavras chaves: Atividade antimicrobiana, Bahia, Mel.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance has stimulated research with honey, effective in treating various human diseases. Nevertheless, studies on its biological properties in Brazil are scarce, and specially for honeys from Bahia until now no records were found. Then, in the present work the antimicrobial activity and chemical composition of honey from Bahia was evaluated. Chapter 1 of this study evaluates 37 samples of *A. mellifera* honey and 16 of stingless bees (*T. angustula*, *M. scutellaris*, *M. quadrifasciata* and *Plebeia* sp), collected in Bahia, from 2005 to 2008. Chapter 2 deals with the comparison between two periods of production of *A. mellifera* honey from the same hive. The antimicrobial activity of honey was determined by the agar diffusion and minimal inhibitory concentration. The samples were tested against *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*. Parameters such as pH, acidity, water activity (*a_w*), color and phenolic compounds were analyzed. It was realized Spearman correlation analysis to verify the relation between the physicochemical parameters and antimicrobial activity. The phenolic profile was determined by high-performance liquid chromatography and the data was treated by multivariate analysis of principal coordinates. The results showed that honey bees from Bahia have antimicrobial activity and this activity could not be attributed to just one of the analyzed parameters.

Key words: Antimicrobial activity, Bahia, Honey.

ILUSTRAÇÕES E TABELAS

FIGURA		Pag.
1	Oxidação da β -D-glicose em presença de glicose-oxidase e oxigênio molecular	45
2	Estrutura química dos ácidos hidroxibenzoicos	49
3	Estrutura química dos ácidos hidroxicinâmicos	49
4	Núcleo básico dos flavonóides composto por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C)	50
5	Mapa do estado da Bahia apresentando divisão por microrregiões socioeconômicas	83
6	Placa de MIC (esquemático) apresentando aspectos de poços com amostras e poços controles revelados.	90
7	Placa de MIC (esquemático) apresentando controle de antibióticos contra bactérias (poços revelados em vermelho à direita superior da placa)	91
8	Número de amostras de méis inativas e ativas contra <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i> em relação ao total de méis coletados no estado da Bahia analisados por difusão em poço.	103
9	Placas com ágar Müller-Hinton mostrando halos de ação bacteriostática de amostras de mel de <i>Apis mellifera</i> do estado da Bahia contra <i>E. coli</i> CCMB261 (direita), e <i>S. aureus</i> CCMB262 (esquerda) .	104
10	CIM de amostra 21, 30 e 33 de mel de <i>A. mellifera</i> do estado da Bahia contra <i>S.aureus</i> ; em detalhe poços controle da viabilidade do micro-organismo, da esterilidade das amostras e dos meios de cultura.	110
11	Placa mostrando CIM de méis de abelhas sem ferrão do estado da Bahia contra <i>S. aureus</i> CCMB 262. Am.I= <i>Melipona asilvai</i> ; Am.II= <i>Friseomelita doederleinei</i> ; Am.III= <i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i> ; Am.IV= <i>Tetragonisca angustula</i> ; Am.=amostra; poços em vermelho=crescimento de micro-organismo; poços transparentes = inibição de micro-organismo.	110
12	Número de amostras ativas e inativas a través da técnica de determinação da CIM contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i> em relação ao total de méis de <i>A. mellifera</i> coletados no estado da Bahia.	114

13	Número de amostras ativas e inativas (CIM) contra <i>E. coli</i> , <i>S.aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i> em relação ao total de méis de abelhas sem ferrão coletados no estado da Bahia.	116
14	Dispersão da Correlação entre pH e CIM de méis de <i>A. mellifera</i> do estado da Bahia contra <i>E. coli</i>	124
15	Dispersão da Correlação entre pH e CIM de méis de <i>A. mellifera</i> do estado da Bahia contra <i>S. aureus</i>	124
16	Dispersão da Correlação e CIM de méis de <i>A. mellifera</i> do estado da Bahia contra <i>P. aeruginosa</i>	125
17	Dispersão da Correlação entre pH e CIM de méis de abelhas sem ferrão do estado da Bahia contra <i>E. coli</i>	125
18	Dispersão da Correlação entre pH e CIM de méis de abelhas sem ferrão do estado da Bahia contra <i>S. aureus</i>	125
19	Dispersão da Correlação entre pH e CIM de méis e abelhas sem ferrão do estado da Bahia contra <i>P. aeruginosa</i>	125
20	Dispersão da Correlação entre Acidez e CIM de méis de <i>A. mellifera</i> do estado da Bahia contra <i>E. coli</i>	128
21	Dispersão da Correlação entre Acidez e CIM de méis de <i>A. mellifera</i> do estado da Bahia contra <i>S. aureus</i>	128
22	Dispersão da Correlação entre Acidez e CIM de méis <i>A. mellifera</i> do estado da Bahia contra <i>P. aeruginosa</i>	128
23	Dispersão da Correlação entre Acidez e CIM de méis abelhas sem ferrão do estado da Bahia contra <i>E. coli</i>	128
24	Dispersão da Correlação entre Acidez e CIM de méis de abelhas sem ferrão do estado da Bahia contra <i>S. aureus</i>	128
25	Dispersão da Correlação entre Acidez e CIM de méis de abelhas sem ferrão do estado da Bahia contra <i>P. aeruginosa</i>	128
26	Valores percentuais de cor de méis de <i>A. mellifera</i> coletados no estado da Bahia analisados segundo escala de Pfund	136
27	Cores de méis coletados no estado da Bahia. À esquerda méis de <i>A. mellifera</i> e à direita méis de abelhas sem ferrão mostrando detalhe da cristalização na primeira amostra da série de abelhas nativas	136
28	Dispersão da Correlação entre Cor e CIM de méis de <i>A. mellifera</i> do estado da Bahia contra <i>E. coli</i>	138
29	Dispersão da Correlação entre Cor e CIM de méis de <i>A.</i>	138

	<i>mellifera</i> do estado da Bahia contra <i>S. aureus</i>	
30	Dispersão da Correlação entre Cor e CIM de méis de <i>A. mellifera</i> do estado da Bahia contra <i>P. aeruginosa</i>	138
31	Dispersão da Correlação entre C. Fenólicos e CIM de méis de <i>A. mellifera</i> da Bahia contra <i>E. coli</i>	146
32	Dispersão da Correlação entre C. Fenólicos e CIM de méis de <i>A. mellifera</i> da Bahia contra <i>S. aureus</i>	146
33	Dispersão da Correlação entre C. Fenólicos e CIM de méis de <i>A. mellifera</i> da Bahia contra <i>P. aeruginosa</i>	147
34	Dispersão da Correlação entre C. Fenólicos e CIM de méis de abelhas se ferrão da Bahia contra <i>E. coli</i>	147
35	Dispersão da Correlação entre C. Fenólicos e CIM de méis de abelhas se ferrão da Bahia contra <i>S. aureus</i>	147
36	Dispersão da Correlação entre C. Fenólicos e CIM de méis de abelhas se ferrão da Bahia contra <i>P. aeruginosa</i>	147
37	Dispersão da Correlação entre Flavonóides e CIM de méis de <i>A. mellifera</i> do estado da Bahia contra <i>E. coli</i>	147
38	Dispersão da Correlação entre Flavonóides e CIM de méis de <i>A. mellifera</i> do estado da Bahia contra <i>S. aureus</i>	147
39	Dispersão da Correlação entre Flavonóides e CIM de méis de <i>A. mellifera</i> da Bahia contra <i>P. aeruginosa</i>	148
40	Dispersão da Correlação entre Flavonóides e CIM de méis de abelhas sem ferrão da Bahia contra <i>E. coli</i>	148
41	Dispersão da Correlação entre Flavonóides e CIM de méis de abelhas sem ferrão da Bahia contra <i>S. aureus</i>	148
42	Dispersão da Correlação entre Flavonóides e CIM de méis de abelhas sem ferrão da Bahia contra <i>P. aeruginosa</i>	148
43	Análise Multivariada de Correspondência entre amostras de méis de <i>A. mellifera</i> do estado da Bahia e respectivos tempos de retenção de compostos fenólicos (CLAE)	152
44	Análise Multivariada de Correspondência entre amostras de méis de abelhas sem ferrão do estado da Bahia e respectivos tempos de retenção de compostos fenólicos (CLAE)	152
45	Análise Multivariada de Correspondência entre amostras de méis de <i>A. mellifera</i> do estado da Bahia e respectivos tempos de retenção de compostos fenólicos (CLAE)	154

46	Análise Multivariada de Correspondência entre amostras de méis de abelhas sem ferrão do estado da Bahia e respectivos tempos de retenção de compostos fenólicos (CLAE)	154
47	Localização por região, de méis do estado da Bahia (arábicos=méis de <i>Apis</i> ; romanos=méis de abelhas sem ferrão)	155
48	Espectros UV de compostos fenólicos de méis de <i>A. mellifera</i> do estado da Bahia	156
49	(Cromatograma de compostos fenólicos (CLAE) de mel (amostra 19) de <i>A. mellifera</i> do estado da Bahia em cromatógrafo líquido Shimadzu SCL-10Aup, coluna Lichrospher RP-18 fase reversa) de 25,0 x 0,42 cm, com partícula de 5µm	158
50	Cromatograma de compostos fenólicos (CLAE) de mel (amostra XVI) de abelha sem ferrão do estado da Bahia em cromatógrafo líquido Shimadzu SCL-10Aup, coluna Lichrospher RP-18 (fase reversa) de 25,0 x 0,42cm, com partícula de 5µm	158
51	Cromatograma de compostos fenólicos (CLAE) de mel (amostra 37) de <i>A. mellifera</i> do estado da Bahia em cromatógrafo líquido Shimadzu SCL-10Aup, coluna Lichrospher RP-18 (fase reversa) de 25,0 x 0,42cm ,com partícula de 5µm	159
52	Cromatograma de compostos fenólicos (CLAE) de mel (amostra VI) de abelha sem ferrão do estado da Bahia em cromatógrafo líquido Shimadzu SCL-10Aup, coluna Lichrospher RP-18 (fase reversa) de 25,0 x 0,42 cm, com partícula de 5µm	159
53	Semiárido brasileiro	182
54	Mapa da Região de Irecê e localização do município de Canarana/BA	183
55	Placa de CIM (esquemático) apresentando aspectos de poços com amostras e poços controles revelados com TTC	189
56	Placa de CIM (esquemático) apresentando ação de amostras de mel, controle de antibióticos contra bactérias, e esterilidade da água e meios de cultura utilizados	190
57	Condições climáticas referentes ao período de amostragem	196
58	Comparação de cromatogramas (CLAE) de mel de <i>A. mellifera</i> do município de Canarana-BA, 1.º período (preto) e 2.º período (vermelho)	204
59	Comparação de comatogramas (CLAE) de mel de <i>A. mellifera</i> do município de Canarana-BA, 1.º período (preto) e 2.º período (vermelho)-Zoom	205

60	Comparação de cromatogramas (CLAE) de mel de <i>A. mellifera</i> do município de Canarana-BA, 1.º período (preto) e 2.º período (vermelho); detalhe de pico presente no 1.º período e com pouca expressão no 2.º período	205
61	Comparação de cromatogramas (CLAE) de mel de <i>A. mellifera</i> do município de Canarana-BA, 1.º período (preto) e 2.º período (vermelho); detalhe de pico presente no 1.º período e com pouca expressão no 2.º período	206
62	Espectros UV de compostos fenólicos analisados por CLAE-DAD, em méis de <i>Apis mellifera</i> do município de Canarana-Bahia	206

TABELA

		Pag.
1	Méis de <i>Apis mellifera</i> coletados por microrregião socioeconômicas do estado da Bahia	84
2	Identificação das amostras de méis de abelhas sem ferrão do estado da Bahia por espécie, tribo/nome popular, florada e local de coleta	85
3	Escala de Pfund - Cor de Mel em milímetros (mm)	93
4	Resultados dos testes de difusão em poço através da medida do diâmetro dos halos (mm) de inibição (efeito bactericida) e redução de crescimento (efeito bacteriostático) de méis de <i>A. mellifera</i> do estado da Bahia por região econômica contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i>	100
5	Resultados dos testes de difusão em poço através da medida do diâmetro dos halos (mm) que mostram o efeito bacteriostático (redução de crescimento) de méis abelhas sem ferrão do estado da Bahia por região econômica contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i>	102
6	Halos de ação bactericida (mm) dos antibióticos gentamicina e cloranfenicol usados contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> e o antifúngico nistatina usado contra <i>C. albicans</i>	108
7	Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (mg.mL^{-1}) de méis de <i>Apis mellifera</i> do estado da Bahia frente aos micro-organismos testes: <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i>	111
8	Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (mg.mL^{-1}) do mel de abelhas sem ferrão, coletados na Bahia, frente aos micro-organismos testes: <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i>	113

9	Resultados da determinação da CIM (mg.mL^{-1}) dos antimicrobianos gentamicina, cloranfenicol e nistatina usados como controle contra os micro-organismos testes: <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i>	114
10	Valores de pH, acidez e florada de méis de <i>Apis mellifera</i> do estado da Bahia por microrregiões socioeconômicas	120
11	Valores de pH, acidez de méis de abelhas sem ferrão do estado da Bahia por microrregião, florada e espécie de abelha	122
12	Correlação de Spearman (r_s) entre valores de pH de méis de <i>A. mellifera</i> e de abelhas sem ferrão do estado da Bahia e CIM contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	124
13	Correlação de Spearman (r_s) entre valores de Acidez de méis de <i>A. mellifera</i> e de Abelhas sem ferrão do estado da Bahia e CIM contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	127
14	Atividade de água (aW) de méis de <i>A. mellifera</i> por microrregiões do estado da Bahia	131
15	Atividade de água (aW) do mel puro e do mel diluído a 50% e halos de ação bacteriostática (em mm) de amostras de abelhas sem ferrão do estado da Bahia	133
16	Atividade antimicrobiana de solução de açúcar e amostras de mel	134
17	Avaliação da Cor e CIM de méis de <i>Apis mellifera</i> do estado da Bahia contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i> , por microrregiões socioeconômicas	137
18	Correlação (r_s) Spearman entre Cor de méis de <i>A. mellifera</i> do estado da Bahia e CIM contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	138
19	Concentração Inibitória Mínima (mg.mL^{-1}) e Cor Pfund de mel de abelhas sem ferrão por espécies, coletados no estado da Bahia	140
20	CIM (mg.mL^{-1}) de méis do estado da Bahia – sem e com catalase (10mg.mL^{-1}) para inibição do H_2O_2	141
21	Razão entre valores de CIM de méis de <i>A. mellifera</i> com e sem catalase	142
22	CIM (mg.mL^{-1}), teor de Compostos Fenólicos Totais e Favonóides totais (mg.100g^{-1}) de méis de <i>Apis mellifera</i> de florada silvestre da Bahia, por microrregião socioeconômica	143
23	Valores da Concentração Inibitória Mínima (mg.mL^{-1}), Teor de Compostos Fenólicos Totais e Flavonóides Totais (mg.100g^{-1})	144

de mel de abelhas sem ferrão por espécies e região, coletados no estado da Bahia, de florada silvestre

24	Correlação (rs) Spearman entre Compostos Fenólicos e Flavonóides versus Atividade antimicrobiana (CIM) de méis de <i>A. mellifera</i> e de Abelhas sem ferrão do estado da Bahia contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i>	146
25	Tempos de retenção (RT) e λ maximos de picos majoritários em méis do estado da Bahia analisados por CLAE e CLAE-DAD	157
26	Ocorrência (RF%) de picos majoritários (RT em minutos) de compostos fenólicos (CLAE) de méis de <i>Apis mellifera</i> de microrregiões socioeconômicas do estado da Bahia	161
27	Atividade antimicrobiana (CIM) de méis de <i>Apis mellifera</i> do município de Canarana-BA, coletados em fevereiro (1.º período) e setembro de 2008 (2.º período de produção)	196
28	Concentração Inibitória Mínima (mg.mL ⁻¹) dos antibióticos gentamicina e cloranfenicol e do antifúngico nistatina usados como controle	197
29	CIM de amostra (7.2) de mel de <i>A. mellifera</i> do município de Canarana-BA com atividade antimicrobiana <u>com</u> e <u>sem</u> catalase	198
30	Atividade de água e Umidade (%) de méis de <i>A. mellifera</i> do município de Canarana/BA a 100% e a 50% coletados em fevereiro (1.º período) e setembro de 2008 (2.º período de produção)	199
31	Valores de CIM da solução de açúcares (glicose, frutose e sacarose) e solução mel a 50% sobre os micro-organismos testes	200
32	Cor de méis (Pfund a 635nm) de <i>Apis mellifera</i> do município de Canarana-BA, coletados nos meses de fevereiro (1.º período) e setembro de 2008 (2.º período de produção)	201
33	Valores de pH e Acidez (meq.kg ⁻¹) de méis de <i>A. mellifera</i> do município de Canarana/BA coletados em fevereiro (1.º período) e setembro de 2008 (2.º período de produção)	202
34	Estimativa de Compostos Fenólicos Totais e Flavonóides Totais (mg.100g ⁻¹) em méis de Canarana-BA em fevereiro (1.º período) e setembro de 2008 (2.º período de produção)	203
35	Espectro polínico do mel de <i>Apis mellifera</i> de Canarana-BA, coletado em fevereiro (1.º período) e setembro de 2008 (2.º período de produção): tipos polínicos, percentuais e classes de frequência	207

36	Espectro polínico do mel de <i>Apis mellifera</i> de Canarana-BA, coletado em fevereiro (1.º período) e setembro de 2008 (2.º período de produção): tipos polínicos, percentuais e classes de frequência	210
----	--	-----

ABREVIATURAS

mL	– Mililitros
meq.Kg ⁻¹	– Miliequivalente por quilograma
g.100 g ⁻¹	– Grama por 100 gramas
mg.Kg ⁻¹	– Miligrama por quilograma
%	– Por cento
AC	– Antes de Cristo
aW	– Atividade de água
pH	– Potencial hidrogeniônico
H ₂ O ₂	– Peróxido de hidrogênio
H ⁺	– Íon hidrogênio
- log[H ⁺]	– Logaritmo negativo do íon hidrogênio
µm	– Micrômetro
Pa	– Pascal
v/v	– Volume por volume
°C	– Graus Celsius
UFC.mL ⁻¹	– Unidade formadora de colônia por mililitro
h	– Hora
B.O.D.	– Demanda bioquímica de oxigênio
CO ₂	– Dióxido de carbono
meq.mL ⁻¹	– Miliequivalente por mililitro
Eq.L ⁻¹	– Equivalente por litro
Abs ₆₃₅	– Absorbância a 635 nanômetros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 O MEL	27
2.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	31
2.3 FATORES ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE BIOLÓGICA	38
2.3.1 Atividade Osmótica e Atividade de Água (aW)	39
2.3.2 Cor	41
2.3.3 pH	42
2.3.4 Acidez	42
2.3.5 Peróxido de Hidrogênio	44
2.3.6 Compostos Fenólicos	47
2.4 MICRO-ORGANISMOS	51
REFERÊNCIAS	54
3 CAPÍTULO 1 - AÇÃO BIOLÓGICA E FATORES FÍSICO-QUÍMICOS DE MÉIS PRODUZIDOS NO ESTADO DA BAHIA	
RESUMO	
ABSTRACT	
3.1 INTRODUÇÃO	78
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	82
3.2.1 Coleta de Amostras	82
3.2.2 Determinação da Atividade Antimicrobiana	86
3.2.2.1 Conceitos de Atividade	86
3.2.2.2 Verificação da contaminação microbiana das amostras	87
3.2.2.3 Teste de Difusão em poço	87
3.2.2.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM	89
3.2.2.5 Controle dos Antibióticos padrões	91
3.2.3 Parâmetros Físico-químicos	92
3.2.3.1 Atividade de Água	92

3.2.3.2	Cor	92
3.2.3.3	pH	93
3.2.3.4	Acidez livre	93
3.2.3.5	Compostos Fenólicos	94
3.2.3.5.1	Fenóis totais	94
3.2.3.5.2	Flavonóides totais	95
3.2.3.5.3	Compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	95
3.2.4	Estudo de Repetibilidade	97
3.2.5	Limite de Detecção e Linearidade	97
3.2.6	Análise Estatística	98
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
3.3.1	Atividade Antimicrobiana	99
3.3.1.1	Testes preliminares e difusão em poço	99
3.3.1.2	Concentração Inibitória Mínima	109
3.3.2	Determinações físico-químicas e atividade biológica	119
3.3.2.1	Acidez e pH	119
3.3.2.2	Atividade de água	131
3.3.2.3	Cor	135
3.3.2.4	Ação do Peróxido de Hidrogênio	141
3.3.2.5	Compostos fenólicos (UV-Vis)	142
3.3.2.6	Compostos fenólicos (CLAE)	149
3.3.3	Validação da metodologia (CLAE)	162
	REFERÊNCIAS	164

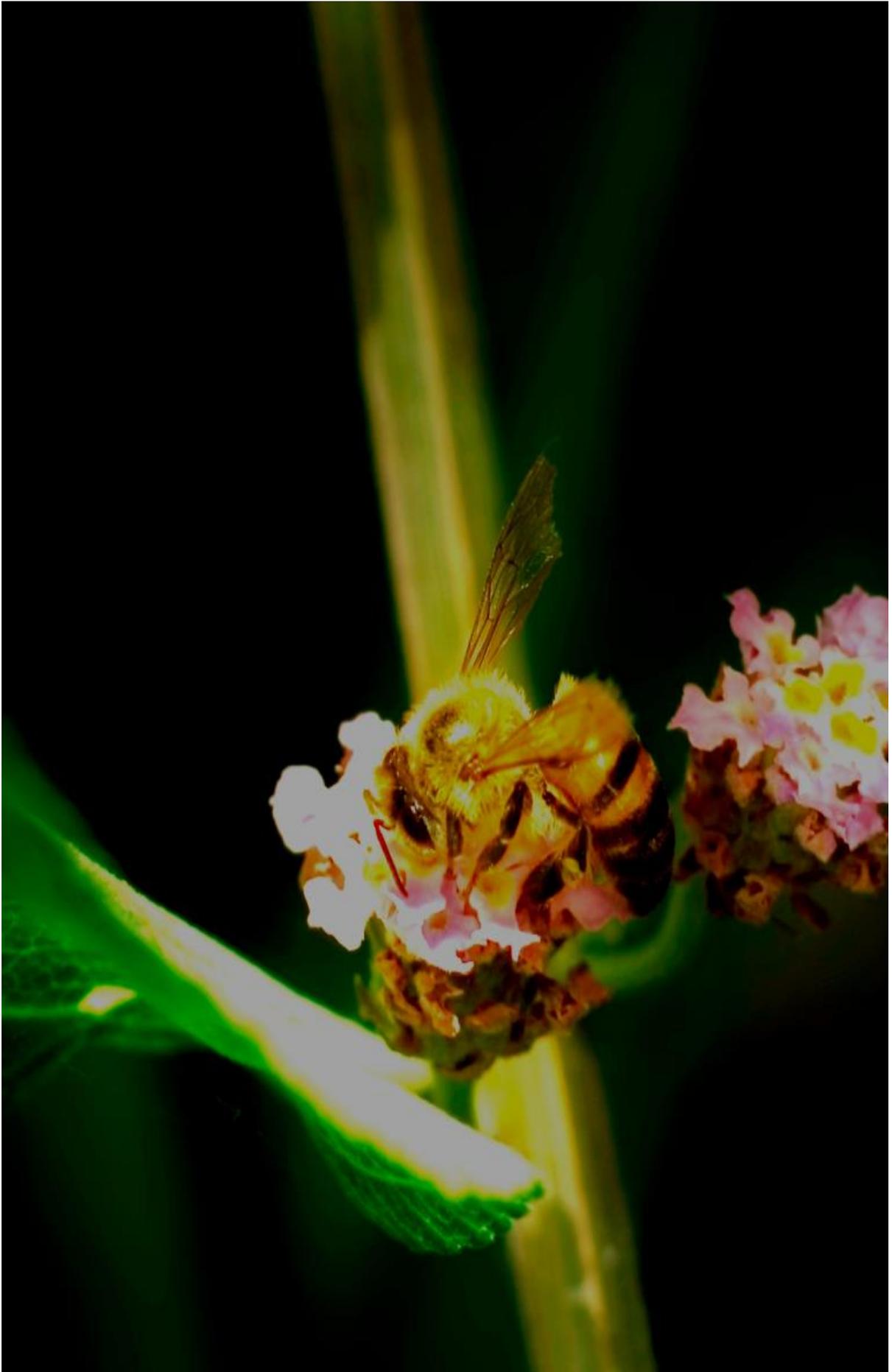
4 CAPÍTULO 2 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MÉIS DO ESTADO DA BAHIA EM DOIS PERÍODOS DE PRODUÇÃO

RESUMO

ABSTRACT

4.1	INTRODUÇÃO	182
4.2	OBJETIVOS	186
4.3	MATERIAL E MÉTODOS	186
4.4	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	187
4.4.1	Controles da CIM	188

4.4.2 Controle de Antibióticos padrões	189
4.5 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	190
4.5.1 pH	190
4.5.2 Acidez livre	190
4.5.3 Atividade de água (aW) e Umidade	191
4.5.4 Cor	191
4.5.5 Determinação de compostos fenólicos	191
4.5.5.1 Análise espectrofotométrica - fenólicos totais	191
4.5.5.2 Análise espectrofotométrica- flavonóides totais	192
4.5.5.3 Análise cromatográfica-CLAE	192
4.6 ANÁLISE POLÍNICA	194
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	195
4.8 RESULTADOS E DISCUSSÃO	195
4.8.1 Atividade antimicrobiana	196
4.8.2 Parâmetros físico-químicos	198
4.9 ANÁLISE POLÍNICA	207
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	210
REFERÊNCIAS	212
CONSIDERAÇÕES FINAIS	222
ANEXO 1	
ANEXO 2	



1 INTRODUÇÃO GERAL

O mel é uma substância doce e viscosa, de odor característico, produzido por abelhas a partir do néctar de flores ou de secreções de plantas induzidas pela ação de insetos sugadores (BRASIL, 2000). Utilizada por gerações desde tempos ancestrais, suas virtudes estão descritas em antigos documentos religiosos e textos médicos (D'ARCY, 2005; NAMIAS, 2003; MOLAN, 1992a). Remédios tradicionais contendo mel foram utilizados no tratamento tópico de feridas por diversas civilizações antigas e ainda hoje são popularmente usados em áreas remotas. As suas indicações terapêuticas variam, entre outras, desde a limpeza e proteção de queimaduras e controle de feridas crônicas, ao tratamento de afecções das vias aéreas e cataratas (VIT, 2008; BERETTA, 2005; BLASA et al., 2005; HENRIQUES, 2004; AL-WAILI et al., 1999).

Em países da União Européia, na Austrália, Nova Zelândia, Canadá, Estados Unidos e Hong Kong, formulações de mel foram introduzidas na medicina moderna, através do desenvolvimento de produtos licenciados (HENRIQUES et al., 2009). Entretanto, o mecanismo de ação terapêutica ainda não completamente elucidado, e conseqüentemente a falta de regulamentação, são motivos pelos quais essa matéria prima ainda sofre alguma restrição por parte da classe médica em geral (NAMIAS, 2003; MOLAN, 1992a).

Dada à sua alta complexidade (D'ARCY 2005; BOGDANOV 2004), a identificação de fatores específicos responsáveis pela ação biológica do mel tem sido objeto de várias pesquisas, sendo opinião consensual que a sua atividade antimicrobiana pode ser devida a múltiplos fatores, tais como baixo conteúdo de água, alto teor de açúcares, baixo pH, acidez, presença de peróxido de hidrogênio e compostos do metabolismo secundário vegetal. Essa complexidade determina especificidades que se relacionam com aspectos originais como a abelha produtora, a flora visitada, geografia e clima da região, estação do ano, bem como aspectos de produção e manejo do mel (BIJLSMA et al., 2006; ORDÓÑEZ et al., 2005; VIT et al., 1998).

A atividade biológica sobre um amplo espectro de micro-organismos (COOPER 2002; WAHDAN 1998; MOLAN 1992a), explica o uso do mel como antimicrobiano, segundo relatos clínicos da inibição tanto de patógenos sensíveis como antibiótico-resistentes (COOPER, 2005; OVERGAAUW e KIRPENSTEIJN, 2005).

De acordo Park et al. (2002a), a caracterização e identificação do mel são absolutamente necessárias para que seja bem definida a sua aplicação. Assim, ao lado dos parâmetros físico-químicos, a origem floral é reconhecida como importante critério no controle de qualidade do mel (FERRERES et al., 1994, 1993, 1992). A elucidação dos fatores responsáveis pela atividade antimicrobiana de determinado mel, pode gerar ações de desenvolvimento da produção para manutenção da qualidade e direcionar seu uso agregando-lhe valor comercial.

A identificação da origem botânica de cada mel, intimamente relacionada à sua qualidade biológica, se reveste ainda mais de importância quando possibilita o direcionamento da comercialização para fins biotecnológicos, mais especificamente terapêuticos.

Assim, a importância desse estudo tem como base a busca por alternativas para a problemática terapêutica da resistência microbiana a antibióticos, e a possibilidade de expansão do uso do mel, reconhecido elemento de uso medicinal popular. As pesquisas com vistas à regulamentação para fins terapêuticos, e as ações de preservação do ecossistema origem objetivando a manutenção da atividade, podem representar um grande aporte para a questão ambiental e para o homem do campo.

Estudos sobre a composição química e o potencial terapêutico de méis em várias regiões do mundo têm aumentado, mas, no Brasil apesar da grande extensão territorial e da variedade florística, estes ainda são escassos.

No estado da Bahia, estudos dessa natureza não foram encontrados na literatura científica até o momento e de maneira geral o uso do mel continua restrito à terapia popular. Torna-se evidente a necessidade de estudos científicos com vistas a caracterizá-lo e evidenciar seu potencial biotecnológico para a produção e utilização como medicamento.

Levando em consideração a possível atividade antimicrobiana dos méis produzidos no estado da Bahia, este trabalho se propõe a investigar e discutir fatores apontados pela literatura como determinantes da ação biológica, contra quatro micro-organismos testes: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, presenças importantes em eventos nosocomiais.

Dessa forma, esta pesquisa objetiva ampliar o conhecimento sobre méis do estado da Bahia e colocar em evidência seu potencial como matéria-prima para o desenvolvimento de estudos no campo medicinal e biotecnológico.

Este trabalho será apresentado em dois capítulos, onde o 1.^o discutirá a atividade antimicrobiana e os fatores responsáveis por esta atividade biológica em méis de *Apis mellifera* e de abelhas sem ferrão coletados nas diversas microrregiões socioeconômicas do estado da Bahia.

No capítulo 2, serão avaliados parâmetros físico-químicos, perfil polínico e os compostos fenólicos de dois períodos de produção, e comparados à atividade antimicrobiana de méis de *A. mellifera* do município de Canarana, Bahia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A apicultura é a arte de criar abelhas com o objetivo de proporcionar ao homem produtos derivados como o mel, cera, geléia real, própolis, pólen, e ainda, prestar serviços de polinização às culturas vegetais (MOREIRA, 1993). No Brasil, esta atividade teve início com as abelhas da espécie *Apis mellifera*, introduzidas no Brasil em 1840, oriundas da Espanha e Portugal, trazidas pelo Padre Antônio Carneiro. Provavelmente as subespécies *Apis mellifera mellifera* (abelha preta ou alemã) e *Apis mellifera carnica* tenham sido as primeiras abelhas do gênero *Apis* a chegar a nosso país (PEREIRA et al., 2003).

Em 1845, imigrantes alemães introduziram no sul do país a abelha *Apis mellifera mellifera*. Entre os anos de 1870 a 1880, as abelhas italianas, *Apis mellifera ligustica* foram introduzidas no Sul e na Bahia (EMBRAPA, 2003). Em 1956 foram trazidas as abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*) originárias do Leste da África, mais produtivas, porém mais agressivas. Do cruzamento destas abelhas com as européias, resultaram as abelhas africanizadas (Mendes, 1998) de maior produção e mais resistentes a pragas (dispensam o uso de antibióticos), que constituem a base da atual apicultura brasileira (EMBRAPA, 2003). A abelha comercial no Brasil é na verdade um híbrido das abelhas européias *Apis mellifera mellifera*, *Apis mellifera ligustica*, *Apis mellifera caucasica* e *Apis mellifera carnica*, com a abelha africana *Apis mellifera scutellata* (PEREIRA et al., 2003). A variabilidade genética dessas abelhas é muito grande, predominando no sul, características das abelhas européias, enquanto no norte características das abelhas africanas (PEREIRA et al., 2003).

O mel, um dos produtos apícolas mais popularizados ao longo do tempo, tem sido utilizado geralmente como alimento, embora no Brasil o consumo anual médio *per capita* seja baixo (inferior a 300g), se comparado a países da Comunidade Européia, onde o consumo médio pode atingir mais de 1000g. A procura no mercado externo pelo mel brasileiro e os preços alcançados, alimentaram o rápido crescimento da apicultura no Brasil. A produção brasileira de mel no período de 2001 a 2004 aumentou em 10 mil toneladas (45,3%), e no mercado internacional, o

país chegou a contribuir com 1,9% da produção mundial com 24.000 ton. (RELATÓRIO SEBRAE, 2006).

Em 2006 a valorização da moeda brasileira e a suspensão da importação do mel brasileiro pela União Européia comprometeram as exportações. O embargo teve como base a persistência de falhas no sistema de monitoramento de resíduos de antibióticos no mel brasileiro, apesar de que os apicultores brasileiros não usam medicamentos (APACAME, 2007), pois a *Apis mellifera* tem apresentado resistência às pragas que atacam as colméias em outros países produtores.

Apesar disso, as exportações de mel em 2006 cresceram, em relação a 2005, e o país foi apontado como o terceiro exportador mundial de mel, atrás apenas da China e da Argentina, graças aos Estados Unidos, que absorveram 75% das exportações, o equivalente a US\$ 17,33 milhões. De acordo com o balanço do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC), em 2006 foram comercializadas 14,6 mil toneladas, que renderam US\$ 23,36 milhões (APACAME, 2007).

Ainda assim, os valores praticados em 2006 foram inferiores aos de 2003 e 2004, quando os preços de venda no mercado internacional estavam em alta e os produtores colheram boas safras. Nesses anos, o embargo ao mel argentino (devido aos subsídios oferecidos aos seus produtores) e chinês (foram encontrados resíduos de produtos veterinários no mel) favoreceu o comércio de mel brasileiro (APACAME, 2007).

De acordo com Sommer (2002), a maior parte deste crescimento foi verificada no Nordeste, com 6,6 mil toneladas (173,8%), devido a fatores favoráveis como a estabilidade de clima e a disponibilidades de mata silvestre com flora apícola diversificada e intensa, e o decréscimo da produção nos estados do sul do país. De acordo com Levy (1998), o semiárido nordestino favorece a produção de mel *orgânico* de grande procura no mercado.

Na Bahia, segundo a Confederação Brasileira de Apicultura, foram produzidos em 2008 cerca de 4,0 mil toneladas de mel, colocando o Estado como o terceiro produtor do Nordeste, atrás somente do Piauí e do Ceará (IBGE, 2009).

Por outro lado, antes de serem introduzidas no país espécies do gênero *Apis*, aqui já se encontravam abelhas nativas. As abelhas sem ferrão ou abelhas nativas (subfamília Meliponinae), de grande importância ecoeconômica e cultural, constituem um grupo de abelhas distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da Terra, com maior concentração na América Latina (SOUZA 2005), sendo encontradas também na Ásia, Ilhas do Pacífico, Austrália, Nova Guiné e África (NOGUEIRA-NETO, 1997).

Do ponto de vista taxonômico, a subfamília Meliponinae está subdividida em duas tribos: Meliponini, formada apenas pelo gênero *Melipona*, e Trigonini que agrupa um grande número de gêneros (NOGUEIRA-NETO, 1997).

O Brasil é rico em espécies de abelhas sociais nativas, conhecidas como abelhas indígenas sem ferrão e sua criação racional, a meliponicultura, desenvolve-se principalmente no nordeste brasileiro (CÂMARA et al., 2004).

No sertão nordestino a diversidade de floradas favorece a produção de méis com características bastante variadas quanto à sua cor e composição (ALCOFORADO FILHO & GONÇALVES, 2000). Para Alencar (2002), a flora da região é uma das maiores reservas do planeta. Durante o período chuvoso (quatro meses por ano) nascem muitas leguminosas de ciclo curto que junto às árvores e arbustos constituem importante zona de forrageamento apícola.

3.1 O MEL

O mel é um produto viscoso de aroma característico e agradável, com sabor geralmente doce, podendo também apresentar sabor ácido ou amargo a depender de sua origem. É um produto elaborado pelas abelhas melíferas a partir do néctar das flores (mel floral), de exsudações vegetais ou de excreções de insetos sugadores de plantas (mel de melato ou melato), ou mesmo frutas (MOREIRA, 2001). Esta matéria precursora é coletada, transformada pela ação das enzimas hipofaringeanas das abelhas e armazenada em alvéolos de cera para maturação (BRASIL, 2000).

Para mel de melato, a matéria-prima é originária da excreção de artrópodes da ordem Homóptera, conhecidos como afídios, a exemplo dos pulgões, que sugam o fluido do floema, a seiva elaborada, e excretam um líquido adocicado na forma de gotas através do seu canal alimentar (SIDDIQUI, 1970). Este líquido depositado nas folhas e em outras partes da planta é coletado pelas abelhas e utilizado na produção de mel.

A desidratação e transformação do néctar pelas abelhas tem como resultado o mel, e dessa forma, a quantidade e a sua qualidade sofrem influência da produção e concentração de néctar, da concentração de flores na área e do tempo em que as flores estão secretando néctar (CRANE, 1987). A composição do néctar de uma espécie produtora contribui diretamente na composição do mel elaborado, dando-lhe características específicas (WHITE e BRYANT JR., 1996).

Para o *Codex Alimentarius Commission*, produzido pela *Food Organization of the United Nations*, o mel é basicamente uma mistura complexa de açúcares altamente concentrada. Segundo Al-Mamary et al. (2002), ao mel são reportados quase duas centenas de componentes químicos diferentes e Vilhena e Almeida-Muradian (1999) complementam que o mel contém ácidos orgânicos, enzimas, vitaminas, flavonóides, minerais e compostos que contribuem para sua cor, odor e sabor. Serrano et al. (1994) e Campos (1987) sugeriram ser a composição do mel dependente de muitos fatores tais como: espécies colhidas, natureza do solo, raça de abelhas, estado fisiológico da colônia, estado de maturação do mel, condições meteorológicas, entre outros. Consta na literatura que a solução aquosa formadora do mel pode ser expressa em média como: glicose 34,0%, frutose 40,5%, sacarose 1,9%, água 17,7%, proteínas 1,5%, cinzas 1,8%, enzimas e vitaminas 2,6%, sais minerais, pólen, ácidos graxos e outros componentes minoritários como dextrina, gomas e pequenas quantidades de material nitrogenado ou fosforado, ácidos orgânicos, pigmentos e substâncias aromáticas (DA SILVA, 2004; EMBRAPA, 2003; ARRUDA, 2003; TERRAB et al., 2004).

Em méis florais, os açúcares majoritários são reconhecidamente a glicose e frutose. Quanto aos méis de melato, estes geralmente são classificados por seus trissacarídeos característicos em dois tipos: os ricos em melezitose, sujeitos à granulação, e aqueles ricos em erlose que não sofrem granulação (DONER, 1977).

O conteúdo de vitaminas é baixo, mas podem ser encontradas no néctar: tiamina, riboflavina, piridoxina, ácidos pantotênico, nicotínico e fólico, biotina e ácido ascórbico, a vitamina de maior quantidade no néctar e no mel (CRANE, 1987).

Huidobro et al. (1995), White e Kushinir (1967) e Schepartz e Subers (1966) afirmam que enzimas como a diastase, catalase, alfa-glicosidase, peroxidase, lipase, fosfatase ácida e inulase, também estão presentes no mel. A diastase atua na quebra do amido e embora a sua função na fisiologia da abelha ainda não esteja claramente elucidada, pode estar envolvida com a digestão do pólen. Sua presença é um indicativo de qualidade (VARGAS, 2006; CRANE, 1987). Por ser altamente instável frente a temperaturas elevadas, a medida da sua atividade é importante na detecção de possível aquecimento do mel, embora em temperatura ambiente esta possa também perder atividade se o armazenamento for prolongado (CRANE, 1987). A catalase presente no mel se origina do pólen da flor e sua quantidade no mel depende da fonte floral e da quantidade de pólen coletado pelas abelhas (WESTON, 2000a). Tal como a invertase e a diastase, a glicose-oxidase produzida pelas glândulas hipofaringeanas das abelhas, é incorporada ao néctar durante a sua retirada das plantas e deposição nos favos das colméias (CRANE, 1987).

De maneira geral o açúcar natural encontrado na seiva das plantas é a sacarose. No entanto, o néctar pode ter na sua composição, sacarose pura, uma mistura de sacarose, glicose e frutose ou apenas glicose e frutose (CRANE, 1987; HOOPER, 1976). Crane (1987) afirma que o néctar é uma solução aquosa de vários açúcares, que perfazem de 3% a 87% do peso total e 90% a 95% da matéria sólida total. Estes açúcares são secretados pelos nectários da flor na forma de néctar, ou seja, solução de açúcar e água.

O mel é constituído basicamente por água e carboidratos (80% m/m do conteúdo de sólidos totais), e desses, 90% são monossacarídeos D-(+)-glicose e D-(-)-frutose (ARIAS et al., 2003; MOREIRA e DE MARIA, 2001; e MENDES et al., 1998). Autores como Carvalho et al. (2000); Sodr e (2000); Costa et al. (1999); Uñates, et al. (1999); Komatsu (1996); Rodrigues et al. (1996); Bastos e Silva (1994); Seemann e Neira (1988); Vidal e Fregosi (1984) e Huidobro e Simal (1984), têm estudado os açúcares do mel, encontrando teores de 62,9% a 86,07% para os redutores (glicose e frutose) e 1,83% a 11,0% para não redutor (sacarose). Méis

originários de néctar, geralmente apresentam teores de açúcares invertidos (D-(+)-glicose + D-(-)-frutose) em torno de 65%.

Por outro lado, méis monoflorais contêm maior quantidade de frutose (BOGDANOV, 2004). Segundo Siddiqui (1968), méis poliflorais apresentam proporções de glicose e frutose quase iguais. Esses teores são de grande importância no tipo de desvio que o mel produz no plano da luz polarizada, e no estabelecimento de várias características, como a granulação, a qual tem como responsável a glicose monoidratada (encontrada em maior concentração no mel granulado) e a sua relação com a frutose (BOGDANOV, 2004; MOREIRA e DE MARIA, 2001). Alguns estudos indicam que em níveis de frutose elevados, o equilíbrio glicose anidra/glicose monoidratada, se orienta no sentido glicose anidra, mais solúvel, afastando o perigo de granulação do mel.

No mel podem ser encontrados também di, tri e oligossacarídeos formados por unidades monoméricas de D-(+)-glicose e D-(-)-frutose (MOREIRA e DE MARIA, 2001). São conhecidos mais de 20 oligossacarídeos estruturalmente similares (ARIAS et al., 2003), como celobiose, turanose, gentiobiose, palatinose, isomaltose, nigerose, isomaltulose, neotrealose, kojibiose, melibiose, laminaribiose, maltose, leucrose além da sacarose (dissacarídeos), e os trissacarídeos centose, 1-cestose, teanderose, rafinose, panose, erlose, 4- α -gentiobiosilglicose, 3- α -isomaltosilglicose, maltotriose, isomaltotriose, isopanose e laminaritriose (MOREIRA e DE MARIA, 2001).

Crane (1987) afirma que ao manipular o néctar ou melato, as abelhas introduzem a invertase, uma enzima que irá causar mudanças químicas, aumentando a quantidade de açúcar. A invertase adicionada transforma 75% da sacarose inicial do néctar coletado, nos açúcares invertidos glicose e frutose, ao tempo em que, açúcares superiores que não estão presentes no material vegetal original são sintetizados. Segundo a autora, essa ação se mantém até o "amadurecimento" total do mel.

A enzima invertase irá permanecer no mel conservando sua atividade por algum tempo, a menos que seja inativada pelo aquecimento (CRANE, 1987). A inversão aumenta a concentração de açúcares e a resistência do material à

deterioração por fermentação, dada a diminuição da biodisponibilidade da água (ALENCAR, 2002; CRANE, 1987).

Depois dos carboidratos, a umidade é o segundo componente de maior valor presente no mel. Méis de *A. mellifera* podem apresentar valores na faixa de 15 a 23%, podendo chegar a níveis bem maiores em méis de abelhas sem ferrão. Característica de grande importância na qualidade do mel, a umidade pode influenciar no sabor e palatabilidade, na viscosidade e peso específico do mel. Pode informar também da sua maturidade e conservação, ou mesmo da maior ou menor presença de açúcar como a glicose (cristalização). As legislações vigentes, nacional e internacionais especificam 20% de umidade para méis destinados à comercialização (BRASIL, 2000; MERCOSUL, 1999).

Cano et al. (2001) e Seemann e Neira (2007) afirmaram que méis em estado ótimo de maturação apresentam umidade menor que 18,5%, no entanto, além da colheita prematura (méis verdes), as condições geográficas, estacionais e climáticas, e a origem botânica podem influenciar o teor de umidade do mel (ARRUDA, 2003).

2.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Antigas civilizações utilizaram em terapias milenares, os produtos das abelhas como importantes recursos terapêuticos e/ou de conservação. Hoje, a medicina natural tem aumentado a procura por produtos alternativos, dentre os quais se encontram aqueles produzidos pelas abelhas, como o mel (ZUMLA e LULAT, 1989).

Esta matéria-prima tem sido usada como antimicrobiano, desde os tempos mais remotos, antes mesmo de que as bactérias fossem descobertas como responsáveis por infecções (AMÉNDOLA 2003; MOLAN, 2001).

O tratamento de feridas e queimaduras tem preocupado o Homem desde os tempos mais remotos e, referências ao uso do mel foram encontradas em papiros egípcios de há 10.000 anos, em textos sumérios, gregos, romanos e podem ser vistos na Bíblia e no Alcorão (HENRIQUES, 2004). Naquela época já eram

conhecidos os benefícios dessa matéria-prima no processo de reparação de feridas, promovendo a absorção do edema, limpeza da contaminação, epitelização do tecido enfermo e redução de odores desagradáveis. Em tempos mais modernos, foram encontrados relatos do seu uso durante a 1ª Guerra Mundial, no tratamento de feridas em soldados russos (AMÉNDOLA, 2003).

Os registros da utilização do mel como medicamento, apontam a sua utilização no tratamento de várias condições patológicas que vão desde as anemias, úlceras de estômago, feridas, queimaduras, a problemas oftalmológicos (HENRIQUES, 2004). Popularmente, ao mel ainda se atribuem propriedades como emoliente, antiputrefante, digestiva, laxativa e diurética (VERÍSSIMO, 1987).

Com a descoberta dos antibióticos no início do século XX, a utilização do mel como medicamento, baseada em princípios empíricos e sem bases científicas concretas, foi em parte remetida à medicina tradicional, mantendo-se apenas como traço cultural em algumas comunidades (HENRIQUES, 2004).

Nas últimas décadas, o uso indiscriminado de antimicrobianos tem resultado no aparecimento de linhagens de patógenos resistentes às mais variadas classes de antibióticos (GONÇALVES et al., 2005). Diante disso, a comunidade médica tem voltada a atenção para uma reavaliação terapêutica de antigos medicamentos, incluindo o mel, que é apontado como um coadjuvante tópico em queimaduras e ferimentos devido às suas propriedades antissépticas e cicatrizantes (MOLAN, 2001; EFEM et al. 1992; JAMES et al., 1972). Segundo a literatura especializada (TONKS et al., 2003; SUBRAHMANYAM, 1991; ZUMLA e LULAT, 1989; EFEM, 1988), o mel age de duas maneiras simultâneas: protege a lesão contra micro-organismos e estimula a recuperação do tecido enfermo, promovendo a cicatrização.

Estudos da atividade antimicrobiana do mel *in vitro* e *in vivo* foram realizados por vários autores como Cortopassi-Laurino e Gelly (1991); Allen et al. (1991); Molan e Russell (1988); Dustmann (1979); White et al. (1966); White e Subers (1963); Adcock (1962); e da sua atividade cicatrizante por Gupta et al. (1993), Efem (1988), Green (1988), Bergman et al. (1983). Adebolu (2005), Al-Waili et al. (2004), Molan (2001, 1992a, 1992b) e Efem (1992), estudaram a sua ação fungicida e a ação promotora da epitelização. Molan (1992a) concluiu que o mel pode inibir

aproximadamente 60 espécies de bactérias incluindo aeróbicas e anaeróbicas, Gram-positivas e Gram-negativas, algumas leveduras e espécies de fungos filamentosos como *Aspergillus* e *Penicillium*. Além disso, o mel mostrou-se eficaz contra bactérias resistentes a antibióticos como o *Staphylococcus aureus*, resistente à metilina (MRSA), e *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, dois dos principais agentes infecciosos de feridas e queimaduras. Foi capaz de inibir fungos, protozoários, inclusive vírus, em concentrações (entre 25 e 2%), passíveis de aplicação num contexto clínico (HENRIQUES, 2004).

Cooper et al. (1999) testando a sensibilidade de 58 cepas de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, isoladas de feridas infectadas, com uma mistura de méis e um mel de manuka, encontraram sensibilidade dos micro-organismos a ambas as amostras. Al-Waili (2004) afirma que o mel tem efeito positivo contra *Pseudomonas* mesmo se diluído 10 vezes pela exsudação da ferida, e que o mel de manuka é efetivo contra *Helicobacter pylori*. Diluído a 50%, este mel inibiu *Bacteroides* (gênero de bacilos Gram-negativos anaeróbios) isolados de infecção dentária, e a 40% foi capaz de inibir enteropatógenos e a produção de toxinas de *Candida albicans*. Puro, o mel foi capaz de inibir o crescimento da levedura.

Na Venezuela, Vit et al. (2004) compararam méis de *Melipona* spp. e *Apis mellifera* com o objetivo de avaliar suas propriedades no controle de cataratas, encontrando resultados positivos em ambos os casos.

Subrahmanyam (1992) e Greenwood (1993), testando a aplicação de mel de *Apis* em feridas que vão desde úlceras diabéticas e de pressão, a queimaduras, concluíram que o mel possui atividade antimicrobiana, desodorizante, e também indutora da rápida epitelização, promovendo a cicatrização de feridas crônicas que não responderam a terapias convencionais. Vardi et al. (1998) também verificaram que o mel de abelha é efetivo no tratamento de feridas cirúrgicas infectadas recalcitrantes ao tratamento antibiótico local sistêmico.

Molan (2001) em seu estudo tratou queimaduras em pele de porcos com mel e com açúcar. Aquelas tratadas com mel apresentaram menor número de colônias bacterianas, menos micropústulas na nova epiderme e menos micro-organismos nas escaras, quando comparadas àquelas tratadas com açúcar.

Al-Waili (2004) analisando méis *Apis* de Al-Theed, Emirados Árabes Unidos, *in vitro* e *in vivo*, encontrou forte atividade desses méis contra patógenos humanos comuns, Gram-positivos e Gram-negativos, inclusive contra a levedura *C. albicans*, causa comum de enfermidades de mucosas humanas. A aplicação tópica de mel *Apis* em feridas infectadas ou em conjuntivas erradicou a infecção bacteriana por *E. coli*, *S. aureus* e *Pseudomonas* spp., micro-organismos notoriamente resistentes a antibióticos e comuns em úlceras crônicas e queimaduras, diminuindo o tempo de restauração dos tecidos.

Namias (2003), em estudo com 59 pacientes portadores de feridas e úlceras persistentes, afirma que a terapia convencional falhou em 80% dos casos, em tratamentos que duraram de um mês a dois anos. Ele concluiu que feridas infectadas inicialmente por uma variedade de micro-organismos, tratadas com mel, ficaram livres da infecção em uma semana. Em 58 dos casos, a cura foi iniciada rapidamente, com redução de escaras e edemas, e rápida epitelização. Apenas uma úlcera não respondeu satisfatoriamente ao tratamento aplicado (15-20 mL de mel não diluído, diariamente, sobre a ferida limpa com solução salina), devido à presença de infecção por micobactéria, que não foi sensível ao mel.

As propriedades popularmente relatadas e estudos em modelos animais demonstraram que o mel reduz a inflamação (visto histologicamente) (MOLAN 2001), quando utilizado como agente tópico no tratamento de infecções cirúrgicas, queimaduras e feridas infectadas, parecendo acelerar a cura por epitelização da periferia da ferida (EFEM et al. 1992; JAMES et al., 1972). De acordo com Al-Waili (2004), lesões de pele tratadas com mel apresentam menos edema, menor infiltração de célula mononuclear, menos necrose, melhor contração da ferida, epitelização melhorada, e redução da concentração de glicosaminoglicano e proteoglicano. Segundo este autor, a aplicação tópica de mel natural é benéfica até no tratamento da gangrena genital de Fournier. Overgaauw (2005) afirma que o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) do mel reduz os neutrófilos e o tecido de infiltração, estimulando a angiogênese e a produção de fibroblatos e células epiteliais, importantes na reparação do dano ao tecido (BURDON, 1995). Segundo Molan (2001), o mel pode estimular a liberação de citocinas das células mononucleares e estimular a formação do tecido de granulação, com redução do odor e do inchaço do tecido enfermo. Molan (2005) cita, que a alta osmolaridade do mel atrai fluido linfático do tecido sob a

ferida, proporcionando assim uma boa oferta de enzima protease na interface entre a camada ferida e o tecido necrosado. Estudos em modelos animais demonstraram que o mel reduz a inflamação em queimaduras severas e superficiais e em feridas profundas (MOLAN, 2001). Pesquisas mostram que o mel em concentrações baixas como 0,1%, estimula a proliferação dos β -linfócitos e T-linfócitos em culturas de células do sangue, e a 1% induz monócitos a lançarem fatores de necrose tumoral alfa (α -TNF), e interleucinas, promovendo desta forma a resposta imune (ALVES et al., 2008; MOLAN, 2001).

Tonks et al. 2003, estudando o efeito de méis sobre a liberação de citocinas inflamatórias, fator de necrose tumoral alfa (α -TNF) e interleucinas (IL-1 β e IL-6) envolvidos no processo de cicatrização, incubou as amostras com a linha monocítica celular MonoMac-6 (MM6) a uma concentração de 1% (p/v) por 24h. Analisando o sobrenadante da cultura celular, estes mesmos autores verificaram um aumento dos fatores de cicatrização, sugerindo que a ação do mel na recuperação do tecido pode estar relacionada, em parte, ao estímulo das citocinas inflamatórias monocíticas produzido nas células.

Al-Waili (1999) relata que no pós-operatório de cesarianas e de histerectomias a aplicação tópica de mel acelera a cura da ferida, reduz a formação de cicatrizes além de prevenir o aparecimento de infecções bacterianas. Este autor afirma que o mel pode ser utilizado também no tratamento de dermatites, caspa e seborréia.

Característica intrínseca do mel, a atividade antimicrobiana é responsável por sua integridade por longos períodos (VARGAS, 2006). Por outro lado, méis produzidos de diferentes fontes florais (MOLAN 2001), processados e estocados de maneiras diferentes (AL-WAILI 2004) apresentam variação em sua atividade antimicrobiana.

Em várias partes do mundo, são encontrados méis de grande conceito na medicina popular. O mel de Manuka (*Leptospermum scoparium*) detém uma enorme reputação desde muito tempo na Nova Zelândia, bem como o *Leptospermum polygalifolium*, da Austrália, por suas propriedades antimicrobianas (WESTON, 2000b).

Por outro lado, Molan (2005) afirma, que nem todo mel de Manuka exibe atividade antibacteriana decorrente de fatores não peroxidantes, e que a bioatividade do citado mel é específica daquele produzido em “East Cape”, região norte da ilha. Hoje, é recomendado o mel do medronheiro (*Arbutus unedo*) da Sardenha (ilha italiana do mar Mediterrâneo) por suas propriedades terapêuticas, e na Índia e em Portugal o mel de lótus (*Nelumbium sceciosum*) é considerado a melhor opção para tratamento de infecção ocular; em Dubai (Emirados Árabes Unidos) e no Iêmen, o mel do “Jirdin Valley” é venerado por suas propriedades terapêuticas (WESTON, 2000b).

O mel de *Apis mellifera* tem sido objeto de pesquisas científicas em várias partes do mundo, mas, estudos sobre atividade antimicrobiana do mel de abelhas sociais da subfamília Meliponinae são escassos quando comparados a esses (GONÇALVES et al., 2005). Apesar disso, na América Latina, em vários países, méis de abelhas sem ferrão são usados inclusive para o tratamento de cataratas (VIT et al., 2004). Posey (1987) e Cortopassi-Laurino e Gelli (1991), afirmam que o mel de abelhas sem ferrão é utilizado em terapias populares, principalmente nas zonas rurais e entre indígenas, que acreditam que diferentes tipos de mel possuem propriedades curativas específicas, sendo empregados para a cura de várias doenças.

Torres et al. (2004) analisando *in vitro* méis de *Tetragonisca angustula* Illiger da Colômbia usado no tratamento de infecções oculares e respiratórias, e mel de *A. mellifera* de Berlim (Alemanha), contra *Bacillus brevis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *E. coli*, *Pseudomonas syringae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, e *Trichoderma viridae*, encontraram para os méis das duas origens, resultados positivos contra as bactérias, embora negativo contra as três espécies de fungos.

Também na conservação de tecidos, o mel tem sido utilizado desde a Antiguidade. Indígenas do Ceilão banhavam a carne de animais e esta se mantinha apta para o consumo por períodos de até um ano (IOIRISCH, 1981). Améndola et al. (2003), relatam que utilizaram o mel como conservante de pele para implante em 28 humanos, acometidos por queimaduras ou úlceras, com resultados satisfatórios em 90% dos casos. Abramov e Markicheva (1983) analisaram o resultado de ceroplastia

lamelar usando córnea conservada em mel, em 48 humanos acometidos de queimaduras oculares, úlceras corneanas e ceratites. Na maioria dos casos os resultados foram satisfatórios, com transparência das córneas e o material foi recomendado para uso clínico.

Apesar de ser o mel pouco utilizado como conservante de ossos, Mschividobadse (1978) obteve bons resultados utilizando em seres humanos, implantes alogênicos esterilizados através de formaldeído, conservados em solução contendo 50% de mel, e chegou à conclusão de que essa é uma forma de se obter um banco de ossos de alta qualidade.

As pesquisas e o número de artigos publicados sobre méis nas últimas décadas têm aumentado e estimulado a criação de empresas como a “Medihoney” (Austrália), voltadas para a comercialização de mel com alta atividade antimicrobiana, com financiamento de pesquisas relacionadas com testes clínicos (HENRIQUES, 2004). As descobertas têm contribuído para a regulamentação do mel para fins medicinais e na Nova Zelândia e Austrália, podem ser adquiridos em farmácias, produtos à base de mel com alta atividade antimicrobiana, que variam entre compressas, cremes para eczemas e cremes para úlceras (HENRIQUES, 2004).

Em 2004, no Reino Unido, foi aprovado o “*Advancis Medical*” (compressas impregnadas de mel) para o tratamento de feridas. Em alguns países como a França e a Itália, atualmente já pode ser encontrada produção de mel com objetivos terapêuticos específicos, como tratamentos de úlceras e problemas respiratórios (YANIV e RUDICH, 1996). Na Alemanha, o mel já foi adotado como prática oficial na rede pública de saúde (EMBRAPA, 2007).

No Brasil poucos registros de estudos a esse respeito foram encontrados. O Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia, São Paulo, usou o mel como tratamento de lesões de pele, com eficácia, o que configura um tratamento alternativo de baixo custo financeiro (MALAVAZZI et al., 2005).

Cortopassi-Laurino e Gelli (1991), Martins et al. (1997) e Gonnet et al. (1964) investigaram o potencial antibacteriano de méis de abelhas africanizadas e de

abelhas nativas brasileiras, onde foram observadas principalmente ações bacteriostáticas. Esses autores também detectaram que o resultado de inibição das amostras de mel de *A. mellifera* foi inferior ao das abelhas sem ferrão. Dentre estas, os méis das abelhas da tribo *Trigonini* foram melhores agentes antimicrobianos que da tribo *Meliponini*.

Mais recentemente, Camargo (2001) observou que o mel de *Lippia alba* produzido por *A. mellifera* foi ativo contra *S. aureus* e *E. coli*. Em 2003, Miorin et al. compararam a atividade frente a *S. aureus* de amostras de mel de *A. mellifera* e *Tetragonisca angustula*, coletadas em Minas Gerais e Paraná, não encontrando diferença significativa entre os méis produzidos por essas espécies. Vargas (2006) analisando 80 amostras de méis dos Campos Gerais, Paraná, encontrou atividade antimicrobiana contra *E. coli* e mais expressivamente contra *S. aureus*.

2.3 FATORES ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE BIOLÓGICA

As características físico-químicas dos componentes do mel determinam a sua qualidade. A sua ação antimicrobiana naturalmente, é resultado dessa constituição e assim, o estudo desses parâmetros se torna importante para a compreensão e aproveitamento dessa atividade biológica.

Autores como Wahdan (1998) e Molan (1992b) apontam a sinergia entre fatores físicos como a alta osmolaridade, e fatores químicos relacionados ao pH, à presença de substâncias inibidoras como o peróxido de hidrogênio (BOGDANOV et al. 2004), e ácidos (BOGDANOV 1997), como promotores da atividade biológica do mel. Estes fatores auxiliam no mecanismo bioquímico da cicatrização, e junto a substâncias do metabolismo secundário das plantas como flavonóides (SABATIER et al. 1992) e ácidos fenólicos (WESTON et al. 2000), podem ser responsáveis pela atividade antimicrobiana do mel e a cicatrização de ferimentos (WILKINSON, 2005; EFEM, 1988). Sato e Miyata (2000) relatam que a atividade antimicrobiana do mel talvez seja o efeito medicinal mais evidente, e que vários fatores associados podem ser responsáveis por tal atividade.

2.3.1 Atividade Osmótica e Atividade de Água (aW)

No controle do desenvolvimento microbiano, a temperatura e a concentração de oxigênio entre outros fatores, são determinantes, contudo, a pressão osmótica é também uma condição física importante quando esse crescimento é analisado (PELCZAR, 1997).

A pressão osmótica é a força com a qual se move uma solução contendo uma baixa concentração de substâncias dissolvidas (solutos) através da membrana citoplasmática, para outra contendo uma alta concentração de solutos. Quando células microbianas estão em meio aquoso, grandes diferenças na concentração de solução dentro ou fora destas, poderão levá-las ao rompimento ou desidratação e conseqüentemente à morte (LIEBER, 2002). Em uma solução isotônica, o fluxo de água está em equilíbrio e a célula cresce normalmente. Entretanto, quando o meio externo é hipertônico (com uma concentração de solutos mais alta do que no citoplasma da célula, esta perde água (plasmólise) e tem seu crescimento inibido devido à diminuição da membrana plasmática. A importância deste fenômeno está na inibição do crescimento da célula quando a membrana plasmática se separa da parede celular (PRESCOTT et al., 2002; BLACK, 2000). Este fato faz com que o poder osmótico do mel seja apontado como um fator antimicrobiano, devido à sua alta concentração de açúcares (WAHDAN, 1998).

Segundo Jeddar (1985), a atividade antimicrobiana do mel ocorre devido a seu alto valor de gradiente osmótico que o faz agir, tanto como bactericida quanto como bacteriostático, atuando na ferida como barreira viscosa que impede a entrada de substâncias e a perda de fluidos para o meio externo (POSTMES, 1993).

O mel possui baixo teor de água e esta, nos produtos biológicos ocorre como H₂O ligada e H₂O livre, resultando em umidade (conteúdo total de água). A água ligada apresenta conexão íntima com as moléculas constituintes do produto, não podendo ser removida ou utilizada para qualquer tipo de reação; a água livre, disponível para as reações físicas (evaporação), químicas (escurecimento) e microbiológicas (fermentação), torna-se então a principal responsável pela deterioração do produto (HOFFMANN, 2001).

Hoffmann (2001) afirma que o valor absoluto da atividade de água (aW), ou seja, o conteúdo de água livre, é a única forma de água utilizável por micro-organismos. A velocidade das reações químicas está diretamente ligada à quantidade de H₂O livre em um meio, e à concentração dos compostos e enzimas envolvidos. A medida do teor de água pode ser expressa como a razão entre a pressão de vapor de água do substrato (p) e a pressão de vapor da água pura (p_o) sob uma mesma temperatura. Então, $aW = p/p_o$ (HOFFMANN, 2001).

De modo geral, as bactérias são mais exigentes quanto à disponibilidade de água que as leveduras e os fungos filamentosos, que se destacam pela tolerância à baixa atividade de água. A maioria das bactérias se desenvolve em aW mínima entre 0,91 a 0,88; as leveduras em 0,88 e os fungos filamentosos em 0,80 (HOFFMANN, 2001). Segundo o *Microbial Ecology of Foods* (1980), o desenvolvimento da maioria das bactérias e fungos filamentosos estão restritos a valores de aW acima de 0,900 e, abaixo de 0,600 os micro-organismos não se multiplicam, embora possam permanecer viáveis por um tempo prolongado.

A propriedade antimicrobiana do mel foi reconhecida por primeira vez em 1892 através de van Ketel e foi assumido nesta oportunidade, que isto era devido ao efeito osmótico do seu alto conteúdo de açúcar (MOLAN, 2001).

A aW do mel é de modo geral baixa, mas, comparando-se valores da aW dos méis de abelhas africanizadas com os méis de abelhas nativas encontrados na literatura, pode-se observar que os últimos apresentam valores mais altos, e ainda assim apresentam atividade biológica. Segundo Gonçalves et al. (2005), ao se comparar a atividade antimicrobiana de diferentes méis de *A. mellifera* frente aos micro-organismos sensíveis ao mel de abelhas nativas, constata-se que estes apresentam atividade nitidamente superior.

O teor de água no mel comumente entre 15% a 21% em peso, e a forte interação das moléculas de açúcar com as moléculas de água, diminui a disponibilidade dessas moléculas para os micro-organismos (ZUMLA E LULAT 1989), contribuindo para o rompimento da parede da célula bacteriana (MOLAN, 1992a).

2.3.2 Cor

A cor é uma propriedade ótica do mel, sendo o resultado de diferentes graus de absorção da luz de vários comprimentos de onda, pelos constituintes do mel (BIANCHI, 1981). O mel puro deve apresentar aspecto líquido, denso, viscoso e translúcido, e sua cor poderá variar do amarelo ao amarelo-avermelhado, com cheiro próprio, sabor doce e característico (CATALÁN, 1981). Crane (1987) afirma que a cor do mel líquido pode variar do branco-aquoso a quase preto, com variantes matizes de verde ou vermelho, ou mesmo azul, segundo a sua origem floral.

Alguns fatores podem determinar a cor do mel, como variações no clima durante o fluxo do néctar, a temperatura de amadurecimento na colméia e o processamento (ARRUDA, 2003). A luz, o calor, o tempo de estocagem e as possíveis reações enzimáticas, além dos teores de glicose, frutose, nitrogênio e aminoácidos livres, substâncias polifenólicas, sais de ferro e minerais em geral (ARRUDA 2003), e o teor de hidroximetilfurfural, são apontados como fatores determinantes da cor do mel (CRANE, 1987).

Aristóteles (384-322 AC) se referia aos méis claros como "bons como um bálsamo para olhos doloridos e para ferimentos". Dioscorides (50 DC) tinha preferência pelo mel amarelo claro de *Attica* (WESTON, 2000).

A grande variação na cor dos méis brasileiros direciona a preferência do consumidor (MARCHINI et al., 2005). Em São Paulo, os méis de flores de laranjeira são bastante procurados, não só por seu sabor suave, mas também por sua cor clara (KOMATZU et al., 2002). No mercado internacional, o mel é avaliado por sua cor, e méis claros alcançam melhores preços que os escuros (CRANE, 1987). Este parâmetro é tão importante, que no *International Trade Forum* (publicação que analisa e noticia o comércio internacional de mel) de 1979, a cor foi considerada como uma das características do mel, de particular relevância no mercado internacional (CRANE, 1987).

2.3.3 pH

O pH não é um parâmetro obrigatório no controle de qualidade de méis brasileiros (BRASIL, 2000), mas tem grande utilidade como variável auxiliar na avaliação da qualidade pelo fato de medir diretamente a acidez livre $[H_3O^+]$, e por sua atuação na atividade antimicrobiana. Geralmente os méis são ácidos, com valores de pH que podem atingir até 2,3 (ARRUDA, 2003).

Noronha (1997) afirma que associações de espécies vegetais e o pH do solo, podem influenciar o pH do mel. Segundo Seemann e Neira (1988), este parâmetro pode sofrer influência da origem floral, pela concentração de vários ácidos e ainda da concentração de diferentes minerais como cálcio, sódio e potássio, constituintes da cinza. O pH depende dos íons hidrogênio presentes na solução (Vidal e Fregosi 1984), podendo ser influenciado pelo pH do néctar, do solo ou de substâncias acrescentadas pelas abelhas ao néctar (enzimas) no transporte até a colméia (SOUZA e BAZLEN, 1998; CORNEJO, 1988; CRANE, 1987).

O mel promove a angiogênese, atuando na produção do tecido de granulação e epitelial, pois o peróxido de hidrogênio (formado pela ação da enzima peroxidase) estimula o crescimento de fibroblastos. Além disso, baixos valores de pH e maior angiogênese, liberam oxigênio que contribui na regeneração dos tecidos. A neutralização de odores é resultado da inibição das bactérias presentes no fermento, pois o volume de detritos é também reduzido. Além disso, uma vez aplicado o mel, as bactérias passam a utilizar os seus açúcares gerando o ácido lático que é inodoro (OVERGAAUW, 2006).

2.3.4 Acidez

A acidez do mel é decorrente da presença de ácidos orgânicos, que podem auxiliar na sua preservação frente aos micro-organismos (CRANE, 1987).

Os ácidos orgânicos ocorrem no mel em concentrações variadas e dependem das fontes de néctar (ROOT 1995), do teor da enzima glicose-oxidase (HORN 1996; WHITE 1975), da presença de leveduras osmofílicas e de minerais (WHITE JR., 1989). Perfazem apenas 0,5% dos sólidos, mas apresentam efeito determinante no *flavor*, contribuindo com a grande estabilidade do mel frente à deterioração (CRANE, 1987). Vários ácidos orgânicos do mel são citados na literatura, como ácido acético, butírico, láctico, oxálico, fórmico, succínico, glicólico, butírico, tartárico, maléico, piroglutâmico, alfa-cetoglutárico, 2- ou 3-fosfoglicérico, alfa- ou beta-glicerofosfato e vínico, benzóico, isovalérico, málico, fenilacético e propiônico, embora o ácido glicônico esteja presente em maior quantidade (SEEMANN e NEIRA, 1988; CRANE, 1987; MENDES e COELHO, 1983; WHITE, 1975).

O teor de ácido glicônico relaciona-se com as reações enzimáticas que ocorrem durante o processo de amadurecimento. Dessa maneira, a acidez do mel está fortemente relacionada ao teor do monossacarídeo D-glicose e conseqüentemente aos teores de sacarose no néctar e à quantidade da enzima glicose-oxidase adicionada pela abelha (MOREIRA e DE MARIA, 2001).

Autores como D'Arcy (2005), Moreira e De Maria (2001) e Anklam (1998), reforçam que a acidez do mel é devida à presença de ácidos orgânicos, principalmente glicônico, pirúvico, málico e cítrico, em equilíbrio com lactonas ou ésteres e íons como o fosfato e cloreto.

O ácido glicônico constitui 70 a 90% dos ácidos orgânicos, e a acidez do mel constitui um importante critério de qualidade por contribuir para a sua estabilidade frente a micro-organismos (SODRÉ, 2000; CRANE, 1987).

Crane (1987) sugere que os ácidos podem estar presentes no néctar, mas foi constatado que alguns ácidos aromáticos encontrados no mel monofloral de Manuka (*Leptospermum scoparium*) não estavam presentes no néctar de suas flores (TAN et al., 1988). Os méis de Manuka e de Viperina (*Echium vulgare*), apresentam alta atividade antimicrobiana, podendo essa atividade estar relacionada com a presença de alguns tipos de ácido (WILKINS et al., 1995). Autores como Uñates et al., (1999); Andrade et al., (1999); Carvalho et al., (1998); Mendes, (1998); Rendón, (1996); Perez et al., (1990); Cornejo, (1988) e Butta et al. (1983), analisando méis de várias

origens encontraram valores que variaram de 8,20 meq.Kg⁻¹ a 62,50 meq.Kg⁻¹; a norma nacional e as internacionais em vigor prescrevem um máximo de 50,0 meq.Kg⁻¹ para acidez.

Quanto ao modo de ação, Rossel (2007) afirma que apenas a forma não dissociada dos ácidos penetra na célula do micro-organismo por difusão, onde, devido ao maior pH intracelular se dissocia (teoria do desacoplamento). A diminuição do pH deve ser compensada por uma ATPase de membrana que bombeia prótons para fora da célula às expensas da hidrólise de ATP. A menor quantidade de ATP disponível para a formação de biomassa celular comprometeria o crescimento da célula microbiana. Quando a concentração de ácido é alta, e a capacidade de bombeio de prótons é superada, a acidificação do citoplasma leva à morte celular.

Rossel (2007) propõe também o acúmulo intracelular de ânions como outro mecanismo para explicar o efeito inibitório dos ácidos. Segundo esta teoria, enquanto os prótons são excretados ao exterior estes íons são capturados na célula. A inibição poderia estar relacionada com o acúmulo e a toxicidade do ânion. Embora não esteja completamente elucidado o mecanismo de inibição dos ácidos alifáticos, o efeito tóxico destes compostos pode dever-se tanto ao desacoplamento como ao efeito inibitório do acúmulo de ânions. Ademais, este autor cita que os ácidos alifáticos de cadeia curta podem por inserção, apresentar também um efeito direto sobre a integridade da membrana, alterando a sua estrutura e hidrofobicidade, produzindo aumento de permeabilidade, com redução da eficiência como barreira seletiva.

2.3.5 Peróxido de Hidrogênio

Um componente de extrema importância na composição do mel e sua atividade antimicrobiana, além dos açúcares, são as enzimas, mais especificamente a glicose-oxidase e a catalase.

A catalase presente no mel se origina do pólen da flor, e sua quantidade no mel depende da fonte floral e da quantidade de pólen coletado pelas abelhas (WESTON, 2000). A glicose-oxidase é produzida pelas glândulas hipofaríngeas das abelhas e incorporada ao néctar durante a sua retirada das plantas. Nos favos das colméias, em presença da água (do néctar) e oxigênio, esta enzima que é mais ativa em soluções diluídas, produz gliconolactona (ácido glicônico) e peróxido de hidrogênio (FIGURA 1), que preservam o mel imaturo até que a concentração dos açúcares alcance seu ponto ótimo (MENDES e COELHO, 1983; CRANE, 1987; SCHEPARTZ e SUBERS 1966).

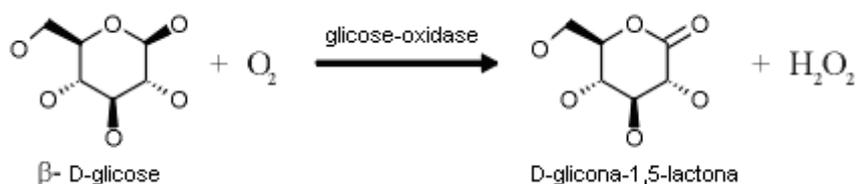


FIGURA 1 – Oxidação da β-D-glicose em presença de glicose-oxidase e oxigênio molecular com produção do ácido Glicônico e Peróxido de Hidrogênio (BROVO, 1998)

O peróxido de hidrogênio é a principal substância antibacteriana do mel (WHITE et al., 1963), e sua quantidade está relacionada aos níveis de glicose-oxidase (que atua sobre a glicose) e de catalase que, originária do pólen e difundida no mel, têm a capacidade de quebrar a molécula de H₂O₂ em O₂ e H₂O (WESTON, 2000). Conseqüentemente, diferenças na atividade antimicrobiana entre méis de várias fontes florais podem ser devidas também a essas variações.

A atuação de peróxido de hidrogênio como fator antimicrobiano foi registrada em estudo onde, mesmo diluído de 7 a 14 vezes, quando a sua osmolaridade deixou de ser inibitória, a atividade antimicrobiana esteve presente no mel (COOPER et al., 1999). A explicação para este fato veio da descoberta de que a glicose-oxidase do mel produz peróxido de hidrogênio quando o mel é diluído. Inicialmente este agente foi chamado de “inibina” sendo depois identificado como peróxido de hidrogênio. O termo “número de inibina” foi estabelecido como uma medida da potência antimicrobiana relativa de diferentes méis, ou seja, o número de vezes as quais um mel poderia ser diluído e ainda inibir o crescimento bacteriano (MOLAN, 2001).

A ação antimicrobiana do peróxido de hidrogênio baseia-se em que este produz o radical oxidante hidroxila ($\bullet\text{OH}$), capaz de retirar um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular e iniciar a peroxidação lipídica. O acúmulo de hidroperóxidos resultante danifica a estrutura e inviabiliza a função protetora da membrana (WELCH et al., 2002). Além disso, o H_2O_2 é capaz de atravessar a membrana nuclear (eucariotos) e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (ANDERSON, 1996).

Usado em fermentos, a produção de peróxido de hidrogênio só é ativada quando o mel é diluído pelo exsudado, e então o H_2O_2 é liberado lentamente, em concentrações muitas vezes inferiores (1 mMol.L^{-1}) às utilizadas convencionalmente em hospitais (3%), o que facilita o tratamento pois não lesa os tecidos (HENRIQUES, 2004; MOLAN, 1999). Além disso, o efeito nocivo do H_2O_2 do mel é reduzido no tecido enfermo, porque seus compostos antioxidantes retêm e inativam o ferro que catalisa a formação do radical livre produzido pelo peróxido, ajudando na diminuição deste componente oxidante (MOLAN, 2001). Da mesma forma, embora apenas pequena quantidade de ferro seja necessária para o desenvolvimento microbiano, a sua indisponibilidade inviabiliza o crescimento do micro-organismo (BLACK, 2000).

Por outro lado, analisando a ação do H_2O_2 e dos compostos fenólicos, Weston (2000) concluiu que os flavonóides encontrados no mel eram derivados da própolis; e que os flavonóides da própolis, apresentaram baixa atividade antimicrobiana. Considerando que o teor de flavonóides é 1000 vezes maior na própolis que no mel (MOLAN 2001), chegou-se à conclusão que os compostos fenólicos encontrados (ácido benzóico, cinâmico e flavonóides) contribuiriam de forma minoritária para a atividade antimicrobiana do mel, se comparada à do peróxido de hidrogênio. Weston (2000) afirma que a reação entre o peróxido de hidrogênio e o ácido benzóico pode criar peroxiácidos, mais estáveis que o peróxido de hidrogênio. Esses ácidos escapam da destruição quando catalase é adicionada à solução de mel, antes do teste antibacteriano, devido à seletividade da catalase, que é específica para o peróxido de hidrogênio, e não destrói alquilperóxidos ou ácidos peroxicarboxílicos. Estes compostos, em pH baixo, são agentes antimicrobianos ainda mais poderosos que o H_2O_2 , fato que poderia ter compensado o baixo teor de ácidos carboxílicos no mel, em seu experimento. Segundo Molan (2001), Cooper et al. (1999) e Allen et al. (1991), a maior evidência da existência de fatores antimicrobianos não peróxidos em

mel, está relatada em estudos onde a atividade dos méis tratados com catalase para remover o peróxido de hidrogênio se mantém.

Segundo Bogdanov (2004) e Taormina et al. (2001), a atividade antimicrobiana do mel pode ser atribuída ao peróxido de hidrogênio, e a compostos fenólicos (SABATIER et al. 1992), de modo que a capacidade letal e inibidora deste sobre micro-organismos pode variar de acordo com a fonte floral do néctar (TURKMEN et al., 2006; AL-MAMARY, 2002; SATO, 2000; CORTOPASSI-LAURINO e GELLI, 1984).

2.3.6 Compostos Fenólicos

Junto às características de cada espécie de abelha, as plantas contribuem com as variações na composição do mel, na medida em que oferecem recursos florais diferenciados para o forrageamento (SANTOS 2006).

Entre as substâncias reportadas no mel encontram-se os compostos fenólicos, produzidos pelo metabolismo secundário das plantas (BOGDANOV, 2004). Dentre eles, os flavonóides encontrados em frutas, vegetais, castanhas, sementes, talos e flores, especialmente no chá, vinho, própolis e mel de abelhas, constituem um grupo de substâncias naturais com atividades biológicas diversas (PETERSON E DWYER, 1998). Nas folhas, acredita-se que a função desses compostos é promover a sobrevivência fisiológica da planta, protegendo-a de patógenos (bactérias, fungos e vírus), insetos e outros animais herbívoros, e radiação UV.

De acordo com Marcucci et al. (1998), os flavonóides atuam também em relacionamentos harmônicos entre plantas e insetos, atraindo e orientando através da cor esses animais até o néctar, contribuindo para a polinização.

Os compostos fenólicos vêm sendo objetos de pesquisas e reportados como possuidores de importantes propriedades, incluindo atividade anti-inflamatória, estrogênica, inibidora enzimática e antimicrobiana, além de antitumoral (CUSHINE,

2005). Nos alimentos, estes compostos têm papel importante na saúde humana como preventivo de câncer e como anti-inflamatório, limpando o organismo com a emissão de radicais antioxidantes. As classes mais importantes desses compostos são os flavonóides e os ácidos fenólicos, responsáveis pelas características antioxidantes dos alimentos de origem vegetal (D'ARCY, 2005).

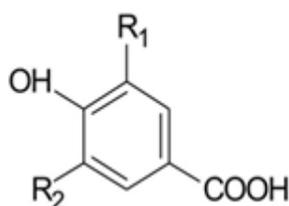
Os antioxidantes fenólicos são conhecidos pela capacidade de inibir o crescimento de várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (TAORMINA, 2001), e a própolis tem sido considerada como a principal fonte de compostos fenólicos presentes no mel. Alencar (2002) afirma, no entanto, que amostras de mel produzidas em diferentes regiões brasileiras mostraram um perfil cromatográfico totalmente diferente das amostras de própolis da mesma colméia de origem.

Os flavonóides atuam como antioxidantes na inativação dos radicais livres nos compartimentos lipofílico e hidrofílico das células e têm a capacidade de doar átomos de hidrogênio e, portanto inibir as reações em cadeia provocadas por aqueles radicais (ARORA et al., 1998; HARTMAN et al., 1990).

Nos hidrolisados dos materiais lignocelulósicos, compostos aromáticos de baixa massa molecular têm sido encontrados, e dentre os inibidores são os que têm mostrado maior toxicidade para os micro-organismos. A ação desses derivados fenólicos sobre procariotos como *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli* tem sido estudada, e embora o mecanismo de inibição ainda não esteja completamente elucidado, Rossel (2003) afirma, que a toxidez dos aldeídos aromáticos pode basear-se em mecanismos semelhantes aos dos ácidos alifáticos, e estar relacionada à interação com zonas hidrofóbicas específicas das células, modificando a integridade da membrana, reduzindo a sua capacidade de agir como barreira seletiva. Carpes (2008) complementa que além do efeito sobre as membranas, a ação antimicrobiana promovida por esses compostos tem relação com a inativação de enzimas celulares.

A molécula de um ácido fenólico apresenta um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila, responsáveis pela capacidade antioxidante desses compostos, que estão separados em dois grupos: derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico (ANGELO, 2007).

Entre os ácidos hidroxibenzoicos estão os ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e siríngico, que têm estrutura comum C6–C1(FIGURA 2), enquanto os ácidos hidroxicinâmicos (FIGURA 3), apresentam uma cadeia lateral de três carbonos (C6–C3), como o ácido caféico, ferúlico, p-cumárico e sináptico, entre outros (ANGELO, 2007).



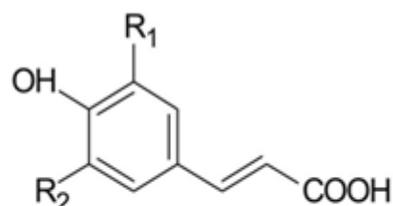
Ácido p-hidroxibenzoico: $R_1 = R_2 = H$

Ácido protocatecuico: $R_1 = OH, R_2 = H$

Ácido vanílico: $R_1 = OCH_3, R_2 = H$

Ácido siríngico: $R_1 = R_2 = OCH_3$

FIGURA 2- Estrutura química dos ácidos hidroxibenzoicos



Ácido p-cumárico: $R_1 = R_2 = H$

Ácido caféico: $R_1 = OH, R_2 = H$

Ácido ferúlico: $R_1 = OCH_3, R_2 = H$

FIGURA 3- Estrutura química dos ácidos hidroxicinâmicos

Flavonóides são compostos fenólicos de baixo peso molecular e de acordo com Sivam (2002), derivados do 1,3-difenilpropano. Têm como base um núcleo flavana, constituído de 15 carbonos dispostos em configuração C6-C3-C6 (ALENCAR, 2002). Como mostrado na FIGURA 4, nessas moléculas os dois anéis C6 são necessariamente aromáticos (anéis A e B), conectados por uma ponte de três carbonos (anel C) contendo geralmente um átomo de oxigênio (ADELMANN, 2005).

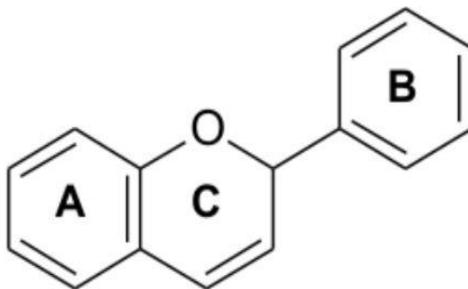


FIGURA 4 - Núcleo básico dos flavonóides composto por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C)

Variações em substituição do anel C resultam em importantes classes de flavonóides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas. Substituições dos anéis A e B como oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides (ANGELO, 2007).

A atividade bioquímica dos flavonóides e dos seus metabólitos depende da sua estrutura química e da orientação relativa das partes da molécula (COOK e SAMMAN, 1976). De acordo com Peterson e Dwyer (1998), dentre os compostos fenólicos, os derivados simples e os flavonóides são os mais comuns, e mais extensamente distribuídos grupos de substâncias no reino vegetal.

Quase todos são pigmentos (incluem a região de UV) e as cores do espectro representadas nos flavonóides, estão associadas a alguma das suas funções biológicas importantes; assim, as suas propriedades eletrônicas aparecem não só na captura e transferência de energia, mas também na seletividade biológica (HAVSTEEN, 2002).

Os flavonóides apresentam espectros de absorção característicos no ultravioleta, determinados pelo núcleo comum benzopirona, com dois máximos de absorção, que ocorrem entre 240-285 nm (banda II) e entre 300-400 nm (banda I). De modo geral, se considera que a banda II está ligada à existência do anel A e a banda I devido ao anel B (FIGURA 4) (ADELMANN, 2005).

A cor do mel sofre influência da composição e da quantidade dos compostos fenólicos, e a cor escura tem sido apontada como indicativo de maior quantidade de ácidos fenólicos derivativos, porém menor teor de flavonóides (AMIOT et al., 1989).

Dentre os flavonóides presentes no mel, Park et al. (2002b) demonstraram a presença de apigenina, crisina, canferide e canferol. Também foram encontrados os ácidos benzóico e cinâmico (WESTON et al., 1999), e os flavonóides rutina (LIANDA et al., 2006), canferol (FERRERES et al., 1998), galangina e crisina, (SABATIER et al., 1992), pinobanksina (RIBEIRO-CAMPOS et al., 1990), e a flavanona pinocembrina que, segundo Berahia et al. (1993), possui atividade antimicrobiana.

Várias pesquisas (TOMÁS-BARBERÁN et al., 2001; MARTOS et al., 2000; FERRERES et al., 1998, 1992, 1991; SABATIER et al., 1992 e AMIOT et al., 1989) sugerem que a origem geográfica e botânica, e a autenticidade de cada tipo de mel do mel pode ser determinada a partir do seu perfil fenólico.

2.4 MICRO-ORGANISMOS

Os micro-organismos utilizados nesta pesquisa foram selecionados para os testes de atividade antimicrobiana baseados em dados de literatura e na importância que apresentam como patógenos humanos comuns nas infecções hospitalares. *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* são micro-organismos comumente encontrados em feridas infectadas em úlceras crônicas e queimaduras, e em doenças infecciosas de mucosas (AL-WAILI, 2004).

A *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa que tem como habitat natural o intestino e, juntamente com a Gram-positiva *S. aureus*, é o mais comum parasita do homem. A *E. coli* é causa importante de gastroenterites e infecção do trato urinário (ITU), e a causa mais frequente (cerca de 80% dos casos) desta afecção em mulheres jovens, podendo complicar em pielonefrite. É apontada como responsável por colecistite, apendicite e peritonite, e se a parede intestinal ou do trato urinário é perfurada, a mortalidade é alta. A maioria dos casos de meningite em neonatos é causada por *E. coli* e estas são também responsáveis por infecções de feridas e

septicemia, frequentemente fatal em 15% dos casos contra 20% por *S. aureus* (TODAR, 2004).

A bactéria Gram-positiva *S. aureus* é a espécie mais virulenta do seu gênero. Cerca de 15% dos indivíduos são portadores desse micro-organismo, na pele ou nasofaringe. A infecção por essa bactéria Gram-positiva, se dá frequentemente por pequenos cortes na pele, com a produção de toxinas, secretadas ou expostas à superfície pela bactéria cuja actividade é destrutiva para as células humanas. Complicações produzidas por *S. aureus* são, por exemplo, impetigo, endocardite, osteomielite, pneumonia entre outras (KLUYTMANS, 1997).

O uso extensivo de antibióticos tem resultado em um aumento na resistência de *S. aureus* em isolados clínicos. Em determinadas situações, mais de 95% das infecções por *S. aureus* são devido a cepas resistentes à penicilina ou ampicilina, e mais de 50% apresentam resistência à meticilina, uma das alternativas mais recentes para o tratamento de infecções por este organismo (FATTOM et al., 2004). Haddad et al. (2000) observaram em seu estudo que o *S. aureus* apareceu em 60% dos casos tratados, sendo considerado, ao lado da *Escherichia coli*, como os grandes responsáveis pelo processo infeccioso.

A *P. aeruginosa*, bactéria Gram-negativa aeróbica, de grande incidência hospitalar, se apresenta como um patógeno oportunista, uma vez que causa doença em indivíduos imunocomprometidos (MURRAY et al., 2000). Este micro-organismo tem sido associado a uma ampla variedade de infecções resultando, muitas vezes, em septicemia fatal (SILVA, 1999). É apontado como o responsável por infecções urinárias, respiratórias, de mucosas, de medula e articulações, infecções intestinais, dermatites e septicemia (TODAR, 2004).

Segundo o CDC (Centers for Disease Control and Prevention- Atlanta), a incidência global de infecções em hospitais por *P. aeruginosa* nos Estados Unidos alcança 0,4%; este micro-organismo é a quarta bactéria mais comumente encontrada, representando 10 % das infecções hospitalares adquiridas (TODAR, 2004).

De natureza eucariótica, a levedura *C. albicans* é um fungo dimórfico e importante agente patogênico para o homem, existindo como comensal em pelo

menos 50% da população humana; está entre as leveduras que causam infecção invasiva, e embora mais comumente infecte pele e mucosas, ela pode causar infecções sistêmicas como pneumonia, septicemia e endocardites em pacientes imunodeprimidos. Está implicada em mais de 50% de todas as infecções fúngicas e constitui o quarto agente de septicemia nos hospitais ocidentais, com elevada morbidade (entre 30 e 50%) (RODRIGUES et al., 2009).

Pesquisa realizada por Sader et al. (2001) em 12 hospitais brasileiros situados em quatro estados diferentes, mostrou que os micro-organismos patogênicos de maior incidência isolados naqueles nosocômios, foram *S. aureus* (22,8%), *E. coli* (13%) e *P. aeruginosa* (13,3%). Também é importante ressaltar que nas últimas décadas, as infecções fúngicas ganharam importância como causas de complicações hospitalares, mormente em pacientes imunocomprometidos (MIRANDA et al., 2003).

REFERÊNCIAS

ABRAMOV, V. G., MARKICHEVA, N. A., Therapeutic lamellar keratoplasty with honey preserved material, **Oftalmologicheskii Zhurnal**, Odesa, v. 38, n. 2, p. 81-83, 1983.

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

ADEBOLU T. T., Effect of natural honey on local isolates of diarrheacausing bacteria in southwestern Nigeria, **African Journal of Biotechnology**, Nigeria, v.4, n.1, p.1172-1174, 2005.

ADELMANN, J., Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) **Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, PR, 186 ff., 2005.

ALCOFORADO-FILHO, F. G., GONÇALVES, J. C., Flora apícola e mel orgânico. In: VIVLEA, S. L. de O. (org.). **Cadeia Produtiva do mel no Estado do Piauí**, Teresina: **Embrapa Meio-Norte**, p.48-59, 2000.

ALENCAR, S. M., Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil, **Tese** (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, **Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, SP, 120 ff., 2002.

ALLEN, K. L., MOLAN, P. C., REID, G. M. A., Survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Arlington, v.43, p.817-822, 1991.

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

ALVES, D. F. S.; CABRAL JÚNIOR, F. C.; CABRAL, P. P. A. C.; OLIVEIRA JUNIOR, R. M. ; REGO, A. C. M.; MEDEIROS, A. C., Effects of topical application of the honey of *Melipona subnitida* in infected wounds of rats, **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 35 n. 3, ISSN 0100-6991, Rio de Janeiro, 2008.

AL-WAILI, N. S., Investigating the antimicrobial activity of natural honey and its effects on the pathogenic bacterial infections of surgical wounds and conjunctiva. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 7, n. 2, p. 210-222, 2004.

L-WAILI, N. S., Effects of topical honey on post-operative wound infections due to gram-positive and gram-negative bacteria following cesarean section and hysterectomies, **European Journal of Medical Research**, Sanaa, Yemen, n. 4, p. 126–30, 1999.

AMÉNDOLA, G. F., ILHA, M.; BERGER, R., STEDILE, R.; SCHOSSLER, J. E., Correção de defeito ósseo femural em cães utilizando implante cortical homólogo conservado em mel, **Acta Cirúrgica Brasileira**, Santa Maria, RS, v.18, n.4, p. 302-307, 2003.

AMIOT, M. J.; AUBERT, S.; GONNET, M.; TACCHINI, M., Les composés phénoliques des miels: étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles, **Apidologie**, Saint-Paul, France v.20, p.115-125, 1989.

ANDRADE SILVA. R. C. P. de ; PEIXE, B. C. S., Estudo da Cadeia Produtiva do Mel no Contexto da Apicultura Paranaense – Uma Contribuição para a Identificação de Políticas Públicas Prioritárias, **SEAB/ UFPR**, Paraná, 29 pp. Disponível em:http://www.repositorio.seap.pr.gov.br/arquivos/File/anais/painel_agricultura/estudo_da_cadeia.pdf. Acesso: jul./2008.

ANDERSON, D., Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage, **Mutation Research**, Amsterdam, Netherlands, v. 350, n.1, p. 103-108, 1996.

ANDRADE, P. B.; AMARAL, M. T.; ISABEL, P., CARVALHO, J.C.M.F.; SEABRA, R.M.; PROENÇA DA CUNHA, A., Physicochemical attributes and pollen spectrum of Portuguese heather honeys, **Food Chemistry**, Oxon, v.66, n.4, p.503-510, 1999.

ANGELO, P. M. ; JORGE, N., Phenolic compounds in foods – A brief review, **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São José do Rio Preto/SP, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

ANKLAM, E., A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey, **Food Chemistry**, Ispra, Italy, v. 63, n.4, p. 549–562, 1998.

APACAME, 2007a, EUA compram a maior parte da produção **Diário Catarinense**, Disponível em: <webapacame@terra.com.br> Acesso em: Fev.2007.

ARIAS, V. C.; CASTELLS, R. C.; MALACALZA. N. et al. Determination of oligosaccharide patterns in honey by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography, **Chromatographia**, La Plata, Argentina, v. 58, n. 11/12, p.793-801, 2003.

ARORA, A.; MURALEEDHARAN, G.N.; STRASBURG,G.M., Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system, **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v.24, n.9, p.1355-1363, 1998.

ARRUDA, C. M. F. Características físico-químicas e polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L., 1958 (Hymenoptera, Apidae) da região da Chapada do Araripe, município de Santana do Cariri, estado do Ceará, **Dissertação** (Mestrado em Ciência) - **ESALQ**, Piracicaba, São Paulo, 86 ff., 2003.

BASTOS, D. H. M.; SILVA, J. R. Análise de méis produzidos na região de Bragança, **Revista LECTA**, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 121-134, 1994.

BERAHIA, T.; CERRATI, C.; SABATIER, S.; AMIOT, M.J., Gas chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids in honey, **Sciences des Aliments**, Marseille, France, v.13, n.1, p.15-24, 1993.

BERETTA, P; GRANATA, G.; FERRERO, M.; ORIOLI, M.; FACINO, R. M., Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics, *Analytica Chimica Acta* , Milano, Italia, v. 533, p. 185–191, 2005.

BERGMAN, A., YANAI, J., WEISS, J., BELL, D.; DAVID, M. P., Acceleration of wound healing by topical application of honey, **American Journal of Surgery**, Tel-Aviv, Israel, v.145, p. 374-376, 1983.

BIANCHI, E. M. La miel, características y composición – Análisis y Adulteraciones. Santiago del Estero, Argentina: **UNSE – CEDIA**, 1981.

BIJLSMA, L.; DE BRUIJN, L. L. M.; MARTENS, E. P.; SOMMEIJER, M. J.. Water content of stingless bee honeys (*Apidae, Meliponini*): interspecific variation and comparison with honey of *Apis mellifera*, *Apidologie*, Castellón, Spain, v. 37, n. 4. P. 480-486, 2006.

BLACK, J. G., *Microbiologia: fundamentos e perspectivas*, 4.^a ed., **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, 829 pp., 2000.

BLASA, M.; CANDIRACCI, M.; ACCORSI, A.; PIACENTINI, M. P.; ALBERTINI, M. C.; PIATTI, E., Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants, **Food Chemistry**, Urbino, Italy, v. 97, p. 217–222, 2006.

BOGDANOV, S., RUOFF, K., PERSANO ODDO, L., Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: a review, **Apidologie**, Roma, Italy, v.35, p S54-S17, 2004.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº11 de 20 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de identidade e qualidade do mel. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/anexo>>. Acesso em: maio/2007.

BROVO, L Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Review**, [S. l.], v.56, n.11, p.317-333 1998.

BURDON, R.H. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation, **Free Radic. Biol. Med.**, Glasgow, Scotland, UK, v.18, p.775-794, 1995.

BUTTA, A.; CASERIO, G.; BIZZOZERO, M., Indagine sulla qualità merceologica e sulle caratteristiche microbiologiche di miele in commercio, **Industrie Alimentari**, Pinerolo, Itália, v. 22, n. 210, p. 834-844, 1983.

CÂMARA, J. Q., SOUZA, A. H. de, VASCONCELOS, W. E., Estudos de meliponíneos, com ênfase a *Melipona subnitida* D. no município de Jandaíra, RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Paraíba, v.4, n.1, p.1-20, 2004.

CAMARGO, R. C. R., *Biologia Floral da Lippia alba (Verbenaceae), atividade antibacteriana e caracterização de amostras de méis de Apis mellifera L.*, Tese (Doutorado em Zootecnia - Nutrição e produção animal), **Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho**, Botucatu, 99 pp. 2001.

CAMPOS, M. G. R., Contribuição para o estudo de mel, pólen, geléia real e própolis, **Bol. Fac. Farm. Coimbra**, Coimbra, v.11, n.2, p.17-47, 1987.

CANO, C. B.; FELSNER, M. L.; MATOS, J. R. et al. Comparison of methods for determining moisture content of citrus and eucalyptus brazilian honeys by refractometry, **Journal of Food Composition and Analysis**, Roma, v.14, n.1, p.101-109, 2001.

CARPES, S. T., Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da Região Sul do Brasil, Tese (Doutorado), Universidade do Paraná, Curitiba, 248 ff., 2008.

CARVALHO, C. A. I. de; MARCHINI, L. C.; SODRÉ, G. S., Análises de amostras de méis provenientes do recôncavo da Bahia, In: **Encontro sobre Abelhas**, 4, Ribeirão Preto, **FFCL, FM- USP**, p.352, 2000.

CARVALHO, C. A. L.; MARCHINI, L. C.; TEIXEIRA, G. M. et al. Características físico-químicas de amostras de méis da Bahia. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA**, 12, Salvador, 1998. **Anais...** Salvador, Confederação Brasileira de Apicultura, p.200, 1998.

CATALÁN, J. M. B., Relatório de atividades, **Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Piauí**, Teresina, 27pp., 1981.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids-Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, **Journal of Nutritional Biochemistry**, Sydney, Australia, v.7, n.2, p. 66-76, 1996.

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

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

COOPER, R.; JONES, K.; MORRIS, K., Immunomodulatory properties of honey that may be relevant to wound repair, (Chapter 10) In: **White R.J., Cooper R., Molan P. (eds). Honey: A Modern Wound Management Product**, Aberdeen, UK: **UK Publishers**, p.130–142, 2005.

CORNEJO, L. G. Tecnologia de mel. In: **SEEMANN, P.; NEIRA, M. (Ed.) Tecnologia de la producción apícola**, Valdivia, **Universidad Austral de Chile**, Facultad de Ciencias Agrarias, p.145-171, 1988.

CORTOPASSI-LAURINO, M., GELLI D. S., Pollen Analysis: physicochemical properties and antibacterial action of brazilian honeys from africanized honeybees (*Apis mellifera* L) and stingless bees, **Apidologie**, USA, v. 22, n. 1, p. 61-73, 1991.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; GELLI, D. S. Propriedades antibacterianas de méis brasileiros. **Ciência e Cultura**, Campinas: SBPC, v.36, n.7, p.616, 1984.

COSTA, L. S. M.; ALBUQUERQUE, M. L. S.; TURGO, L. C. et al. Determination of non-volatile compounds of different botanical origin brazilian honeys. **Food Chemistry**, Oxon, v.65, p. 347-352, 1999.

CRANE, E., **O livro do mel**. São Paulo, **Ed. Nobel**, 226 pp., 1987.

CUSHINE, T. P. T.; ANDREW, J. L. Antimicrobial activity of flavonoids, **Inter. Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, Netherlands, v.26, n.5, p.343-356, 2005.

D'ARCY, B. R. Antioxidants in Australian Floral Honeys—Identification of health-enhancing nutrient components. **Rural Industries Research and Development Corporation**, RIRDC Publication n. 05/040-RIRDC Project n. UQ-102A, Australia, 94 pp., 2005.

DA SILVA, D., Atividade antimicrobiana do conocarpano seus derivados e análogos frente a cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*, **Dissertação** (Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas), **Universidade do Vale do Itajaí**, SC, 66 ff., 2007.

DONER, L. W. The sugars of honey: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Washington, v.28, n. 5, p. 443-456, 1977.

EFEM, S. E. E. Clinical observations on the wound healing properties of honey. **British Journal of Surgery**, Oxford, v.75, n.7, p. 679-681, 1988.

EFEM, S.E.E.; UDOH, K.T.; IWARA, C.I., The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance, **Infection**, Calabar, Nigeria, v. 20, n. 4, p. 227-229, 1992.

EMBRAPA 2003 Disponível em:
sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/index.htm,
Acesso em: 20 maio/ 2007.

FATTOM, A. I.; HORWITH, G.; FULLER, S.; PROPST, M.; NASO, R., Development of StaphVax, a polysaccharide conjugate vaccine against *S. aureus* infection: from the lab bench to phase III clinical trials, **Vaccine**, Greifswald, Germany, v.22, n.7, p. 880-887, 2004.

FERRERES, F.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; GIL, M. I. et al. An HPLC technique for flavonoid analysis in honey, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Washington, v.56, n.1, p.49-561, 1991.

FERRERES, F.; ORTIZ, A.; SILVA, C. et al. Flavonoids of “La Alcarria” honey. A study of their botanical origin. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, Washington, v.194, n.2, p. 139-143, 1992.

FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA. C.; TOMÁS-LORENTE, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Hesperetin: a marker of the floral origin of citrus honey, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Washington, v.61, n.1, p.121-123, 1993.

FERRERES, F.; ANDRADE, P.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A., Flavonoids from Portuguese heather honey, **Z. Lebensm. Unter. Forsch.**, Murcia, Spain, v. 199, p. 132–137, 1994.

FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA. C.; TOMÁS-LORENTE, F. et al. Evaluation of pollen as a source of Kaempferol in rosemary honey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Washington, v.77, n.4, p.506-510, 1998.

GONÇALVES, A. L., ALVES FILHO, A., MENEZES, H., Atividade antimicrobiana do mel da abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera: Apidae, meliponini). **Arquivo Instituto de Biologia**, São Paulo, v.72, n.4, p.455-459, 2005.

GREEN, A. E., Wound healing properties of honey, **British Journal Surgery**, Oxford, v. 75, n. 12, p. 1278, 1988.

GREENWOOD, D., Honey for superficial wounds and ulcers, **The Lancet**, Nottingham, UK., v.341, n.8837, p. 90-91, 1993.

GUPTA S. K., SINGH H., VARSHNEY A. C. et al. Therapeutic efficacy of honey in infected wounds in buffaloes, **Indian Journal Animal Science**, India, n. 62, v. 6, p.521-523, 1992.

HADDAD, M. C. L; BRUSCHI, L. C.; MARTINS, E. A. P., Influência do açúcar no processo de cicatrização de incisões cirúrgicas infectadas, **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, Ribeirão Preto, 2000, v. 8 n. 1, p. 57-65, 2000.

HARTMAN, P.E., SHANKEL, D.M., Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules, **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.15, n.3, p.145-182,1990.

HAVSTEEN, H. B., The biochemistry and medical significance of flavonoids, **Pharmacology & Therapeutics**, Kiel, Germany, v. 96, p. 67– 202, 2002.

HENRIQUES, A., Mel: um milagre da natureza para o tratamento de feridas? **School of applied Sciences**, University of Wales Institute; Wales - Cardiff, UK, 2004.

HENRIQUES, A. F. ; JENKINS, R. E. ; BURTON, N. F. ; COOPER, R. A., The intracellular effects of manuka honey on *Staphylococcus aureus* **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Porto, Portugal, v. 29, n. 1, p.45-50, 2009.

HOFFMANN, F. L., Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos, **Brasil Alimentos**, São José do Rio Preto, SP, v. 9, n. 1, p.23-30, 2001

HOOPER, T., Guia do apicultor, [S.l.] **Public. Europa-América**, p. 223-266, 1976.

HUIDOBRO, J. F.; SANTANA, F. J.; SANCHES, M. P.; SANCHO, M. T.; MUNIATEGUI, S.; SIMAL-LOZANO, J., Diastase, invertase and β -glucosidase activities in fresh honey from north-west Spain, **Journal of Apicultural Research**, Santiago de Compostela (Galicia), Spain, v. 34, n.1, p. 39-44, 1995.

HUIDOBRO, J. F.; SIMAL, J. Determination of sugars in honey, **Anales de Bromatologia**, Madrid, v. 36, n. 2, p. 247-264, 1984.

IBGE, 2009, Disponível em: <http://www.cabecadecuia.com/noticias/47391/piaui-e-destaque-no-ranking-de-exportacoes-de-mel-no-pais.html>. Acesso em: ago./ 2009.

IOIRICH, N., As abelhas, farmacêuticas com asas. São Paulo: **MR Moscovo**, 228 pp, 1981.

JAMES, O.B.O.L.; SEGROE, W.; VENTURA, A.K., Some antibacterial properties of Jamaican honey, **West Indian Medical Journal**, [S.l.], v. 21, p. 7-17, 1972.

JEDDAR, A.; KHARSANY, A.; RAMSAROOP, U. G.; BHAMJEE, A.; HAFJEJEE, I. E.; MOOSA, A., The antibacterial action of honey. An in vitro study, **South African Medical Journal**, South Africa, v. 67, n.7, p. 257-258, 1985.

KLUYTMANS, J., VAN BELKUM, A., VERBRUGH, H., Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. **Clinical Microbiology**, Breda, Netherlands, Rev. v.10, n.3, p. 505-520, 1997.

KOMATSU, S. S., Caracterização físico-química de méis de *Apis mellifera* L., 1758 (HYMENOPTERA: APIDAE) de diferentes municípios de São Paulo, **Tese** (Doutorado - Entomologia) – **ESALQ**, Piracicaba, SP, 89ff., 1996.

KOMATSU, S. S.; MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. C.C. Análises físico-químicas de amostras de méis de flores silvestres, de eucalipto e de laranjeira, produzidos por *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera, Apidae) no Estado de São Paulo, 2. Contéudo de açúcares e de proteína, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v.22, n.2, p.143-146, 2002.

LEVY JR. N.C., Estudo da atividade antimicrobiana de méis e própolis de *Apis mellifera* e Meliponinae brasileiros, **Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências**, Rio Claro, Dissertação (Mestrado), 116 pp., 1997.

LIANDA, R. L. P.; CASTRO, N. C.; FONSECA da, N. F., Isolamento e identificação do flavonóide rutina em mel de laranjeira de *Apis mellifera*, **Sociedade Brasileira de Química, 29ª RASBQ, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, ICE**, Seropédica, RJ, 2006.

LIEBER, R. L., Skeletal muscle structure, function & plasticity: the physiological basis of rehabilitation, 2.^a ed., San Diego: **Lippincott Williams & Wilkins**, 369 pp., 2002.

MALAVAZZI, G. R.; LAKE, J. C.; DANTAS, P. E. C., Effect of honey and autologous serum on corneal epithelial healing in rabbits, **Arq. Bras. Oftalmol.**, São Paulo, ISSN 0004-2749, v.68, n.3, 2005.

MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. de C. C.; OTSUK, I. P. Análise de agrupamento, com base na composição físico-química, de amostras de méis produzidos por *Apis mellifera* L. no estado de São Paulo, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 25, n. 1, p. 8-17, 2005.

MARCUCCI, M. C.; RODRIGUEZ, J. ; FERRERES, F.; BANKOVA, V.; GROTO, R.; POPOV, S., Chemical composition of brazilian propolis from São Paulo state, C. A **Journal of Biosciences**, Tübingen, Alemanha, v. 53, n.1-2, p. 117-119, 1998.

MARTINS, S. C. S.; ALBUQUERQUE, L. M. B.; MATOS, J. H. G.; SILVA, G. C.; PEREIRA A, J. B., Atividade antibacteriana em méis de abelhas africanizadas (*Apis mellifica*) e nativas (*Melipona scutellaris*, *M. subnitida* e *Scaptotrigona bipunctata*) no estado do Ceará, **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.52, p.50-53, 1997.

MARTOS, I.; FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A., Identification of flavonoid markers for the botanical origin of *Eukalyptus* honey. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Washington, v.48, n. 5, p. 1498-1502, 2000.

MDIC-MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR, Estatísticas de exportação e importação de mel natural. Disponível em: <http://www.aliceweb.mdic.gov.br>. Acesso em: out./2006.

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

MENDES, E.; PROENÇA, E. B.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; FERREIRA, M. A ; BENTO, L. S. M., Quality evaluation of portuguese honey, **Carbohydrate Polymers**, Porto, Portugal, v. 37, n. 3, p. 219-223, 1998.

MERCOSUL, **Regulamento Técnico Mercosul “Identidade e Qualidade do Mel”**. Resolução GMC Nº 15/94. Motevidéu, 1999. Disponível em: <<http://anvisa.gov.br/legis/resol/mercosul/alimentos/89-99.htm>> Acesso: jun. /2007.

MICROBIAL ECOLOGY OF FOODS Redução da atividade de água-**Conservação de alimentos**, Academic Press, v.1, 1980, Disponível

em:http://acd.ufrj.br/consumo/disciplinas/tt_conservacao.htm. Acesso: fev. /2007.

MIORIN P. L., LEVY JUNIOR N. C., CUSTODIO A. R., BRETZ W. A., Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*, **Journal of Applied Microbiology**, Warrington, UK, v. 95, n.5, p. 913-920, 2003.

MIRANDA, E. T.; SILVA, R. A. M.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MELHEM, M. C. S.; PUKINSKAS, S. R. B. S.; MENDES-GIANNINI, M. J. S., Epidemiologia de candidíase hospitalar: importância da identificação específica, **Revista de Ciência Farmacêutica**, São Paulo;, v. 24, n. 1, p. 39-45, 2003.

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

MOLAN, P. C. The antimicrobial activity of honey, 2. Variation in the potency of the antibacterial activity, **Bee World**, Cardiff, v. 73, n. 2, p. 59-76, 1992b.

MOLAN, P. C., The role of honey in the management of wounds: A review of the evidence on the advantages of using honey as a topical wound treatment together with practical recommendations for its clinical use. **Journal of Wound Care**, Hamilton, New Zealand, v. 8, 1999.

MOLAN, P. C., Mode of action, In: WHITE R, COOPER R., MOLAN P., Eds. Honey: A modern wound management product, **Wounds UKPublishing**, Aberdeen, p. 1-23, 2005.

MOLAN, P. C., Potential of honey in the treatment of wounds and burns, **Am. J. Clin. Dermatol**, Wales, v.1, p. 13-19, 2001.

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

MOREIRA, A. S., Apicultura: polinização das abelhas aumenta produção das lavouras, **A Lavoura**, Rio de Janeiro, a.95, n.599, p.30-43, 1993.

MOREIRA, R. F. A.; DE MARIA, C. A. B. Glicídios no mel, **Revista Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 4, p. 516-525, 2001.

MSCHVIDOBADSE V. M. Allogenic transplantation of sterilized bones and halfjoints, **Zentralblatt für Chirurgie**, Germany, v.103, p.1138-1348, 1978.

MURRAY, P. R.; DREW, W. L.; KOBAYASHI, S. G.; THOMPSON, J. J. H., Microbiologia médica, **Ed. Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, p.79-95, 2000.

NAMIAS, N., Honey in the management of infections, **Surgical Infections**, Miami, USA, v. 4, n. 2, p. 209-226, 2003.

NOGUEIRA-NETO, P., Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão, São Paulo: **Nogueirapis**, 445 pp., 1997.

NORONHA, P. R. G. Caracterização de méis cearenses produzidos por abelhas africanizadas: parâmetros químicos, composição botânica e colorimetria, **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia) - **Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 147 ff., 1997.

OVERGAAUW, P. A. M.; KIRPENSTEIJN, J., Application of honey in the treatment of skin wounds, **EJCAP** – New York, v. 16, n.1, 2006.

OVERGAAUW, P. A. M.; KIRPENSTEIJN, J. Application of honey in the treatment of skin wounds, **EJCAP** – New York, v. 16, n.1, 2006.

PARK, K. Y.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A.R. P.; AGUIAR, C.L., Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal, **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 32, n.6, p. 997-1003, 2002a.

PARK, Y. K. ; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L., Estudo da composição fenólica de

méis e própolis oriundos de mesma colméia, **Mensagem Doce**, São Paulo, SP, n. 67, p. 1–11, 2002b.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S., Microbiologia: Conceitos e Aplicações. – **Volume I. Ed. Makron Books do Brasil**, 2. ed.,1997.

PÉREZ, C., et al. Estudio de algunos parámetros físico-químicos en mieles monoflorales de Zaragoza, **Alimentaria**, USA, v. 27, n. 213, p. 59-61, 1990.

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

POSEY, D. A., Etnoentomologia de tribos indígenas da amazonia. In: **RIBEIRO, D. Suma etnológica brasileira: Etnobiologia**, 2.ed. Petrópolis: **FINEP**, v.1, p.251-271,1987.

POSTMES, T.; VAN DEN BOGAARD, A. E.; HAZEN, M. , Honey for wounds, ulcers, and skin graft preservation, **Lancet** (British edition), United Kingdom, v. 341, n. 8847, p. 256-257, 1993.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. Microbiology, 5.^a ed. **The McGraw-Hill Companies**, USA, 1147 pp., 2002.

RENDÓN, S. R. Estudio de la composición físico-química de las mieles extremenas y estanjeras. In: **CONGRESO IBERO LATINOAMERICANO DE APICULTURA**, 5. Uruguay, p.174-83,1996.

RIBEIRO-CAMPOS, M. G.; SABATIER, S.; AMIOT, M. J.; AUBERT, S. Characterization of flavonoids in three hiveproducts: bee pollen, propolis and honey. **Planta Medica**, Coimbra, Portugal, v.56, p.580-581, 1990.

RODRIGUES, A. A. G., ROCHA, R. M. S., MIRANDA, I. A. M., SANTOS, M. A. S., MORAIS, A. S., VAZ, C. A., Molecular study of *Candida albicans* virulence factors. Disponível em: http://www.fct.mctes.pt/projectos/pub/2004/painel_result/vglobal_projecto.asp?

idProjecto=61598&idElemConcurso=36. Acesso: jul./ 2009.

RODRIGUES, A. C. L.; MARCHINI, L. C.; HADDAD, M.de L. Características qualitativas das partes cristalizadas e de sobrenadante de diferentes méis. **CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 11**. Piauí, **Anais...** : Confederação Brasileira de Apicultura, p. 349, 1996.

ROOT, A. I., ABC y XYZ de la apicultura: encyclopedia de la cria científica y práctica de las abejas, Buenos Aires: **Editorial Hemisferio Sur**, 723 pp., 1985.

ROSSELL, C. E. V. Fermentação do hidrolisado. In: **WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE HIDRÓLISE PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, 3**, Campinas, 2007. Disponível em: <<http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/Hidrolise%20Rossel%20Fermenta%E7%E3o%20do%20Hidrolisado.pdf>> Aceso em: jun./2007.

SABATIER, S.; AMIOT, M.J.; TACCHINI, M.; AUBERT, S. Identification of flavonoids in sunflower honey, **Journal of Food Science**, Chicago, v. 57, n. 3, p.773-777, 1992.

SADER, H. S.; GALES, A.C.; PFALLER, R. E. M.; ZUCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N., Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program., **Braz. J. Infect. Diseases**, São Paulo, v. 5, n. 4, p. 200-214, 2001.

SANTOS, R. F.; KIILL, L. H. P.; ARAÚJO, J. L. P. Levantamento da flora melífera de interesse apícola no município de Petrolina-PE, **Caatinga**, Mossoró, RN, v.19, n.3, p.221-227, 2006.

SATO, T.; MIYATA, G. The nutraceutical benefit. Part III: Honey. **Nutrition**, New York, n.16, p.468-469, 2000.

SCHEPARTZ, A. L.; SUBERS, M. H. Catalase in honey. **Journal of Apicultural Research**, Philadelphia, USA, v.5, n.1, p.37-43, 1966.

RELATÓRIO SEBRAE, Brasília, 246 pp., 2006. Disponível em:
[http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/bds.nsf/D136F240209339148325727D004F3E9C/\\$File/NT00035052.pdf](http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/bds.nsf/D136F240209339148325727D004F3E9C/$File/NT00035052.pdf). Acesso: maio/2008.

SEEMANN, P.; NEIRA, M. **Tecnología de la producción apícola**, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, **Empaste**, Valdivia, 202p., 1988.

SERRANO, R. B., La miel: edulcorante natural por excelência, **Alimentaria**, Madrid, España, v.29, p.29-35, 1994.

SIDDIQUI, I. R., The sugars of the honey, In: **Advanced Carbohydrate Chemical Biochemical**, Edited by Tipson RS and Morton D., v.25, p. 285-309, 1970.

SILVA, C. H. P. M., Bacteriologia: um texto ilustrado, **Eventos**, Teresópolis, RJ, p. 22-25, 1999.

SIVAM, G., Analysis of flavanoids, In: **Methods of analysis for functional food and Nutraceuticals**, Ed. W.J. Hurst. Cap. 9, 350 pp., 2002.

SODRÉ, G. S. Características físico-químicas e análises polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera: Apidae) da região litoral norte do Estado da Bahia, **Dissertação** (Mestrado), **USP/ESALQ**, Piracicaba, SP, 83ff., 2000.

SOMMER, P. G., Panorama da apicultura mundial. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 14., 2002, Campo Grande, MS. **Anais...** Campo Grande: CBA: UFMS: FAAMS, p. 209-213, 2002.

SOUZA, B. A. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona asilvai* (Hymenoptera: Apidae). **Ciência Rural**, São Paulo, v.34, n.5, p.1623-1624, 2004.

SOUZA, D.C.; BAZLEN, K. Análises preliminares de características físico-químicas de méis de Tiúba (*Melipona compressipes*) do Piauí. In: **XII Congresso Brasileiro de Apicultura**, Salvador, BA, p. 267, 1998.

SUBRAHMANYAM, M., Topical application of honey in treatment of burns. **British Journal of Sugery**, Maharashtra, India, v.78, n.4, p.497-498, 1991.

TAN, S. T., HOLLAND, P. T., WILKINS, A. L. et al. Extractives from New Zealand Honeys. 1. White clover, manuka and kanuka unifloral honeys, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, n.36, p.453-460, 1988.

TAORMINA, P. J.; NIEMIRA, B. A.; BEUCHAT, L. R. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. **International Journal of Food Microbiology**, Griffin, n. 69, p. 217-225, 2001.

TERRAB, A.; RECAMALES, A. F.; HERNANZ, D. ; HEREDIA, F. J. ; Characterisation of Spanish thyme honeys by their physicochemical characteristics and mineral contents, **Food Chemistry**, Sevilla, Spain, v. 88, p. 537–542, 2004.

TODAR, K., Web Review Online Textbook of Bacteriology. "The Good, the Bad, and the Deadly", (**SCIENCE Magazine**- June, 2004 - Vol 304: p. 1421), Disponível em http://74.125.47.132/search?q=cache:ynt7jp6_pEJ:www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html+pseudomonas+aeruginosa. Acesso: jun./ 2007.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A; MARTOS, I.; FERRERES, F.; RADOVIC, B.S.; ANKLAM, E., HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys, **Journal Science Food Agric.**, Washington, n.81, p.485-496, 2001.

TONKS, A. J, COOPER, R. A, JONES, K. P., BLAIR, S., PARTON, J., "Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes, **Cytokine**, Cardiff, Wales, v. 21, n. 5, p. 242-247, 2003.

TORRES, A.; GAREDEW, A.; SCHMOLZ, E.; LAMPRECHT, I., Calorimetric investigation of the antimicrobial action and insight into the chemical properties of "angelita" honey – a product of the stingless bee *Tetragonisca angustula* from Colombia, **Thermochemica Acta**, Holand, v. 415, fasc. 1-2, p. 107-113, 2004.

TURKMEN, N. ; SARI, F.; POYRAZOGLU, E. S.; VELIOGLU, Y. S., Effects of prolonged heating on antioxidant activity and colour of honey, **Food Chemistry**,

Ankara, Turkey, v. 95, p. 653–657, 2006.

UÑATES, M. A.; AGUILAR, A. B.; PIOLA, H.D. et al Estudio físico-químico de mieles de la provincia de San Luis–República Argentina, **Archivos Latin. de Nutrición**, Guatemala, v. 49, n. n.2, p. 193-196, 1999.

VARDI, A.; BARZILAY, Z.; LINDER, N.; COHEN, H. A.; PARET, G.; BARZILAI, A., Honey is effective in the treatment of post-surgical wounds – “Local application of honey for treatment of neonatal postoperative wound infection,” **Acta Paediatric**, Tel Hashomer, Israel, v. 87, n.4, p. 429-32, 1998.

VARGAS, T., Avaliação da qualidade do mel produzido na região dos Campos Gerais do Paraná, Ponta Grossa, **Dissertação** (Mestrado em Ciências Bioquímica) – **Universidade Federal de Ponta Grossa**, São Paulo, 134ff., 2006.

VERISSIMO, M.T.L., Porque o mel cristaliza, **Apicultura no Brasil**, [S.], v.3, n.18, p.14, 1987.

VIDAL, R.; FREGOSI, E. V. de, Mel: características, análises físico-químicas, adulterações e transformações, **Instituto Tecnológico Científico Roberto Rios**, Barretos, SP, 95 pp., 1984.

VILHENA, F.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B., **Manual de análises físico-químicas do mel**, São Paulo-SP: APACAME, 16pp. 1999.

VIT, P., MEDINA, M., ENRÍQUEZ, E., Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela, **Bee World**, Mérida, Venezuela, v. 85, n. 1 p. 2-5, 2004.

VIT, P.; PERSANO ODDO, L.; MARANO, M. L.; MEJIAS, E. S. de, Venezuelan stingless bee honeys characterized by multivariate analysis of physicochemical properties, **Apidologie**, Mérida, Venezuela, v. 29, p. 377-389, 1998.

VIT, P.; JACOB, T. J., Putative anticataract properties of honey studied by the action of flavonoids on a lens culture model, **Journal of Health Science**, Mérida

Venezuela, v. 54, n. 2, p. 196-202, 2008.

WAHDAN, H., Causes of the antimicrobial activity of honey, **Infection**, Cairo, Egypt, v. 26, 26-31, 1998.

WELCH, K.D.; DAVIS, T.Z.; VAN EDEN, M.E.; AUST, S.D. Deleterious ironmediated oxidation of biomolecules, **Free Radical Biol. Med.**, Logan, USA, v.32, p. 577-583, 2002.

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

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

WESTON, R. J.; MITCHELL, K. R.; ALLEN, K. L. Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. **Food Chemistry**, Oxon, v.64, n.3, p.295-301 1999.

WHITE JUNIOR, W. La miel. In: **Dadant, H., La colmena y la abeja melifera**. Montevideo, **Hemisfério Sul** (Ed.), cap.1, p. 21-35, 1989.

WHITE, J. W. Physical characteristics of honey. In: **CRANE, E. (Ed.). Honey a comprehensive survey**, London, Heinemann, p. 207-239, 1975.

WHITE, J. W. , SUBERS, M. H., Studies on honey inhibine : a chemical assay, **Journal of Apicultural Research**, Pennsylvania, USA, v. 2, n. 2, p. 93-100, 1963.

WHITE, J. W., Inhibine and glucose oxidase in honey, a review, **American Bee Journal**, Pennsylvania, USA, v.106, p.241-216, 1966.

WHITE, J. W.; BRYANT, JR., V. M. Assessing citrus honey quality: pollen and methyl anthranilate content, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington,

v.44, p. 3423-3425, 1996.

WHITE, J. W.; KUSHINIR, I. The enzymes of honey: examination by ion-exchange chromatography, gel filtration, and starch-gel electrophoresis, **Journal of Apicultural Research**, Cardiff, v.6, n.2, p. 69-89, 1967.

WILKINS, A. L.; LU, Y. R.; TAN, S. T. Extractives from New Zealand honeys: aliphatic dicarboxylic acids in New Zealand Rewarewa honey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.43, n.12, 3021-3025 1995.

WILKINSON, J. M.; CAVANAGH, H. M. A. Antibacterial Activity of 13 Honeys Against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, **Journal of Medicinal Food**, Wagga Wagga, Australia, v. 8, n.1, p. 100–103, 2005.

YANIV, Z.; RUDICH, M., Medicinal herbs as a potential source of high quality honeys. In: **Bee Products**, Mizrahi, A., Lensky, Y. Eds., **Plenum Press**: New York, p. 77-81, 1996.

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



CAPÍTULO 1

AÇÃO BIOLÓGICA E FATORES FÍSICO-QUÍMICOS DE MÉIS PRODUZIDOS NO ESTADO DA BAHIA

RESUMO

A atividade antimicrobiana do mel tem sido atribuída ao pH, acidez, osmolaridade, peróxido de hidrogênio e compostos fenólicos variando segundo a sua origem botânica. Neste capítulo as amostras de méis de *Apis mellifera* e de abelhas sem ferrão analisadas, pelo método de difusão em poço apresentaram atividade, contra a *E. coli* e *S. aureus*, mas foram inativas contra *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Na determinação da CIM 100% das amostras foram ativas. Parâmetros físico-químicos como pH, acidez, atividade de água (a_w), cor, compostos fenólicos, bem como o espectro polínico de algumas amostras foram analisados, e relacionados com a atividade antimicrobiana apresentada. A análise estatística (Coeficiente de Spearman) apontou de maneira geral correlação pouco significativa entre a atividade biológica e os parâmetros físico-químicos. Com a análise de ácidos fenólicos e flavonóides, realizada por espectrofotometria UV-Vis e por CLAE DAD, foi possível observar a superioridade dos ácidos fenólicos em relação aos flavonóides. A análise multivariada de coordenadas principais, apesar da grande variedade de compostos fenólicos apontou similaridades por microrregiões. Foram realizados testes de comparação entre méis e solução de açúcares, e da ação da catalase sobre a atividade do mel, verificando-se no primeiro caso a superioridade do mel e no segundo, a redução da atividade pela inibição do H_2O_2 .

Palavras chaves: Análises físico-químicas, Atividade antimicrobiana, Mel.

ABSTRACT

Antimicrobial activity of honey has been attributed to pH, acidity, osmolarity, hydrogen peroxide and phenolic compounds varies according to its botanical origin. In this chapter the honey samples of *Apis mellifera* and stingless bees analyzed by the method of diffusion well presented activity against *E. coli* and *S. aureus*, but were inactive against *P. aeruginosa* and *C. albicans*. In MIC determination 100% of the samples were active. Physicochemical parameters as pH, acidity, water activity (aw), color, phenolic compounds, and the pollen spectrum of some samples were analyzed and related to the antimicrobial activity presented. The statistical analysis (Spearman coefficient) showed generally little significant correlation between biological activity and physicochemical parameters. With the analysis of phenolic acids and flavonoids, conducted by UV-Vis and HPLC DAD, we observed the superiority of phenolic acids in relation to the flavonoids. Multivariate analysis of principal coordinates, despite the wide variety of phenolic compounds by micro region noted similarities. Tests were performed for comparison between honey and sugar solution and the action of catalase on the activity of honey and there in the first case the superiority of honey and second, the reduction in activity by inhibition of H₂O₂.

Key words: Antimicrobial activity, Honey, Physical and chemical analysis.

3 AÇÃO BIOLÓGICA E FATORES FÍSICO-QUÍMICOS DE MÉIS PRODUZIDOS NO ESTADO DA BAHIA

3.1 INTRODUÇÃO

A apicultura contribui para a conservação das abelhas e de seus *habitats* podendo ser considerada uma atividade sustentável, pois inclui a restauração ambiental através da preservação e disseminação de árvores que servem de locais de nidificação, além da polinização da flora autóctone.

Ao lado da *Apis mellifera* (a abelha comercial no Brasil), as espécies nativas brasileiras, como as do gênero *Melipona* conhecidas popularmente como mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*), jandaíra nordestina (*Melipona subnitida*), uruçú-cinza ou uruçú-cinzenta (*Melipona fasciculata*), uruçú-amarela (*Melipona rufiventris*), uruçú-do-nordeste (*Melipona scutellaris*), em termos de produção de mel são as mais consideradas (DRUMOND, 2007).

Embora alcance alto valor comercial se comparado ao mel de *A. mellifera* (CÂMARA et al. 2004), a produção dessas espécies nativas é muito inferior em quantidade devido à menor capacidade produtiva (tamanho das colméias). Por outro lado, de grande importância no mercado, esses méis, diferentes do mel de *Apis* na doçura, sabor e aroma próprios, alcançam maiores preços, sendo usados pelas populações nativas por suas propriedades medicinais (MARCHINI et al. 1998; LEVY-JÚNIOR, 1997; KERR, 1996).

A demanda internacional de mel e o potencial consumo interno, aliados à riqueza brasileira de extensão territorial, variedade de flora e clima, torna evidente o grande potencial de negócio da apicultura, como instrumento de fixação do homem no campo, gerando divisas e atraindo a atenção de entidades acadêmicas.

O estado da Bahia, com uma área de 564.692,67 Km², participa com 6,6% do território nacional e 36,3 % da região Nordeste (IBGE, 2002). Como pontos extremos situam-se os municípios de: Curaçá, ao Norte (8° 32' 00" e 39° 22' 49"), Mucurí ao

Sul (18° 20'07" e 39° 39' 48"), Jandaíra a Leste (11° 27' 07 e 37° 20' 37"), e a Oeste, Formosa do Rio Preto , à latitude (S) de 11° 17' 21" e longitude (W) de 46° 36' 59" respectivamente (IBGE, 2007).

A tipologia climática do estado vai do úmido ao seco, passando pelo subúmido, árido e semiárido, com precipitações médias que vão de 300 mm a \geq 2000 mm. As temperaturas mínimas vão de 14,4° C a 22,1°C, as médias, de 18,8°C a 27,1°C apresentando máximas entre 24,4°C a 33,7°C, com regimes de ventos moderados (SEI, 2007).

Quanto à vegetação, ao Norte predomina a Caatinga. Ao Leste, encontram-se principalmente a Mata Atlântica, restingas, mangues, várzeas e matas mesófilas. Ao Oeste o Semiárido, ocupando uma área de 360 mil Km², corresponde a mais de 50% do território do Estado e se caracteriza pela acidez elevada do solo, baixa fertilidade, baixa densidade populacional e pouca oferta de água. Nesta região, onde grande parte da população vive em condições desfavoráveis devido ao déficit hídrico, a apicultura se apresenta como um importante fator de desenvolvimento econômico, pois o potencial de sua flora apícola ainda se encontra subestimado (MARTINS, 2002).

O Semiárido baiano apresenta caatingas, lagoas temporárias nas partes mais baixas, e, associados à Chapada Diamantina, cerrados, florestas montanas, ciliares e mesófilas e os campos rupestres. Mais a oeste, se encontra uma extensão de cerrado, que se liga com o Brasil Central, além das caatingas, como as Dunas do São Francisco (ALCOFORADO FILHO e GONÇALVES, 2000). Para Alencar (2002), no sul a flora da mata atlântica e da restinga é a principal fonte de néctar e pólen para as abelhas. São encontradas também áreas sujeitas ao impacto do antropismo com grande variedade de culturas, áreas de reflorestamento e agropecuária em várias partes do estado. Dos tipos de vegetação mencionados, três podem ser destacados como de grande importância: a Mata Atlântica, os Campos Rupestres e as Caatingas.

Giulietti et al. (2002), afirmam que a Mata Atlântica do leste da Bahia é considerada como importante centro de endemismo vegetal e alguns exemplos são os gêneros *Harleyodendron*, *Arapatiella* e *Brodriguesia* (Leguminosae), *Anomochloa*,

Alvimia, *Criciuma*, *Eremocaulon*, *Sucrea*, *Diandrolyra* e *Eremitis* (Gramineae); *Andreodoxa* (Rutaceae). Alguns gêneros endêmicos da Bahia têm predominância na Mata Atlântica como *Zomicarpa* (Araceae) e *Hornschuchia* (Annonaceae). Os Campos Rupestres que ocorrem nas partes mais altas da Chapada Diamantina também se destacam pelo grande número de novas espécies e endemismos, encontrados na região de Mucugê, Pico das Almas e Catolés. Entre os gêneros endêmicos da Bahia e restritos a essa região, destacam-se vários da família Asteraceae como *Blanchetia*, *Bishopiella*, *Litothamnus*, *Agrianthus* e *Santosia*, além de vários gêneros que têm aí seu centro de diversidade, como *Marcetia* (Melastomataceae), *Eriope* (Lamiaceae), *Chamaecrista* e *Calliandra* (Leguminosae) (CONCEIÇÃO e GIULIETTI, 2002; GIULIETTI e PIRANI, 1988). Também as Caatingas, embora geralmente citadas como regiões de pouco endemismo, apresentam mais de 300 espécies endêmicas (GIULIETTI et al., 2002). Silva et al. (2006) citam os gêneros *Mcvaughia* (Malpighiaceae), *Glischrothamnus* (Molluginaceae), *Rayleya* (Sterculiaceae), *Anamaria* (Scrophulariaceae) e *Stephanocereus* (Cactaceae) como restritos a esse bioma.

Amparado nesses importantes biomas, que lhe conferem competitividade do ponto de vista da biodiversidade, o estado da Bahia abriga hoje mais de 150 mil colméias comerciais, espalhadas em todo seu espaço geográfico (EBDA, 2009). Segundo a Confederação Brasileira de Apicultura, a Bahia produziu em 2008 cerca de 4,0 mil toneladas de mel, colocando-se como o terceiro produtor do Nordeste, atrás somente do Piauí e do Ceará (IBGE, 2009).

Dividida em 15 microrregiões socioeconômicas (SEI, 2007), a Bahia tem como principais regiões produtoras de mel o Norte (Campo Alegre de Lourdes) e o Nordeste do estado (Ribeira do Pombal) (APACAME, 2010). A região Sul do estado da Bahia se destaca pela produção de pólen e própolis, sendo o maior produtor nordestino, sediando a primeira cooperativa brasileira do produto, em Canavieiras (litoral sul). O município de Ribeira do Pombal se destaca como o maior produtor de pólen da região, despontando nacionalmente como um dos principais do país, (IBGE, 2009). A produção de mel também vem se destacando em vários municípios como Santa Cruz da Vitória e Teixeira de Freitas (CEPLAC 2010), sustentada por

1.200 apicultores de 22 associações de apicultura e 2 cooperativas, uma de mel (Santa Cruz da Vitória) e outra voltada para a produção de pólen (Canavieiras).

Reconhecido amplamente como um alimento saudável, méis de várias partes do mundo têm sido estudados por suas características terapêuticas (MUNDO et al., 2004; MOLAN, 2001; WADHAN, 1998). Essa atividade biológica pode ser eficaz contra um amplo espectro de espécies bacterianas (ALLEN et al. 1991; MOLAN 1992), mas a caracterização de seus componentes químicos, são necessários para uma utilização efetiva (PARK et al. 2002).

Assim, considerando que diferentes biomas com diversidade de floradas favorecem a produção de méis distintos quanto à composição (ALCONFORADO FILHO e GONÇALVES 2000), e a falta de estudos sobre essa matéria-prima produzida no estado da Bahia, este trabalho teve como objetivo geral investigar a composição química e a atividade antimicrobiana desses méis. E mais especificamente: (i) investigar a atividade antimicrobiana de amostras de mel das diversas microrregiões socioeconômicas do estado da Bahia contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* pelo método da difusão em poço e da Concentração Inibitória Mínima; (ii) verificar a contribuição de fatores como acidez, peróxido de hidrogênio, capacidade osmótica e substâncias do metabolismo secundário de plantas na atividade antimicrobiana; (iii) avaliar as amostras de mel quanto ao seu perfil fenólico nas diversas microrregiões do estado.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Coleta de Amostras

Cinquenta e três amostras de méis foram aleatoriamente coletadas, em 13 das 15 microrregiões socioeconômicas do estado da Bahia (FIGURA 5), sendo 37 de *Apis mellifera* (TABELA 1) e 16 de méis de abelhas sem ferrão (TABELA 2). As amostras foram obtidas diretamente de produtores ou adquiridas em comércios entre setembro de 2005 e fevereiro de 2007, identificadas e mantidas sob refrigeração a 4°C até a realização das análises.

As abelhas sem ferrão das amostras I a V foram identificadas pela Dr.^a Favízia Freitas de Oliveira (UFBA); a abelha da amostra VI, identificada pelo Laboratório de Entomologia-EBDA; as amostras VII a XV, foram cedidas pela Faculdade de Agronomia da UFBA (Cruz das Almas/BA), onde foram identificados os espécimes; a amostra XVI, adquirida no mercado informal, apresenta aqui apenas identificação popular.



FIGURA 5 - Mapa do estado da Bahia apresentando divisão por microrregiões socioeconômicas. FONTE: SEI, 2007.

TABELA 1 - Méis de *Apis mellifera* coletados por microrregião socioeconômicas do estado da Bahia

Am.	Origem / Município	Região	Colheita / coleta*
1	Estrada do Japú- Ilhéus	Litoral Sul	Set/05
2	Uma- Bacia do Rio Cachoeira	Litoral Sul	Dez/04
3	Santa Cruz da Vitória	Litoral Sul	Set/05
4	Piemonte da Diamantina	Piemonte da Diamantina	Jun/05
5	Licínio de Almeida	Serra Geral	Abr/05
6	Nascente da Serra-Mortugaba	Serra Geral	Nov/04
7	Anajé	Sudoeste	Ago/05
8	Apis Jordans- Barra do Choça	Sudoeste	Nov/05
9	Fazenda Santa Cruz- Itapitanga	Litoral Sul	Set/05
10	Município de Canudos	Nordeste	Out/05
11	Município de Pojuca	Recôncavo Sul	Dez/05
12	Barra do Choça	Sudoeste	Nov/05
13	Jequié	Sudoeste	Abr/05
14	Vale do Capão-Palmeiras	Chapada Diamantina	Set/05
15	Una	Litoral Sul	Nov/05
16	Casa-Nova	Baixo Médio São Francisco	Fev/06
17	Parque Sempre-Viva- Mucugê	Chapada Diamantina	Mai/06
18	Parque Sempre-Viva- Mucugê	Chapada Diamantina	Mai/06
19	Município de Cipó	Nordeste	Jan/06
20	Nova Soure- Fazenda Santo Antônio	Nordeste	Jan/06
21	Estrada Andaraí- Mucugê Km 05	Chapada Diamantina	Mai/06
22	Município de Jorrinho	Nordeste	Jun/06
23	Estrada Andaraí- Mucugê Km 05	Chapada Diamantina	Ago/06
24	Município de Barreiras	Oeste	Ago/06
25	Rio Grande-Chapada Diamantina	Chapada Diamantina	Ago/06
26	Capão-Apiário Caeté- Palmeiras	Chapada Diamantina	Jul/06
27	Vale do Capão- Palmeiras	Chapada Diamantina	Jul/06
28	Município de Jorrinho	Nordeste	Nov/06
29	Fazenda Campo Verde- Remanso	Baixo Médio São Francisco	Jan/05
30	Município de Canarana	Irecê	Set/06
31	Ipirá	Paraguaçu	Nov/06
32	Faz. São Jorge- Cansanção	Nordeste	Mai/06
33	Santanópolis	Paraguaçu	nov/06
34	Itanhaçu	Serra Geral	Nov/06
35	Cruz das Almas	Recôncavo Sul	Ago/06
36	Cruz das Almas	Recôncavo Sul	Ago/06
37	Cruz das Almas	Recôncavo Sul	Ago/06

(*) colheita= data ou período em que o mel foi retirado da colméia; coleta= data ou período em que foi adquirida a amostra (diretamente do produtor ou no comércio).
As cores correspondem às regiões econômicas da FIGURA 5.

TABELA 2- Identificação das amostras de méis de abelhas sem ferrão do estado da Bahia por espécie, tribo/nome popular, florada e local de coleta

Am	Abelha (espécie)	Região	Tribo/Nome popular		Vegetação	Coleta	
			Melipona	Trigona		Local	Data
I	<i>Friseomelita doederleinei</i>	Nordeste		Moça-Branca	Silvestre, Acerola, Umbú	Serrinha	mai/06
II	<i>Melipona asilvai</i>	Nordeste	Munduri		Calumbí, Unha de Gato	Serrinha	mai/06
III	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	Nordeste	Mandaçaia		Calumbí, Unha de Gato	Serrinha	mai/06
IV	<i>Tetragonisca angustula</i>	Nordeste		Jataí	Silvestre, frutais	Cruz das Almas	mai/06
V	<i>Plebeia sp</i>	Nordeste		Mirim	Silvestre	Canudos	ago/06
VI	<i>Melipona scutellaris</i>	Chapada Diamantina	Uruçú		Silvestre	Lençóis	ago/06
VII	<i>Tetragonisca angustula</i>	Metropolitana		Jataí	Silvestre	Ilha de Vera Cruz	ago/06
VIII	<i>Melipona scutellaris</i>	Paraguaçu	Uruçú		Silvestre	Jequitibá/Mundo Novo	mai/06
IX	<i>Melipona scutellaris</i>	Paraguaçu	Uruçú		Silvestre	V. de Jequitibá/Mundo Novo	mai/06
X	x*						
XI	<i>Melipona scutellaris</i>	Sudoeste	Uruçú		Silvestre	Planaltino	mar/06
XII	<i>Melipona scutellaris</i>	Paraguaçu	Uruçú		Silvestre	M. de Jequitibá/M. Novo	jul/06
XIII	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	Nordeste	Mandaçaia		Silvestre	Quijingue	set/06
XIV	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	Nordeste	Mandaçaia		Silvestre	Quijingue	nov/06
XV	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	Nordeste	Mandaçaia		Silvestre	Quijingue	nov/06
XVI	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	B. M. São Francisco	Mandaçaia		Silvestre	Casa Nova	fev/07

Am= amostra; (x)* = Amostra não identificada; B.M.S.Francisco= Baixo Médio São Francisco; V. de Jequitibá=Vila de Jequitibá; M. de Jequitibá= Mosteiro de Jequitibá.

3.2.2 Determinação da Atividade Antimicrobiana

3.2.2.1 Conceitos de Atividade

As definições de efeito bacteriostático e de efeito bactericida adotados neste trabalho estão em acordo com aqueles utilizados para a análise de um antibiótico. Baseiam-se em estudos experimentais onde os micro-organismos são colocados em contato com o antimicrobiano e a sua sobrevivência é estudada (CLSI, 2002). Foram consideradas quatro terminologias neste estudo: efeito bacteriostático, efeito bactericida, micro-organismo sensível e micro-organismo não sensível, abaixo descritas.

a) O efeito bacteriostático de um antimicrobiano induz bloqueios reversíveis da síntese protéica da célula microbiana. Este inibe a multiplicação normal dos micro-organismos que depois são eliminados por intermédio de mecanismos imunológicos (ISCS-SUL, 2007; SILVA, 2007) o que equivale a dizer, que as taxas de resposta podem ser inferiores àquelas para isolados sensíveis (CLSI, 2002). *In vitro*, com a técnica da difusão em poço, pode ser observada redução no tamanho e na quantidade de colônias crescidas no ágar na região sob a ação da amostra em teste (halo).

b) O efeito bactericida, quando o micro-organismo é inativado permanentemente, ocorre através da inibição da síntese protéica ou destruição da membrana citoplasmática dos micro-organismos provocando lesões profundas e irreversíveis nas células bacterianas com efeito letal. Verifica-se uma redução do número de micro-organismos que será tanto mais visível quanto maior for a concentração do antimicrobiano (ISCS-SUL, 2007; SILVA, 2007).

c) A categoria “sensível”, segundo o CLSI (2002), indica que uma infecção por uma determinada cepa pode ser tratada adequadamente com a dose de agente antimicrobiano recomendada para esse tipo de infecção e espécie infectante, exceto quando contraindicado. Na placa de ágar, o efeito após o tempo de incubação é de

uma região com halo de inibição (escasso desenvolvimento ou ausência total de colônias na região de incidência da amostra).

d) O conceito não sensível (NS) ou “resistente” foi considerado quando a cepa em estudo não foi inibida pela concentração do agente antimicrobiano utilizado (CLSI, 2002).

3.2.2.2 Verificação de contaminação microbiana das amostras

Como análise prévia, amostras de mel foram semeadas por estrias simples em placas contendo Ágar Nutriente (AN) e incubadas a 37° C por 24h para verificação de uma possível contaminação microbiana das amostras.

Dada a impossibilidade de filtrar o mel puro para a esterilização, as amostras 1 (um) a 6 (seis) de *Apis mellifera* diluídas em água destilada a 50%, 25% e 12%, foram filtradas em membrana de celulose (0,22µm). Foram realizados testes preliminares de difusão em poço para verificação da melhor concentração de trabalho; a diluição a 50% foi a de melhor visualização dos poços, sendo estabelecida para todas as análises.

Para determinação da atividade antimicrobiana, foram empregados dois testes: difusão em meio sólido (ágar) e em meio líquido (CIM) com meio Müller Hinton.

3.2.2.3 Teste de Difusão em Poço

O método de difusão em meio sólido (ágar) é uma prova qualitativa adequada para o estudo da sensibilidade de uma determinada população de micro-organismo (ISCS-SUL, 2007). Nesta pesquisa, foi usado o teste da difusão em poço (Ahn & Stiles, 1990) modificado, como método de triagem das amostras.

De cada amostra foi tomada uma alíquota (v) e pesada (g); esta foi diluída a 50% (v/v) com água destilada, em seguida, a mistura foi homogeneizada e filtrada em membrana celulósica de 0,22 μm . As amostras foram testadas em triplicata contra micro-organismos cedidos pela Coleção de Culturas de Micro-organismos da Bahia (CCMB/UEFS). As cepas utilizadas foram: *Escherichia coli* CCMB261 (resistente a Sulfonamida), *Staphylococcus aureus* CCMB262 (resistente a Estreptomicina e Dihidroestreptomicina), *Pseudomonas aeruginosa* CCMB268 e *Candida albicans* CCMB266 (isolado clínico).

Para o preparo da suspensão de micro-organismos, colônias de 18-24h de crescimento foram transferidas para um tubo contendo 1,8 mL de solução salina a 0,45%. A densidade da suspensão bacteriana foi ajustada em turbidímetro para a concentração aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ e da levedura, para aproximadamente 5×10^5 UFC.mL⁻¹. De cada suspensão foram tomados 100 μL e estes foram diluídos para 1000 μL com solução salina a 0,45%, resultando em suspensões de 5×10^3 UFC.mL⁻¹ da levedura e $1,5 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ as bactérias.

Placas de Petri estéreis (15 x 150 mm) foram acondicionadas com 100 mL de Ágar Müeller–Hinton (AMH) (Agar Agar Type 1 – HIMEDIA + Caldo Müeller Hinton - HIMEDIA), previamente inoculados e homogeneizados com 100 μL de suspensão de micro-organismo com 5×10^3 UFC.mL⁻¹ para a levedura e $1,5 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ para as bactérias (concentração final do inóculo de 5×10 UFC.mL⁻¹ para a levedura e $1,5 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ para as bactérias na placa). Poços de 6 (seis) mm de diâmetro foram perfurados no ágar inoculado; 75 μL de amostra de mel diluída (50% v/v) e filtrada foram dispensados em cada poço. As placas foram incubadas a 28° C por 48h e 37° C por 24h, levedura e bactérias, respectivamente. Os halos de inibição formados, o diâmetro do poço inclusive, foram medidos em milímetros (mm) em duas diagonais com o auxílio de uma régua; os valores foram somados e divididos por 2 (dois); cada amostra foi analisada em triplicata e foi calculada a média e desvio padrão. Uma amostra com resultado positivo foi definida como aquela com halo superior a 9,0 (nove) mm.

3.2.2.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) é um método quantitativo onde se observa a reação entre a concentração padronizada de um inóculo e o menor valor de concentração da substância em teste necessária para impedir o crescimento do micro-organismo (CLSI 2003a). O teste foi realizado em placas de poliestireno de 96 poços, segundo CLSI (2002), para as leveduras, e CLSI (2003a) para as bactérias, com modificações.

Da placa de cultivo, colônias de 18-24h de crescimento foram retiradas para um tubo contendo 1,8 mL de solução salina a 0,45%. A densidade da suspensão bacteriana foi ajustada para a concentração aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ e da levedura, para aproximadamente 5×10^5 UFC.mL⁻¹. Dessas suspensões foram tomados 10µL e estes diluídos para 1000µL com solução salina a 0,45%, resultando em concentrações de $1,5 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ das bactérias e 5×10^3 UFC.mL⁻¹ da levedura.

Como ilustrado na FIGURA 6, em triplicata, 150µL de amostra de mel diluída e filtrada foram colocados nos primeiros poços da placa (colunas 1, 2, 3..., linha A) já contendo cada um 40µL de CMH [4X] concentrado. Desses primeiros poços foram retirados 95µL da mistura para os poços seguintes já acondicionados com 95µL de caldo MH [1X] concentrado, e assim sucessivamente, caracterizando a diluição seriada, até o oitavo poço de cada coluna (linha H). Os 95µL finais foram descartados. Cinco microlitros das suspensões de micro-organismos foram adicionados aos poços e as concentrações finais foram de $7,5 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ e $2,5 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹ para bactérias e levedura respectivamente, em um volume total de 100µL por poço. A concentração final das amostras no primeiro poço foi de 37,5% (v/v) de mel.

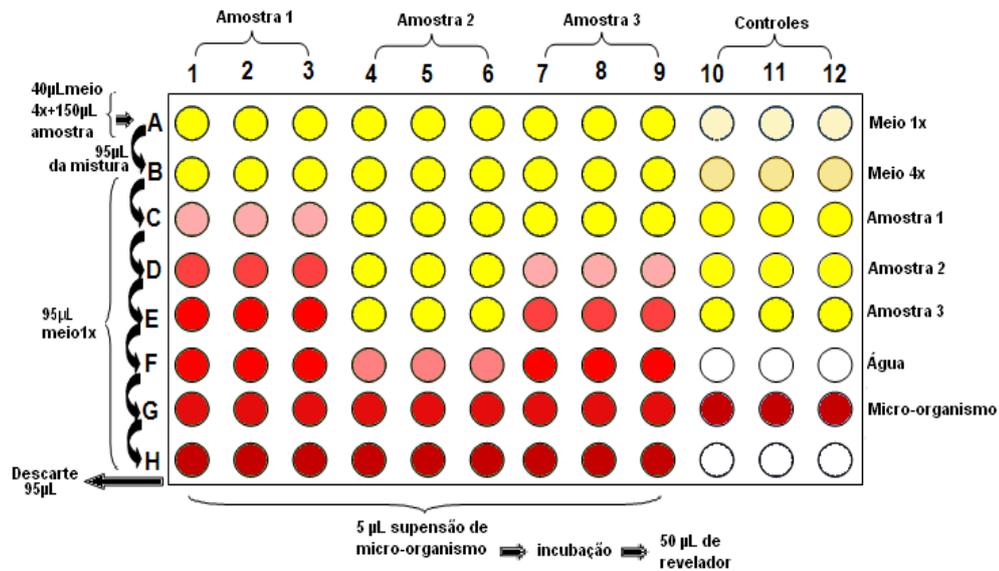


FIGURA 6 - Placa de MIC (esquemático) apresentando aspectos de poços com amostras e poços controles revelados.

As placas foram incubadas em estufa a 37° C por 24h as bactérias e BOD a 28° C por 48h a levedura. Após o período de incubação, estas foram reveladas com 50 µL de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5% em cada poço. As placas foram reincubadas nas respectivas temperaturas e o resultado lido após 3h de incubação, sendo a coloração vermelha indicativo de crescimento microbiano.

O TTC é um corante amplamente utilizado para a revelação de crescimento bacteriano em amostras com interferentes. Incolor na forma oxidada, em contato com as enzimas dos micro-organismos vivos o TTC é reduzido, originando o formazano, composto de cor vermelha, que acumulado no interior dos grânulos das células, facilita a identificação do resultado (SANT'ANA, 2003).

As colunas 10, 11 e 12 da placa de 96 poços (FIGURA 6) mostram os controles realizados. O controle da esterilidade do meio de cultura foi feito com 95 µL nos poços da linha A (meio [1X] concentrado, e B meio [4X] concentrado); da esterilidade das amostras com 50µL de mel diluído a 50% (v/v) + 50µL de meio [1X] concentrado nas linhas C, D e E; da água, com 50µL de água + 50µL de meio [1X] concentrado na linha F, e da viabilidade microbiana com 95µL de meio [1X] concentrado + 5µL (cinco) de suspensão de micro-organismo na linha G, para um volume final de 100µL por poço.

3.2.2.5 Controle de Antibióticos padrões

Para os controles positivos foram utilizados os antibióticos cloranfenicol e gentamicina para as bactérias e o antifúngico nistatina para a levedura. Os testes foram realizados em triplicata.

Dez microlitros do antibiótico cloranfenicol (200mg. mL^{-1}) e $85\mu\text{L}$ de água estéril foram adicionados aos três poços das colunas 10, 11 e 12 (linha A) da placa já acondicionados com $95\mu\text{L}$ de CMH 2X concentrado (CMH[2X]). Em seguida, procedeu-se à diluição seriada até os últimos poços (linha H). Foram adicionados $5\mu\text{L}$ da suspensão do micro-organismo teste em todos os poços. A concentração final do cloranfenicol no primeiro poço foi de 10mg. mL^{-1} .

Noventa e cinco microlitros do antibiótico gentamicina (10mg. mL^{-1}) foram adicionados aos três poços das colunas 10, 11 e 12 (linha A) da placa acondicionados com $95\mu\text{L}$ de CMH [2X] concentrado. De cada poço foram retirados $95\mu\text{L}$ para o poço seguinte, contendo $95\mu\text{L}$ de meio CMH [1X] concentrado, e assim sucessivamente, (diluição seriada) até o oitavo poço da placa. Cinco ($5\mu\text{L}$) da suspensão do micro-organismo teste foram adicionados em todos os poços. A concentração final da gentamicina nos primeiros poços foi de $4,75\text{ mg. mL}^{-1}$. A FIGURA 7 ilustra os controles positivos usados para as bactérias.

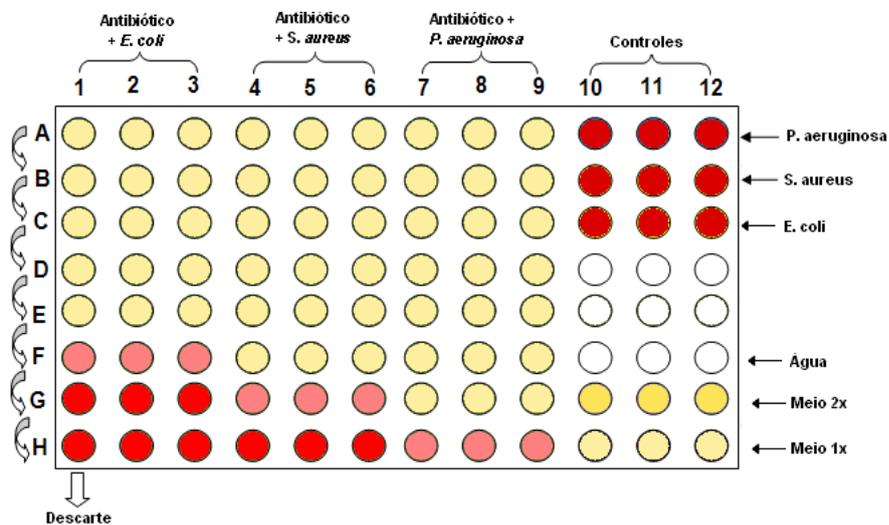


FIGURA 7- Placa de MIC (esquemático) apresentando controle de antibióticos contra bactérias (poços revelados em vermelho à direita superior da placa).

Para verificação da participação do H_2O_2 na atividade antimicrobiana, foi determinada a CIM de méis com atividade comprovada, onde nos primeiros poços da placa (linha A) além da amostra, foram acrescentados três (3) μL de catalase na concentração de 10 mg.mL^{-1} (Mundo et al, 2004), e então procedida a diluição seriada.

3.2.3 Parâmetros Físico-químicos

3.2.3.1 Atividade de água (aW)

A medida do conteúdo de água livre na amostra foi realizada em triplicata em equipamento Aqualab Mod 3TE série 1299510, segundo recomendações do fabricante. A amostra foi colocada na cápsula do equipamento e, em seguida, acionada a chave para leitura. Neste aparelho, esta é realizada de maneira direta quando a amostra, na cápsula, entra em equilíbrio de temperatura com o equipamento. Cada valor emitido corresponde à razão entre a pressão de vapor da água livre (p) na amostra e a da água pura (p_0), à temperatura da análise ($aW = p/p_0$).

3.2.3.2 Cor

A determinação da cor pode ser realizada pela medida da absorção da luz utilizando-se espectrofotômetro Violeta-Visível (UV-Vis) com leitura de densidade óptica a 625 nm segundo escala de Pfund (BIANCHI, 1981). Esta escala consiste em uma cunha milimetrada, com graduações de cores a serem comparadas com a amostra do mel. A resposta é dada em milímetros da escala.

A cor do mel foi feita a partir da absorbância a 635 nm (Abs_{635}) de uma solução de mel diluída a 50%. Após 15 minutos, a leitura foi realizada em triplicata, em espectrofotômetro (Femto 700 Plus-Femto Ind. Com. Instrumentos Ltda.), com

célula quartzo de 10 mm de caminho ótico, zerado com água deionizada. Após a leitura da absorbância de cada amostra a cor foi expressa em mm Pfund e calculada da seguinte forma: $Cor = (371,39 \cdot Abs_{635}) - 38,70$.

A classificação da cor das amostras foi dada pela escala de Pfund (TABELA 3).

TABELA 3 - Escala de Pfund - Cor de Mel em milímetros (mm)

MEL	COR (mm)	Absorbância (635 nm)
Branco – água	0 - 7,9	0,104 - 0,124
Extra – branco	8- 16,4	0,125 - 0,147
Branco	16,5 - 33,9	0,148 - 0,194
Âmbar extra-claro	34 - 49,9	0,195 - 0,237
Âmbar claro	50 - 84,9	0,238 - 0,332
Âmbar	85 - 113,9	0,333 - 0,410
Âmbar escuro	114 ou mais	0,411 ou mais

(BIANCHI, 1981)

3.2.3.3 pH

É a medida do potencial hidrogeniônico de uma solução medido através de pHmetro (AOAC, 1997). Para esta análise foi efetuada a calibração do equipamento segundo o fabricante, com as soluções padrão de pH 4,00 e 7,00. Em balança semi-analítica (Mark 160 – classe II- Bel Engineering) foram pesados 10g de amostras em béquer de 250 mL. As amostras diluídas e homogeneizadas com 75 mL de água livre de CO₂, foram lidas no pHmetro (Medidor de pH Marte MB-10 RS 232), em triplicata, e tiveram registradas as temperaturas.

3.2.3.4 Acidez livre

O método (AOAC 1999), é baseado numa titulação simples dos ácidos livres na amostra utilizando-se pHmetro para acompanhar a medida do pH (potenciometria) até a neutralização, com mudança de cor da fenolftaleína (pH 8,3 a 8,5). Para a análise foi efetuada a calibração do pHmetro com as soluções tampão pH 4,00 e 7,00, segundo instruções do fabricante. Em um béquer de 250 mL, a

amostra (aproximadamente 10g) foi diluída com 75 mL de água isenta de CO₂ e titulada com hidróxido de sódio padronizado (NaOH) 0,05 N num fluxo aproximado de 5 mL por minuto, sendo interrompida a titulação quando a solução alcançou um pH de 8,5. Foi efetuada uma prova em branco com o mesmo volume de água utilizada para diluir a amostra de mel. O teste foi corrido em triplicata.

A acidez livre foi calculada segundo a fórmula:

$$\text{Acidez livre} = N_{\text{NaOH}} * (V_{\text{mL}} \text{ de NaOH } 0,05\text{N utilizados na bureta} - V_{\text{mL}} \text{ branco}) \times 1.000 / M_{\text{amostra}}$$

Onde: M_{amostra} = massa da amostra de mel pesada, em gramas

N_{NaOH} = Normalidade da solução de NaOH padronizada (meq/mL ou eq/L)

1000= fator de conversão de grama para kilograma.

3.2.3.5 Compostos fenólicos

3.2.3.5.1 Fenóis totais

O teor de compostos fenóis totais foi estimado segundo o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, modificado por Beretta et al. (2005) *apud* Bertonecelj (2007), que utiliza o ácido gálico como padrão. Amostras de 2,5 g foram diluídas para 10 mL em balão volumétrico com água destilada e filtradas em papel qualitativo. A 100 µL da solução (25mg de mel puro) foi adicionado 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu a 10%. A mistura foi agitada em vórtex por 2 minutos e armazenada na ausência de luz durante 20 minutos. A absorbância foi lida em espectrofotômetro (FEMTO 700 UV-Vis) a 750nm, contra uma solução análoga de açúcar. O resultado foi expresso em equivalentes de ácido gálico (mg AG/100g), através de curva analítica (0,01 a 1,00 mg.mL⁻¹) com R²= 0,9998.

3.2.3.5.2 Flavonóides Totais

A quantidade estimada de flavonóides totais foi analisada pelo método descrito por Kim, Jeong e Lee (2003), modificado por Blasa et al. (2006), para amostras de mel (AL et al., 2009). Da amostra anterior foram retirados 250 μL (62,5mg de mel puro) mais 750 μL de metanol e 300 μL de nitrito de sódio (NaNO_3) a 5% foram misturados; após 5 minutos foram adicionados 300 μL de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 10%. As amostras foram filtradas em membranas de 0,2 μm ; após 6 minutos a 510 nm foi lida a absorbância da reação colorimétrica resultante, em espectrofotômetro (FEMTO 700). O conteúdo de flavonóides foi expresso em equivalentes de quercetina (mgQE/100g) calculados através de curva padrão (0,1 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) que apresentou $R^2= 0,9997$.

3.2.3.5.3 Compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As substâncias fenólicas foram extraídas do mel segundo modificação da metodologia descrita por Martos (2000), com utilização da resina Amberlite XAD-2. A resina foi colocada em um béquer com metanol suficiente para cobri-la (250mL). Após 15 minutos de agitação o metanol foi eliminado e a resina foi então lavada com água destilada várias vezes (com agitação por 10 minutos) e filtrada em funil de Büchner usando papel de filtro (D'ARCY, 2005). O procedimento foi repetido a cada três eluições de amostras.

A amostra de mel (50g) foi misturada com 250 mL de água destilada acidificada a pH 2 com HCl, e colocada em agitador magnético à temperatura ambiente, até completa dissolução. A amostra foi então filtrada através de algodão para eliminar possíveis partículas suspensas. O filtrado foi agitado com cerca de 75g de Amberlite XAD-2 (partícula 0,3-1,2 mm e poro de 9 nm, Supelco, Bellefonte, PA, E.U.A.), por 30 minutos, e em seguida, empacotado em uma coluna de vidro (45 x 3,5cm). A coluna foi então lavada primeiramente com uma solução ácida (100 mL, pH 2 com HCl), e em seguida com água destilada (300mL) para remover açúcares e outros compostos polares, enquanto as substâncias fenólicas presentes no mel

permaneceram na resina. A fração fenólica adsorvida na coluna foi então eluída com metanol (~ 250 mL). O extrato metanólico obtido foi concentrado à pressão reduzida em evaporador rotatório a 40°C e colocado em capela de exaustão até a secura. O resíduo foi dissolvido em 5 mL de água destilada, e extraído em funil de separação com acetato de etila (3 x 5 mL). As frações orgânicas foram reunidas e o solvente eliminado em capela. O extrato seco foi ressuspenso em metanol (grau HPLC) e filtrado em membrana celulósica de 0,45µm para análise cromatográfica.

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido Shimadzu SCL-10Aup com detector UV. Foi utilizada uma coluna Lichrospher RP-18 (fase reversa) de 12,0 x 0,4 cm, com tamanho de partícula de 5(cinco) mm, usando gradiente binário com uma mistura de água ultra pura (MilliQ), e ácido acético grau espectrométrico (Mallinckrodt Chemicals) na proporção 19:1 (solvente A) e metanol (Mallinckrodt Chemicals) solvente B. O fluxo total da mistura de solventes usado para eluição das amostras foi de 1 mL por minuto; a corrida da amostra foi realizada com gradiente binário em 65 minutos com mais 24 minutos de lavagem e recondicionamento da coluna; a temperatura do forno foi mantida em 30°C e o volume de injeção foi de 20µL. O gradiente de eluição começou com 20% a 30% de solvente B em 10 minutos, modo isocrático com 30% de B até 20 minutos, de 30% a 40% de B em 25 minutos, a 45% de B em 35 minutos, a 60% de B em 55 minutos, e a 80% de B em 65 minutos.

Foram analisados padrões autênticos de quercetina, canferol, apigenina, pinocembrina, galangina, morina, miricetina, tectocrisina, triacetina, luteolina, rutina, cabreuvina, 3,6-dihidroxi-flavona, 5,7-dihidroxi-flavona, ácido p-cumárico, ácido gálico, elágico, e ácido ferúlico (Extrasynthese Co.). Os cromatogramas foram registrados em 254 e 340 nm.

A curva analítica ($R^2= 0.9998$) foi preparada com padrões ($0,5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de ácido p-cumárico, gálico e ferúlico e os flavonóides rutina, 3,6-di-hidroxi-flavona, quercetina e pinocembrina, em metanol grau cromatográfico, filtrados em membrana de 0,45 µm.

Os compostos fenólicos lidos a 254 e 340 nm foram comparados pelos tempos de retenção e espectros UV de padrões autênticos, obtidos em

Cromatógrafo HITACHI Autosampler L-2200, com bombas L-2130, detector de arranjo de fotodiodos L-2455 e forno de colunas L-2300, nas condições anteriores de análise e em dados da literatura (LIANDA, 2009; D'ARCY, 2005).

3.2.4 Estudo da Repetibilidade

Para o estudo da repetibilidade (D'ARCY, 2005) modificado, foram preparados padrões de ácido gálico, rutina e ácido p-cumárico em metanol (10 mL); 5 (cinco) mL foram adicionados a 300 mL de água acidificada pH 2 (dois), por sua vez. Cada alíquota foi misturada com 150 g de Amberlite XAD-2 purificada (Supelco, Bellefonte, PA, EUA, tamanho de poro 9 (nove) nm, partícula tamanho 0,3 - 1,2mm). Foi seguido então o mesmo procedimento adotado para as amostras.

3.2.5 Limite de Detecção e Linearidade

Foi calculada a estimativa do limite de detecção do método segundo a expressão: $LD = 3,3DP / \text{coeficiente angular da curva}$ (DP= desvio padrão), e estimado o limite de quantificação ($LQ = 10DP / \text{Coeficiente angular}$).

A linearidade do método foi determinada pelas curvas analíticas (n=3) cada uma com 5 (cinco) concentrações (31,25 a 500,00 $\mu\text{g/mL}$) de um *pool* de padrões diluídos em metanol, lidos em dois comprimentos de onda (254 e 340nm).

Os testes de precisão ou repetibilidade foram realizados através do cálculo de desvio padrão relativo (DPR) de injeções de amostras repetidas em triplicata no mesmo dia e em dias consecutivos segundo a equação:

$$DPR = (DP / CMD) * 100$$

Onde DP é o desvio padrão, e CMD a concentração média determinada (ANVISA, 2009).

3.2.6 Análise Estatística

Os resultados dos ensaios físico-químicos foram submetidos à análise estatística básica e o coeficiente de correlação (rs) Spearman entre esses parâmetros e as CIM das amostras contra os micro-organismos teste, através do programa BioEstat 5.0. Com os compostos fenólicos, foi realizada análise Multivariada de Correspondência pelo Programa Past Paleontology versão 1.97 (HAMMER et al., 2009).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Atividade antimicrobiana

3.3.1.1 Testes preliminares e difusão em poço

Os testes preliminares para verificação de contaminação microbiana do mel detectaram a presença de micro-organismos. Então, para a análise da atividade antimicrobiana as amostras foram então esterilizadas por filtração. Para determinação da concentração da amostra a ser utilizada na análise de atividade antimicrobiana foram realizados testes com as amostras 1 (um) a 6 (seis) de *Apis mellifera*. Quanto às diferentes diluições das amostras de mel preliminarmente estudadas (50%, 25% e 12,5%) para a avaliação pela técnica de difusão em poço, a diluição escolhida foi a de 50% (v/v), pois apresentaram os halos de maior tamanho e melhor visualização e mensuração. Houve correlação entre a concentração de mel estudada e o tamanho do halo de inibição, sendo na concentração de 12,5% não foi observada inibição para nenhuma das amostras.

Os resultados da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em poço para méis de *A. mellifera* e de abelhas sem ferrão estão apresentados nas TABELAS 4 e 5, respectivamente.

TABELA 4 - Resultados dos testes de difusão em poço através da medida do diâmetro dos halos (mm) de inibição (efeito bactericida) e redução de crescimento (efeito bacteriostático) de méis de *A. mellifera* do estado da Bahia por região econômica contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*

Região	Amostra	Micro-organismos							
		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>	
		Redução(±DP)	Inibição	Redução±DP	Inibição±DP	Redução	Inibição	Redução	Inibição
Litoral									
Norte	11	17,3 (1,5)	---	40,0(3,0)	---	NS	NS	NS	NS
Recôncavo	35	22,7 (2,3)	---	31,8(2,8)	---	---	10,5(3,5)	NS	NS
Sul	36	15,0(1,3)	---	28,0(1,0)	---	NS	NS	NS	NS
	37	18,2(0,8)	---	31,4(2,4)	11,0(0,5)	NS	NS	NS	NS
	1	17,3(2,3)	---	52,0(0,5)	---	NS	NS	NS	NS
	2	NS	---	42,0(1,0)	---	NS	NS	NS	NS
Litoral Sul	3	NS	---	NS	---	NS	NS	NS	NS
	9	16,0(0,0)	---	31,0(1,0)	12,7(0,0)	NS	NS	NS	NS
	15	18,0(0,0)	---	31,3(0,6)	-	NS	NS	NS	NS
	10	15,7(1,5)	---	40,0(2,0)	-	NS	NS	NS	NS
	19	17,8(1,2)	---	36,0(2,0)	12,3(0,6)	NS	NS	NS	NS
Nordeste	20	17,8(1,2)	---	32,7(1,5)	---	NS	NS	NS	NS
	22	NS	---	32,0(0,9)	---	NS	NS	NS	NS
	28	17,8(0,3)	---	32,0(0,5)	---	NS	NS	NS	NS
	32	14,2(0,8)	---	30,5(2,0)	---	NS	NS	NS	NS
Paraguaçu	31	23,8(0,3)	---	30,5(0,9)	---	NS	NS	NS	NS
	33	24,0(0,0)	---	31,2(0,3)	9,7(1,5)	---	13,7(3,2)	---	NS
	7	17,0(0,0)	---	34,0(1,0)	---	NS	NS	NS	NS
Sudoeste	8	16,0(0,0)	---	31,0(2,0)	---	NS	NS	NS	NS
	12	16,5(2,1)	---	32,5(3,0)	12,0(0,0)	NS	NS	NS	NS
	13	15,0(1,7)	---	32,5(0,6)	---	NS	NS	NS	NS

NS= não sensível; --- = não foi visualizada a atividade; DP= desvio padrão

TABELA 4 – (continuação) Resultados dos testes de difusão em poço através da medida do diâmetro dos halos em (mm) de inibição (efeito bactericida) e redução de crescimento (efeito bacteriostático) de méis de *A. mellifera* do estado da Bahia por região econômica contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*

Região	Amostra	Micro-organismos							
		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>	
		Redução(±DP)	Inibição	Redução(±DP)	Inibição	Redução±DP	Inibição	Redução±DP	Inibição
Baixo Médio SãoFrancisco	16	NS	---	33,3(3,1)	---	NS	NS	NS	NS
	29	18,3(1,0)	---	31,3(3,6)	---	NS	NS	NS	NS
Piemonte da Diamantina	4	21,0(1,3)	---	36,1(4,6)	---	NS	NS	NS	NS
	Irecê	30	25,2(2,2)	---	35,3(1,2)	14,0(0,0)	NS	NS	NS
Chapada Diamantina	14	16,0(1,0)	---	30,3(1,5)	---	NS	NS	NS	NS
	17	20,0(0,0)	---	40,0(0,0)	---	NS	NS	NS	NS
	18	20,0(0,0)	---	38,7(1,2)	---	NS	NS	NS	NS
	21	17,3(1,2)	10,7(0,6)	33,3(1,0)	---	NS	NS	NS	NS
	23	24,3(0,6)	---	34,0(2,0)	---	NS	NS	NS	NS
	25	-	28,3(0,6)	34,7(4,0)	---	NS	NS	NS	NS
	26	21,3(1,2)	---	34,7(7,5)	---	NS	NS	NS	NS
27	21,0(1,0)	---	34,7(0,3)	---	NS	NS	NS	NS	
Serra Geral	5	17,8(1,8)	---	35,0(1,0)	---	NS	NS	NS	NS
	6	20,3(0,6)	---	34,5(1,8)	---	NS	NS	NS	NS
	34	19,5(2,0)	---	31,7(1,2)	---	NS	NS	NS	NS
Oeste	24	18,3(2,0)	---	35,2(3,0)	---	NS	NS	NS	NS

NS= não sensível; --- = não foi visualizada a atividade; DP: desvio padrão.

TABELA 5 - Resultados dos testes de difusão em poço através da medida do diâmetro dos halos (mm) que mostram o efeito bacteriostático (redução de crescimento) de méis abelhas sem ferrão do estado da Bahia por região econômica contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*

Região	Amostra	Abelha	Micro-organismos			
			<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
			Redução (\pm DP)			
Nordeste	I	<i>Friseomelita doederleinei</i>	NS	22,0 (0,0)	NS	NS
	II	<i>Melipona asilvai</i>	20,0 (0,0)	30,0 (0,0)	NS	NS
	III	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	20,0 (0,0)	32,7(1,5)	NS	NS
	V	<i>Plebeia</i> sp. <i>Friseomelita doederleinei</i>	NS	17,5 (3,6)	NS	NS
Recôncavo Sul	IV	<i>Tetragonisca angustula</i>	NS	28,0 (2,0)	NS	NS
Metropolitana	VII	<i>Tetragonisca angustula</i>	NS	NS	NS	NS
Paraguaçu	VIII	<i>Melipona scutellaris</i>	17,0 (2,5)	29,0 (3,0)	NS	NS
	IX	<i>Melipona scutellaris</i>	NS	30,0 (7,0)	NS	NS
Sudoeste	XI	<i>Melipona scutellaris</i>	NS	18,8 (4,0)	NS	NS
Paraguaçu	XII	<i>Melipona scutellaris</i>	NS	20,3 (2,5)	NS	NS
C. Diamantina	VI	<i>Melipona scutellaris</i>	16,0 (0,0)	31,3 (1,5)	NS	NS
Nordeste	XIII	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	NS	20,9 (2,3)	NS	NS
	XIV	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	18,0 (1,0)	NS	NS	NS
	XV	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	NS	29,0 (0,5)	NS	NS
B. M. S. Francisco	XVI	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	NS	28,3 (0,5)	NS	NS
X	X	Abelha não identificada	NS	30,5 (2,3)	NS	NS

NS= não sensível; --- = não foi visualizada a atividade; DP: desvio padrão; B. M. S. Francisco= Baixo Médio São Francisco.

Neste ensaio de atividade antimicrobiana (TABELAS 4 e 5), cada micro-organismo mostrou uma sensibilidade diferenciada às amostras de méis de *A. mellifera* e de abelhas sem ferrão, variando de altamente sensível (*S. aureus*) a totalmente resistente (*C. albicans*). Do total de 53 amostras analisadas, 50 (94%) foram efetivas (efeito bactericida ou bacteriostático) contra *S. aureus*, 38 (72%) contra *E. coli*, 2 (4%) frente a *P. aeruginosa* e nenhuma contra *C. albicans* (FIGURA 8).

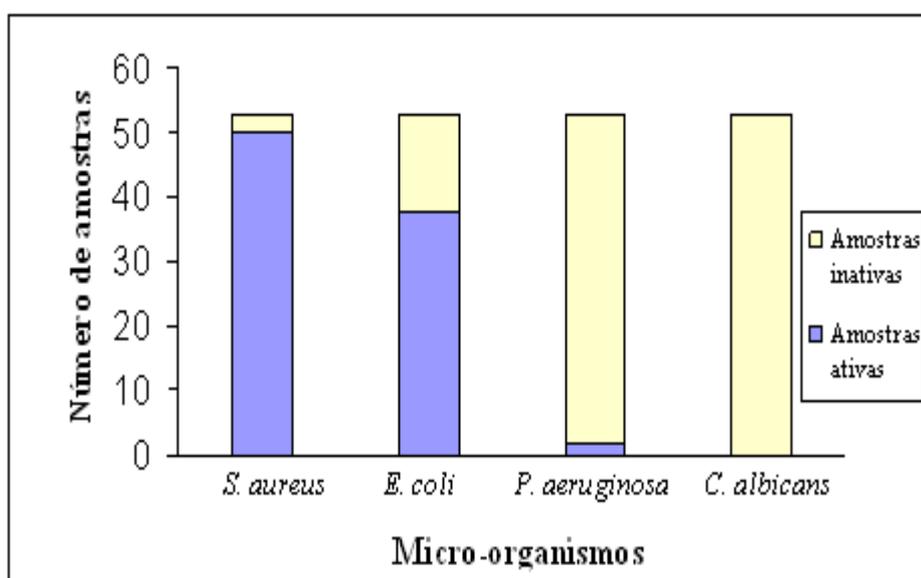


FIGURA 8 - Número de amostras de méis inativas e ativas contra *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* em relação ao total de méis coletados no estado da Bahia analisados por difusão em poço.

As amostras de *A. mellifera* demonstraram ação bactericida frente a *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* e ação bacteriostática contra *E. coli* e *S. aureus*, conforme dados apresentados na TABELA 4. As amostras 9, 12, 19, 30, 33 e 37 tiveram ação bactericida frente a *S. aureus* com halos de 12,7; 12,0; 12,3; 14,0; 9,7 e 11,0mm, respectivamente, e as amostras 21 e 25 frente a *E. coli*, com halos de 10,7 e 28,3 mm. A cepa de *S. aureus* (CCMB 262) utilizada foi sensível a um maior número de amostras (*A. mellifera*) que a de *E. coli* (CCMB 261), apresentando ação bacteriostática, com halos de inibição de crescimento entre 28,0 e 52,0mm e entre 14,2 e 25,2mm respectivamente. A amostra 21 apresentou inibição contra *E. coli*, e a 25 se destacou como a atividade mais intensa, inclusive com valores superiores àqueles encontrados para *S. aureus* que foi inibido pelas amostras 9, 12, 19, 30, 33

e 37, porém com halos menores. A cepa de *P. aeruginosa* utilizada (CMBB 268) apresentou baixa sensibilidade aos méis trabalhados, e foi inibida apenas por duas amostras: a 33 (Região do Paraguaçu) com halo mais expressivo (13,7mm) e a amostra 35 (Recôncavo Sul com inibição mais discreta (halo de 10,5mm). A FIGURA 9 mostra placas com halos de redução de atividade microbiana produzidos por amostras de mel de *A. mellifera* contra *S. aureus* e contra *E. coli*.

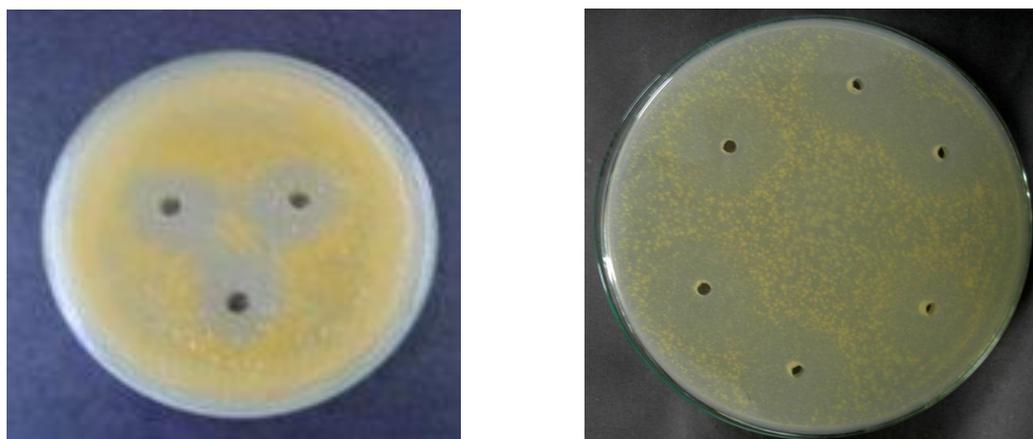


FIGURA 9 - Placas com ágar Müller-Hinton mostrando halos de ação bacteriostática de amostras de mel de *Apis mellifera* do estado da Bahia contra *E. coli* CCMB261 (direita), e *S. aureus* CCMB262 (esquerda) .

Das 37 amostras avaliadas méis de *Apis mellifera*, 36 (97%) apresentaram ação bacteriostática e 6 (seis) (16%), ação bactericida frente a *S. aureus*. Frente a *E. coli*, 32 (87%) amostras demonstraram ação bacteriostática e 2 (duas) (5%) ação bactericida. Contra *P. aeruginosa* apenas ação bactericida foi observada, em 2 (duas) das amostras, o que corresponde a 5% do universo avaliado (TABELA 4).

Cooper (1999), verificando as propriedades antimicrobianas do mel de Manuka e mel de pastagem [Honey Grass (*Paspalum dilatatum* Poir.)], uma gramínea perene de alto valor forrageiro (GARCIA et al. 2002), inoculou *Pseudomonas* spp. isoladas de 20 feridas infectadas, na superfície de placas de ágar nutriente com várias concentrações de mel. A concentração inibitória mínima do mel Manuka para os 20 isolados variou 5,5 a 8,7% (v/v) e a do mel de pastagem esteve entre 5,8 e 9,0% (v/v). Em estudo com 345 amostras de méis da Nova Zelândia a atividade registrada apresentou variações de até vinte vezes o menor

valor encontrado, com um grande número (36%) apresentando baixa atividade, próxima ou abaixo do nível de detecção (HONEY, 2009). Lusby et al. (2005), analisando méis da Oceania com proposta terapêutica e comparando-os com méis terapêuticos comerciais como Medihoney e mel de manuka, encontraram resultados positivos contra 13 bactérias, porém negativo contra *C. albicans*, da mesma forma que os resultados do presente estudo. Em seu trabalho, Lusby (2005) utilizou concentrações de 0,1 a 20% de mel, e das 13 bactérias testadas, 12 foram inibidas por todos os méis analisados. Pouca ou nenhuma atividade antibacteriana foi observada nas concentrações de mel <1%, e a 5% a inibição registrada foi mínima, sendo a *Serratia marcescens* e a levedura *Candida albicans* resistentes. Os méis locais tiveram variada atividade inibitória contra as bactérias, e os méis controles (Medihoney e o mel de manuka) apresentaram de modo geral as melhores atividades. Ainda assim, o autor concluiu, que méis ainda desconhecidos como antimicrobianos, podem ser uma valiosa fonte desses produtos com indicação terapêutica no futuro.

Vargas (1996) analisando méis de *A. mellifera* do Paraná (Brasil), pelo método de cilindros em placa, usando ágar como meio de difusão, encontrou halos de inibição para *E. coli* que variaram 16,0mm a 31,0mm, e contra *S. aureus*, valores entre 21,0 e 44,0mm. Embora não seja possível correlacionar estes resultados com aqueles encontrados neste trabalho, fica evidenciada a tendência da maior sensibilidade do micro-organismo *S. aureus* quando comparado a *E. coli*.

Uma maior sensibilidade da bactéria Gram-positiva (*S. aureus*, no presente estudo) já era esperada, pois bactérias Gram-negativas, como *P. aeruginosa* e *E. coli*, e leveduras, como *C. albicans*, apresentam uma resistência intrínseca a agentes antimicrobianos quando comparadas a *S. aureus* (TORTORA, FUNKE e CASE, 2005). Esta resistência das bactérias Gram-negativas tem sido atribuída à sua membrana externa de lipopolissacarídeos de baixa permeabilidade (SLAMA, 2008; PRESCOTT, HARLEY e KLEIN, 2002). A resistência também pode ser adquirida através de vários mecanismos, entre os quais a alteração do sistema de efluxo multidrogas, que evita o acúmulo do agente antimicrobiano no interior da célula. Isto impede que a substância atinja seu alvo e/ ou a concentração necessária para se tornar letal à célula ou produza mutação na parede celular. Esta mutação da

parede celular pode levar à redução nos canais de porina que são importantes para o transporte de alguns antibióticos pequenos (LAMBERT, 2002).

As leveduras por sua vez, possuem estrutura celular semelhante à dos outros eucariotos, e a parede celular, de composição química bastante complexa, é constituída por 80 a 90% de carboidratos (PORTELA, 2006), podendo estar ligados a proteínas ou lipídeos, polifosfatos e íons inorgânicos formando a matriz de cimentação (FUKUDA et al., 2009). A porção polissacarídica da parede celular das leveduras é composta por polímeros de glucose com ligações β -1,3 e β -1,6 (β -glucanas); polímeros de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) com ligações β -1,4 (quitina) e polímeros de manose (manana) em associação covalente com proteínas (glico[mano]proteínas), além de proteínas (6 a 25%) e uma pequena porção de lipídeos (1 a 7%). A função estrutural dos polímeros de β -glucanas e quitina é a formação de um rígido esqueleto que confere forte propriedade física à célula (PORTELA 2006), protegendo-a contra injúrias mecânicas, evitando a lise osmótica do protoplasto e bloqueando o ingresso de moléculas tóxicas como certos produtos fungicidas (FUKUDA et al. 2009).

As amostras de méis de abelhas sem ferrão apresentaram somente ação bacteriostática frente aos micro-organismos *E. coli* e *S. aureus* conforme dados da TABELA 5. Das 16 amostras avaliadas, 14 (87,5%) apresentaram atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, 5 (cinco) (31,2%) frente a *E. coli* e nenhuma foi ativa frente a *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Os valores contra *S. aureus* oscilaram de 17,5mm (amostra V, da abelha Mirim, região Nordeste) a 32,7mm (amostra III, da abelha mandaçaia, região Nordeste), valores mais expressivos que aqueles contra *E. coli*, cujos valores variaram de 16,0 a 20,0mm.

Comparando-se os resultados obtidos para méis de *A. mellifera* e de abelhas sem ferrão, podemos ver que de maneira geral a atividade dos dois tipos de méis foi basicamente a mesma considerando os micro-organismos; os dois tipos de méis foram inativos contra *C. albicans*, muito pouco ou inativos contra *P. aeruginosa* e ativos frente *E. coli* e principalmente contra *S. aureus*. No entanto, se comparados os resultados dentro de cada tipo de mel (de *Apis* ou de abelhas sem ferrão) pode-se verificar que as amostras apresentaram atividades diferenciadas segundo cada micro-organismos. Pode ser observado também que méis coletados nas mesmas

regiões apresentaram certa variação nas atividades de inibição ou redução do crescimento microbiano, conforme demonstrado pelas amostras 14, 17, 18, 21, 23, 25, 26 e 27 de *A. mellifera* (TABELA 4) e as amostras XIII e XIV de *Melipona quadrifasciata anthidioides* (TABELA 5), todas provenientes da Chapada de Diamantina. Estas variações da atividade antimicrobiana dos méis coletados na mesma região podem estar relacionadas à sua origem floral, que por sua vez depende do período de produção do mel. Embora a divisão por microrregião socioeconômica seguida neste estudo não seja apropriada para embasar conclusões sobre a atividade biológica de cada amostra (é uma separação política), pode de certa forma apontar características geográficas, de clima e vegetação, ligados à composição do mel, e conseqüentemente à sua ação biológica.

Quanto à espécie de abelha produtora, embora pelo método de difusão em poço os resultados dos méis de *A. mellifera* tenham sido mais destacados (inclusive com ação bactericida), não nos parece conclusivo, pois o número de amostras de abelhas nativas foi cerca de 50% inferior (divididos em seis espécies) ao de *A. mellifera* analisadas.

Chanchao (2009) estudando méis tailandeses de *Trigona laeviceps*, de Samut Songkram, diluídos a 50%, contra *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*, *Auriobasidium pullulans* e *Aspergillus niger* encontraram halos entre 25,4 e 16,6mm respectivamente para cada micro-organismo. Martins et al. (1997), analisando méis de *A. mellifera* e de abelhas sem ferrão (*Melipona subnitida*, *Melipona scutellaris*, *Scaptotrigona bipunctata*) do estado do Ceará, Brasil, encontraram halos de inibição do crescimento de 22,0mm a 25,0mm para *S. aureus* e 20,0mm a 28,0mm para *E. coli* concluindo que os dois tipos de mel apresentaram atividade antimicrobiana em níveis semelhantes. Já Gonçalves (2005), analisando méis brasileiros de *Nannotrigona testaceicornis* (abelha sem ferrão) de São Paulo, contra micro-organismos patogênicos retirados de isolados clínicos, detectou halo de sensibilidade de 19,0mm contra *E. coli*, de 11,0mm para *P. aeruginosa* e resistência de *S. aureus*.

Comparando-se a atividade entre os tipos de méis analisados neste trabalho (de *A. mellifera* e de abelhas sem ferrão), pode ser visto que os méis de *A. mellifera* contra *E. coli* e *S. aureus* foram mais ativos (89,2% e 97,3% respectivamente) que

os méis de abelhas sem ferrão, 31,2 % frente a *E. coli* e 87,5% contra *S. aureus*. Estes resultados diferem daqueles encontrados para esses micro-organismos nos trabalhos acima citados. Na verdade, para uma efetiva comparação entre parâmetro tão susceptível de variação como a atividade biológica, onde vários fatores interferem e determinam diferenças, é absolutamente necessária a utilização de critérios de análise padronizados. A técnica de análise empregada, o micro-organismo teste, a cepa, a concentração do inóculo e da amostra, a espécie de abelha produtora, a localização geográfica, o período de produção e a vegetação origem dos méis entre outros, são aspectos importantes a serem considerados. De acordo com Molan (1992), a comparação da sensibilidade de determinada espécie em relação à outra só pode ser validamente determinada dentro de um mesmo estudo onde o mel e as condições do teste sejam as mesmas. Molan (1992) acrescenta que *Staphylococcus aureus* é um dos micro-organismos mais usados nesses estudos comparativos, e pode ser visto como uma das espécies mais sensíveis ao mel. Os méis do estado da Bahia (tanto de *A. mellifera* quanto de abelhas sem ferrão) apresentaram atividade contra micro-organismos patogênicos Gram-positivo e Gram-negativos, a exemplo de méis de outras origens (CHANCHAO, 2009; VARGAS 2006; WILLIX 1992; MOLAN, 1992), com maior ação contra *S. aureus*.

Nos controles realizados para verificação da sensibilidade das cepas bacterianas, estas se mostraram resistentes ao cloranfenicol na concentração de 0,005 mg.mL⁻¹ e 0,010 mg.mL⁻¹, e sensíveis à gentamicina nas duas concentrações, embora com halos diferenciados. A levedura *C. albicans* foi sensível a ambas as concentrações do antifúngico nistatina. Os resultados estão na TABELA 6.

TABELA 6 - Halos de ação bactericida (mm) dos antibióticos gentamicina e cloranfenicol usados contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* e o antifúngico nistatina usado contra *C. albicans*

Antimicrobianos	Micro-organismos						
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>
	Gentamicina	Cloranfenicol	Gentamicina	Cloranfenicol	Gentamicina	Cloranfenicol	Nistatina
	Médias dos halos de inibição em mm ± (DP)						
0,005mg.mL ⁻¹	14,8 (0,6)	NS	23,0 (0,8)	NS	16,8 (2,9)	NS	19,0 (0,0)
0,010mg.mL ⁻¹	17,5 (0,5)	NS	25,3 (3,5)	NS	18,3 (2,1)	NS	24,2 (0,0)

NS= não sensível.

Os controles realizados com substâncias antimicrobianas puras (antibacterianos e antifúngico) tiveram como objetivo principal a comparação entre experimentos realizados em diferentes momentos. Comparando-se os valores dos halos de inibição (TABELAS 4 e 5) com os registrados para os antibióticos (TABELA 6), destaca-se mais uma vez a atividade observada para a amostra 25, frente a *E. coli* (28,3mm) que foi superior ao da gentamicina (17,5mm). Nas condições de análise, as demais amostras tiveram desempenho inferior aos antibióticos testados.

Embora de modo geral as amostras tenham apresentado atividade menos expressiva que os antibióticos, é importante considerar que estes são substâncias sintéticas e purificadas, com alvos de ação estabelecidos, enquanto que o mel é uma mistura complexa com proporções variadas de constituintes. Ainda assim, o mel tem apresentado eficácia no controle de vários eventos hospitalares (feridas cirúrgicas infectadas, úlceras de pressão, queimaduras), em casos de resistência microbiana onde a terapia convencional tenha falhado, constituindo-se em uma alternativa potencial para o controle microbiano (TAJIK et al., 2009; NAMIAS, 2003; TAORMINA, 2001; MOLAN, 2001; COOPER et al., 1999; EFEM, 1988).

3.3.1.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Todas as amostras de méis de *A. mellifera* (1 a 37) foram analisadas para determinação da CIM frente às cepas selecionadas para estudo (TABELA 7), bem como as amostras de méis de abelhas sem ferrão I a XVI (TABELA 8), através da técnica de microdiluição em caldo, em placa de 96 poços como exemplificado a seguir (FIGURAS 10 e 11).

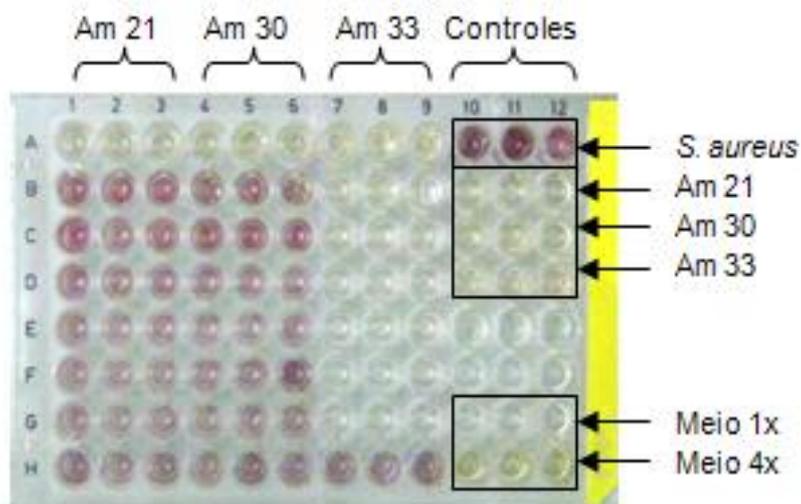


FIGURA 10 - CIM de amostra 21, 30 e 33 de mel de *A. mellifera* do estado da Bahia contra *S.aureus*; em detalhe poços controle da viabilidade do micro-organismo, da esterilidade das amostras e dos meios de cultura.

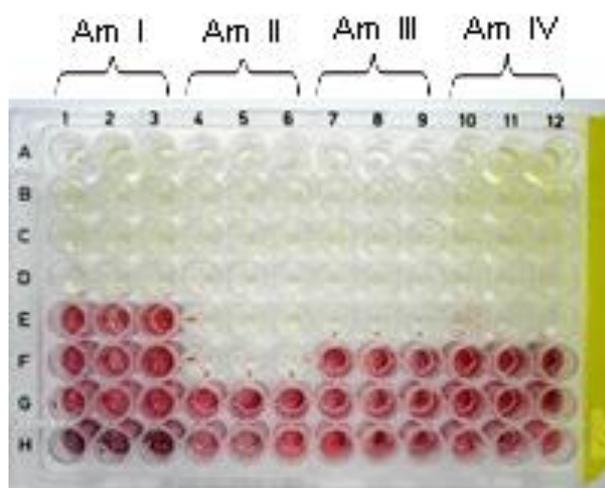


FIGURA 11 - Placa mostrando CIM de méis de abelhas sem ferrão do estado da Bahia contra *S. aureus* CCMB 262. Am.I= *Friseomelita doederleinei*; Am.II= *Melipona asilvai*; Am.III= *Melipona quadrfasciata anthidioides*; Am.IV= *Tetragonisca angustula*; Am.=amostra; poços em vermelho=crescimento de micro-organismo; poços transparentes = inibição de micro-organismo.

TABELA 7 - Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (mg.mL⁻¹) de méis de *Apis mellifera* do estado da Bahia frente aos micro-organismos testes: *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*

Região	Amostra	Concentração Inibitória Mínima (mg.mL ⁻¹)			
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Litoral Norte	11	470	59	235	NS
	35	62	32	62	503
Recôncavo Sul	36	64	32	64	508
	37	60	30	60	466
Litoral Sul	1	237	270	135	NS
	2	37	18	18	NS
	3	29	7	14	NS
	9	252	63	32	NS
	15	493	246	493	493
Nordeste	10	465	58	465	465
	19	210	62	NS	NS
	20	239	120	120	478
	22	466	233	233	466
	28	260	130	130	520
Paraguaçu	32	512	256	256	512
	31	474	237	237	NS
Sudoeste	33	16	8	8	NS
	7	247	247	247	494
	8	480	120	240	480
	12	25	62	62	NS
	13	505	63	252	505

TABELA 7 - (continuação) Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (mg.mL^{-1}) de méis de *Apis mellifera* do estado da Bahia frente aos micro-organismos testes: *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*

Região	Amostra	Concentração Inibitória Mínima (mg.mL^{-1})			
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Baixo Médio São Francisco	16	512	256	512	512
	29	251	63	125	501
Piemonte da Diamantina	4	262	131	262	NS
Irecê	30	507	507	254	NS
Chapada Diamantina	14	526	66	263	526
	17	471	118	236	471
	18	479	120	120	479
	21	512	512	512	NS
	23	517	258	258	258
	25	466	466	466	NS
	26	474	237	237	474
	27	459	230	230	459
Serra Geral	5	245	122	122	NS
	6	475	237	237	NS
	34	543	136	272	543
Oeste	24	444	222	222	444

TABELA 8 - Resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (mg.mL^{-1}) do mel de abelhas sem ferrão, coletados na Bahia, frente aos micro-organismos testes: *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*

Região	Amostra	Abelha	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Nordeste	I	<i>Friseomelita doederleinei</i>	72	72	NS	NS
	II	<i>Melipona asilvai</i>	74	19	NS	NS
	III	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	70	35	NS	NS
	V	<i>Plebeia</i> sp.	254	254	NS	NS
Recôncavo Sul	IV	<i>Tetragonisca angustula</i>	132	33	NS	NS
Metropolitana	VII	<i>Tetragonisca angustula</i>	123	123	147	NS
Paraguaçu	VIII	<i>Melipona scutellaris</i>	493	123	246	NS
	IX	<i>Melipona scutellaris</i>	265	55	132	NS
	XI	<i>Melipona scutellaris</i>	241	120	68	NS
Sudoeste	XII	<i>Melipona scutellaris</i>	257	525	239	NS
Chapada Diamantina	VI	<i>Melipona scutellaris</i>	175	37	127	NS
Nordeste	XIII	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	184	92	64	NS
	XIV	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	187	47	64	NS
	XV	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	174	87	NS	NS
Baixo Médio São Francisco	XVI	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	369	92	NS	NS
X	X	---	515	196	196	NS

*--- = não realizado; ---** = Abelha em processo de identificação.

Foram também realizados testes da CIM com os antibióticos cloranfenicol e gentamicina contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e do antifúngico nistatina contra *C. albicans* (TABELA 9).

TABELA 9 – Resultados da determinação da CIM (mg.mL^{-1}) dos antimicrobianos gentamicina, cloranfenicol e nistatina usados como controle contra os micro-organismos testes: *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*

Antimicrobianos	CIM (mg.mL^{-1})			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Gentamicina	0,005	0,009	< 0,005*	--**
Cloranfenicol	10,00	< 0,078*	1,25	--
Nistatina	--	--	--	<625.10 ⁻⁵

*O crescimento microbiano foi impedido até o último poço; **-- = teste não realizado.

Comparando-se os valores da CIM (TABELAS 7 e 8) encontrados para as amostras de méis, com aqueles registrados para os antibióticos (TABELA 9), pode-se notar que também por este método os micro-organismos testados foram mais sensíveis aos antibióticos do que às amostras analisadas. Mas segundo Aligiannis et al. (2001), ainda não existe um consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais quando comparados aos antibióticos padrões, sendo que alguns autores consideram somente atividade quando as amostras apresentam valores similares aos fármacos, enquanto outros consideram valores inferiores.

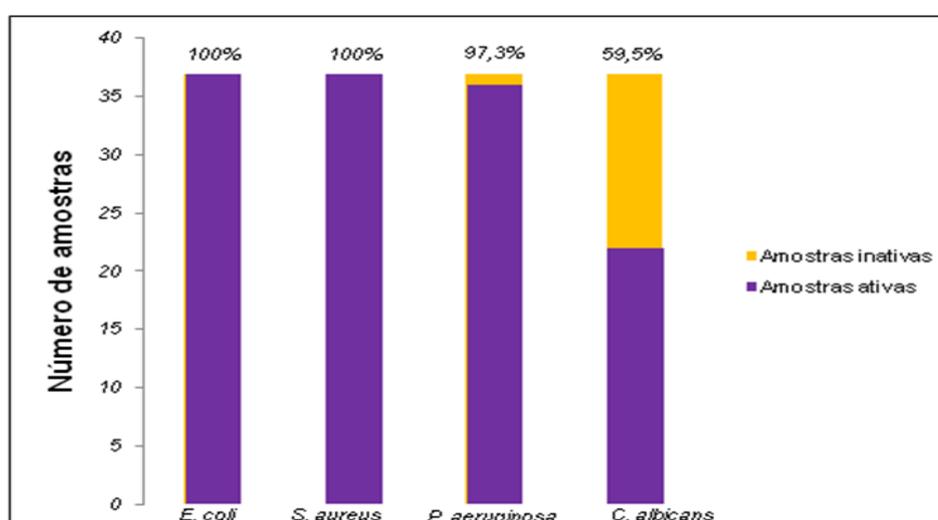


Figura 2- Número de amostras ativas e inativas através da técnica de determinação da CIM contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* em relação ao total de méis de *A. mellifera* coletados no estado da Bahia.

Como pode ser visto na FIGURA 12, neste estudo a cepa de *C. albicans* foi afetada por 59,5% e *P. aeruginosa* por 97,3% das amostras, enquanto *E. coli* e *S. aureus* foram inibidos por 100% dos méis de *A. mellifera* testados. Este último micro-organismo mostrou-se o mais sensível, pois foi inibido pelas menores concentrações de mel (7 e 8 mg.mL⁻¹).

Conforme a TABELA 7, das 37 amostras de mel de *A. mellifera* testadas, 14 apresentaram valores de CIM inferiores a 66 mg.mL⁻¹, com destaque para as amostras 3 e 33 (regiões Litoral Sul e do Paraguaçu, respectivamente) que inibiram o crescimento de *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* em concentrações mais baixas (entre 7 e 29mg.mL⁻¹), onde o mel natural diluído nove vezes, ou seja em concentrações inferiores a 3%, ainda foi efetivo contra a concentração padrão de micro-organismo do ensaio. De igual maneira, a amostra 2 (dois), do Litoral Sul, foi eficaz contra esses micro-organismos, com destaque para o resultado obtido frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa*, com valores de CIM de 18 mg.mL⁻¹. A amostra 12 (Sudoeste) inibiu as bactérias testadas (com valor de CIM de 62 mg.mL⁻¹ frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa*), com destaque contra *E. coli* com CIM de 25 mg.mL⁻¹. As amostras 35, 36 e 37, méis do Recôncavo, apresentaram atividade expressiva contra *E. coli* (60 a 64 mg.mL⁻¹), *S. aureus* (30 a 32 mg.mL⁻¹) e *P. aeruginosa* (60 a 64 mg.mL⁻¹), e leve ação contra *C. albicans* (466 a 508 mg.mL⁻¹). Cabe ainda ressaltar a amostra 9 (nove) com valor de CIM de 32 mg.mL⁻¹ contra *P. aeruginosa*, bem como as amostras 9, 10, 11, 13, 14, 19 e 29, que foram ativas em baixas concentrações (de 58 a 66 mg.mL⁻¹) frente a *S. aureus*.

Quanto ao mel de abelhas sem ferrão, enquanto todas as amostras foram capazes de inibir o crescimento de *E. coli* e *S. aureus* e 43,8% inibiram o crescimento de *P. aeruginosa*, nenhuma delas foi ativa frente a *C. albicans* (FIGURA 13).

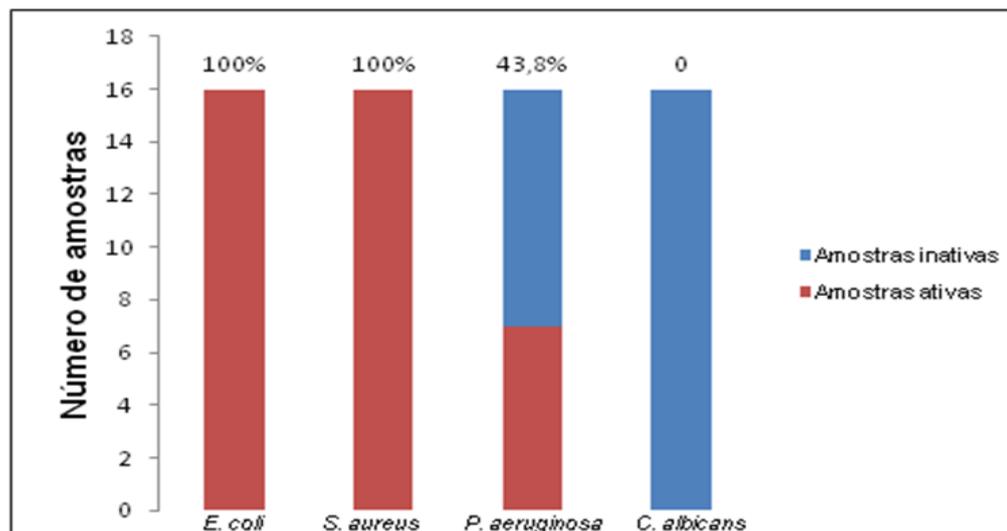


FIGURA 13 - Número de amostras ativas e inativas (CIM) contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* em relação ao total de méis de abelhas sem ferrão coletados no estado da Bahia.

Os dados da TABELA 8 mostram a maior sensibilidade de *S. aureus* frente às amostras II, III, IV, VI IX e XIV (méis de duas espécies de meliponas e de duas trigonas) com valores de CIM entre 19 e 55 mg.mL⁻¹, com destaque para a amostra II, de menor CIM (19 mg.mL⁻¹), produzida por abelha pertencente à tribo *Meliponini*. No caso de *E. coli*, as amostras com melhor desempenho (I, II e III) apresentaram valores próximos de CIM (entre 70, e 74 mg.mL⁻¹), são de ambas as tribos (*Trigonini* e *Meliponini*). Nesta amostragem não foi possível estabelecer diferenças significativas da atividade antimicrobiana entre as tribos e nem entre espécies dessas abelhas, devido ao baixo número de indivíduos dos diferentes grupos estudados dentro do grupo de abelhas sem ferrão.

Analisando as TABELAS 7 e 8, pode-se observar também que há uma grande diferença nos valores de CIM entre méis oriundos da mesma região, como no caso das amostras 1 (um) e 9 (nove), ambas provenientes do litoral Sul, e das amostras VIII e IX, provenientes da região do Paraguaçu. No caso das amostras 1(um) e 9 (nove) de *A. mellifera* esta variação na ação antimicrobiana pode estar relacionada ao fato de serem amostras de localidades diferentes, coletadas em datas distintas, certamente com diferenças na origem floral. As amostras VIII e IX embora tenham sido coletadas na mesma data, são de colméias distintas; os valores de pH (3,7 e 3,4) exibem apenas variação discreta mas, a acidez (28,9 e 44,5 respectivamente)

poderia explicar a mudança na ação biológica sugerindo diferenças na origem floral do mel.

Anklam (1998) e D'Arcy (2005) acreditam que a composição química do mel, e conseqüentemente sua ação antimicrobiana, pode variar conforme o clima, as espécies de plantas disponíveis para coleta, a contribuição da abelha, entre outros fatores. E que, como antes citado, a caracterização da origem botânica do mel é um aspecto de importância para o monitoramento de sua qualidade e ação biológica.

Comparando-se os resultados da difusão em poço (TABELAS 4 e 5) com aqueles da CIM (TABELAS 7 e 8), podemos encontrar à primeira vista alguma discordância de resultado, mas também similaridades. A levedura *C. albicans* (isolado clínico) foi a mais resistente dentre as amostras testadas nos dois métodos utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana. Entretanto, a bactéria *P. aeruginosa* apresentou resultados diferenciados tendo o seu crescimento inibido por 6 (seis) das amostras de méis de *A. mellifera*, variando a CIM de 8 mg.mL⁻¹ a 512 mg.mL⁻¹, embora no teste da difusão em poço apenas a amostra 33 tenha sido ativa contra este micro-organismo.

Os resultados da CIM evidenciam que todos os méis testados por esta metodologia apresentam atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *S. aureus*, e a maioria contra *P. aeruginosa* e *C. albicans*, em diferentes níveis de inibição. Comparando-se as amostras de méis 30 e 33 (*A. mellifera*), verifica-se que embora estas tenham apresentado ação frente a *E. coli* e *S. aureus*, com valores de halos de redução/inibição próximos entre si pelo método da difusão em poço, a CIM registrada frente a esses micro-organismos foi cerca de 30 vezes menor para a amostra 33 frente a *E. coli* e cerca de 60 vezes menor que a amostra 30 contra *S. aureus*. Um dado importante a ser considerado é a atividade registrada pela amostra 3 (três) de *A. mellifera*, que no teste da difusão em poço não apresentou inibição do crescimento contra nenhum dos micro-organismos testados, embora tenha registrado um dos menores valores de CIM se comparada às outras amostras (30 mg.mL⁻¹ contra *E. coli*, 7mg.mL⁻¹ contra *S. aureus* e 14mg.mL⁻¹ contra *P. aeruginosa*). Do mesmo modo, pelo método da difusão em poço as amostras I, IV, V, IX e X (abelhas sem ferrão) foram inativas frente a *E. coli*, e a amostra VII, inativa

contra *S. aureus* e *E. coli*; pelo método da CIM esses micro-organismos apresentaram sensibilidade (em níveis variados), a 100% das amostras.

Embora o método de difusão em poço seja recomendado como método de triagem para selecionar as amostras mais eficazes para a determinação da CIM, este é um teste qualitativo, que alguns autores defendem por reproduzir no meio, a situação de uma ferida e a difusão da amostra no tecido (GONÇALVES, 2005). Outros pesquisadores, no entanto, ressaltam a sua falta de sensibilidade (BLACK 2002; JAMES et al. 1972), pois como a substância testada vai se diluindo conforme se difunde no ágar, substâncias antimicrobianas de maior massa molecular podem apresentar dificuldade de difusão no meio sólido e assim não produzem um halo de inibição ou de redução de crescimento microbiano. Apesar disso, é considerado um ensaio apropriado para agentes tópicos, porque baseia-se na difusibilidade (GONÇALVES, 2005; ALLEN et al., 1991), característica de grande importância na avaliação do mel, considerando que este é visto como um agente tópico ideal no tratamento de infecções cirúrgicas, queimaduras e feridas infectadas (EFEM et al., 1992; JAMES et al., 1972). Assim, atendo-se à variedade de compostos que formam o mel, acredita-se que a capacidade de difusão poderia, em alguns casos, interferir na ação de compostos importantes na atividade antimicrobiana, motivando os resultados contraditórios e dificultando a análise entre as duas metodologias utilizadas no presente trabalho.

Por outro lado, os dados desta pesquisa reafirmam que um mel para ser usado como agente terapêutico deve ser selecionado através de análises. A determinação de seus constituintes é de suma importância para o estabelecimento de sua origem, devida padronização e indicação de uso, a exemplo de méis como o de Manuka, da Nova Zelândia e o *Echium vulgare* e *Leptospermum polygalifolium*, da Austrália (WESTON, 2000b), comercializados com indicações terapêuticas definidas.

3.3.2 Determinações físico-químicas e atividade biológica

A qualidade do mel é resultado das características físico-químicas dos seus constituintes, e estas por sua vez vão determinar a sua atividade biológica. Dessa forma, a análise de alguns parâmetros, se faz necessária para o estudo e entendimento da atividade antimicrobiana (PARK, 2005). Assim foram analisados aqueles parâmetros que pudessem incidir na atividade biológica, como o pH, a acidez, a atividade de água e compostos do metabolismo secundário de plantas (compostos fenólicos e flavonóides) e a cor, que apesar de não constituir um fator determinante da atividade, é visto por alguns autores como indicador da ação antimicrobiana, com vistas a averiguar a contribuição de cada um na atividade do mel.

3.3.2.1 Acidez e pH

Na TABELA 10 estão reunidos os dados de pH, acidez e a floração (informada pelos comerciantes) das amostras de méis de *A. mellifera*, e os dados dos méis de abelhas sem ferrão estão expostos na TABELA 11.

TABELA 10 – Valores de pH, acidez e florada de méis de *Apis mellifera* do estado da Bahia por microrregiões socioeconômicas

Região	Amostra	Média dos valores (\pm D P)		
		pH	Acidez (meq Kg ⁻¹)	Florada
2 Litoral Norte	11	3,9 (0,0)	41,3 (0,7)	Silvestre
3Recôncavo Sul	35	4,0 (0,0)	38,1(1,2)	Silvestre
	36	3,9 (0,0)	42,0(1,2)	Silvestre
	37	3,9 (0,0)	39,0 (0,4)	Silvestre
4 Litoral sul	1	4,0 (0,0)	24,8 (0,8)	Silvestre
	2	4,0 (0,0)	36,7(2,4)	Silvestre
	3	3,7 (0,2)	46,4(3,4)	Silvestre
	9	4,0 (0,0)	52,4 (1,3)	Silvestre
	15	3,9 (0,0)	44,0(0,6)	Silvestre
6 Nordeste	10	3,9 (0,0)	17,7 (1,3)	Silvestre
	19	5,4 (0,0)	14,4(0,8)	Silvestre
	20	3,9 (0,0)	65,8(4,6)	Silvestre
	22	3,7 (0,0)	47,2 (0,6)	Ervanço
	28	3,9 (0,0)	40,9(0,9)	Silvestre
	32	3,7 (0,1)	30,8 (2,5)	Silvestre
7 Paraguaçu	31	4,0 (0,0)	36,6(3,5)	Silvestre
	33	4,0 (0,0)	45,8 (0,4)	Silvestre
8 Sudoeste	7	4,0 (0,4)	16,9 (1,1)	Aroeira
	8	4,0 (0,0)	21,8 (0,6)	Silvestre
	12	3,8 (0,0)	34,0 (1,4)	Silvestre
	13	3,8 (0,0)	28,4 (0,4)	Algaroba

TABELA 10 – (cont.) Valores de pH, acidez e florada de méis de *Apis mellifera* do estado da Bahia por regiões econômicas

Região	Amostra	Média dos valores (\pm D P)		
		pH	Acidez (meq Kg ⁻¹)	Florada
9 Baixo Médio S. Francisco	16	3,7 (0,1)	24,7(0,3)	Valtéria
	29	2,9 (0,0)	115,1 (0,9)	Silvestre
10 Piemonte da Diamantina	4	3,8 (0,0)	26,7 (0,1)	Silvestre
11 Irecê	30	3,9 (0,0)	34,7 (3,3)	Silvestre
12 Chapada Diamantina	14	3,8 (0,0)	24,9 (1,0)	Candeia/Assa-Peixe
	17	4,3 (0,0)	20,0 (1,3)	Silvestre
	18	4,0 (0,0)	36,3 (1,2)	Silvestre
	21	4,4 (0,0)	28,8 (3,9)	Silvestre
	23	4,3 (0,0)	32,8 (2,0)	Silvestre
	25	3,9 (0,0)	34,4 (1,4)	Silvestre
	26	3,8 (0,0)	30,4 (1,4)	Silvestre
13 Serra Geral	27	4,5 (0,0)	30,4 (1,0)	Silvestre
	5	3,8 (0,0)	27,4 (1,0)	Silvestre/Juá
	6	3,8 (0,0)	21,8 (0,1)	Assa-Peixe/Unha de Gato
15 Oeste	34	3,3 (0,0)	58,8 (1,0)	Silvestre
	24	3,8 (0,0)	42,4 (2,8)	Silvestre

(DP)= Desvio Padrão

TABELA 11 - Valores de pH, acidez de méis de abelhas sem ferrão do estado da Bahia por microrregião, florada e espécie de abelha

Região	Amostra	Abelha	Média dos valores (\pm D P)		Florada
			pH	Acidez (meq.Kg ⁻¹)	
Nordeste	V	<i>Plebeia sp</i>	3,5 (0,0)	103,2 (0,0)	Silvestre
Metropolitana	VII	<i>Tetragonisca angustula</i>	3,8 (0,0)	98,6 (2,3)	Silvestre
Paraguaçu	VIII	<i>Melipona scutellaris</i>	3,7 (0,1)	28,9 (3,3)	Silvestre
	IX	<i>Melipona scutellaris</i>	3,4 (0,0)	44,5 (1,0)	Silvestre
	XII	<i>Melipona scutellaris</i>	3,7 (0,0)	17,8 (0,3)	Silvestre
Sudoeste	XI	<i>Melipona scutellaris</i>	3,9 (0,0)	43,6 (1,0)	Silvestre
Chapada Diamantina	VI	<i>Melipona scutellaris</i>	3,5 (0,6)	45,0 (0,9)	Silvestre
Nordeste	XIII	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	3,4 (0,0)	45,8 (2,5)	Silvestre
	XIV	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	3,2 (0,0)	116,7 (1,2)	Silvestre
	XV	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	3,4 (0,0)	59,5 (1,0)	Silvestre
B. M. S. Francisco	XVI	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	3,6 (0,0)	35,6 (0,7)	Silvestre
X	X	Abelha não identificada	3,7 (0,0)	22,6 (0,2)	Silvestre

B. M. S. Francisco= Baixo Médio São Francisco

Nesta amostragem, os méis de *A. mellifera* são ácidos com valores de pH variando entre 2,9 e 5,4, sendo que 94% apresentaram um intervalo menor, entre 3,0 e 4,5 (TABELA 10). Segundo Carvalho et al. (2005), os méis de *Apis* no Brasil podem apresentar valores de pH entre 3,2 e 4,6 e, segundo Cortopassi-Laurino e Gelli (1991), valores entre 3,95 a 4,09, embora Silva et al. (2004) tenham encontrado no Piauí amostras com pH de até 5,30. Vários estudos de pH de mel no mundo como Andrade et al. (1999), Komatsu (1996), Thrasyvoulou e Manikis (1995), e Bastos e Silva (1994), apontam valores entre 3,00 e 6,72.

Os méis de abelhas sem ferrão analisados neste estudo apresentaram valores de pH entre 3,2 e 3,9 (TABELA 11), mostrando um intervalo menor de oscilação se comparados aos méis de *A. mellifera*. De acordo com Crane (1987), variações no pH são, provavelmente, devidas a particularidades na composição florística nas áreas de coleta, uma vez que o pH do mel pode ser influenciado pelo pH do néctar. Cortopassi-Laurino e Gelli (1991), para méis de meliponíneos, registraram valores entre 3,20 e 4,80, e Souza et al. (2009), encontraram valores de pH entre 3,14 e 3,46 para amostras de *Melipona asilvai* do estado da Bahia.

Considerando que o pH mínimo para o crescimento de algumas bactérias é próximo a 4,00, e que praticamente todas as amostras apresentaram valores abaixo ou próximos deste pH, pode-se supor a influencia deste parâmetro sobre a atividade antimicrobiana apresentada. Nesta amostragem, registra-se como exceção a amostra 19, município de Cipó (região Nordeste), que apesar de possuir um pH elevado (5,4) apresentou uma CIM de 62 mg.mL⁻¹ contra *S. aureus*, similar a outras amostras de pH mais baixo como as amostras 9 (pH 4,0, CIM de 63 mg.mL⁻¹) e 12 (pH 3,8, CIM de 62 mg.mL⁻¹), sinalizando a contribuição de outros fatores.

Gethin et al. (2008), analisando a interferência do pH no tratamento tópico de feridas, concluiu que a redução em 0,1 unidade de pH podia ser associada a uma redução de 8,1% no tamanho da ferida. O uso de curativos de mel de Manuka (*L. scoparium*) foi vinculado a uma redução estatisticamente significativa do pH e do tamanho da ferida, e a redução mínima de tamanho dos ferimentos foi associada com leituras altas de pH no início do tratamento.

Para a amostragem deste estudo, foi realizada análise estatística de correlação de (rs) Spearman entre valores de pH e CIM dos méis de *A. mellifera* e

de abelhas sem ferrão. Os dados encontram-se na TABELA 12 e na FIGURAS 14 a 19 que se seguem.

TABELA 12- Correlação de Spearman (rs) entre valores de pH de méis de *A. mellifera* e de abelhas sem ferrão do estado da Bahia e CIM contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* (p)=probabilidade

pH X CIM	(rs) Spearman	
	<i>A. mellifera</i>	Abelhas sem ferrão
Contra <i>E. coli</i>	-0.1352 (p) = 0.4248	0.3384 (p) = 0.2895
Contra <i>S. aureus</i>	0.0683 (p) = 0.6881	0.5910 (p) = 0.0429
Contra <i>P. aeruginosa</i>	-0.1007 (p) = 0.5533	0.4779 (p) = 0.1160

Conforme dados da TABELA 12, pode-se verificar que não houve correlação [(rs) Spearman próximo a zero e (p) > 0.05] entre valores de pH e CIM dos méis de *A. mellifera* contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Pode-se inferir então que neste caso, o pH não contribuiu para a variação da atividade antimicrobiana estudada, conforme FIGURAS 14, 15 e 16.

O pH de méis de abelhas sem ferrão versus a CIM contra os três micro-organismos considerados (TABELA 13) apresentou média a baixa correlação positiva, mas os valores de (p) > 0.05 indicam que o pH não incidiu na variação da atividade antimicrobiana registrada contra *E. coli* e *P. aeruginosa*, embora contra *S. aureus* (p < 0.05), esta possa ser considerada, como exposto nas FIGURAS 17, 18 e 19.

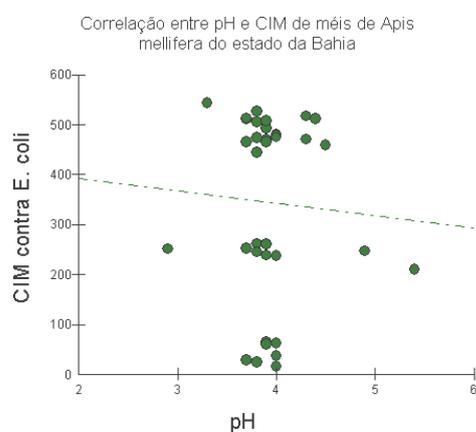


FIGURA14 - Dispersão da Correlação entre pH e CIM de méis de *A. mellifera* do estado da Bahia contra *E. coli*

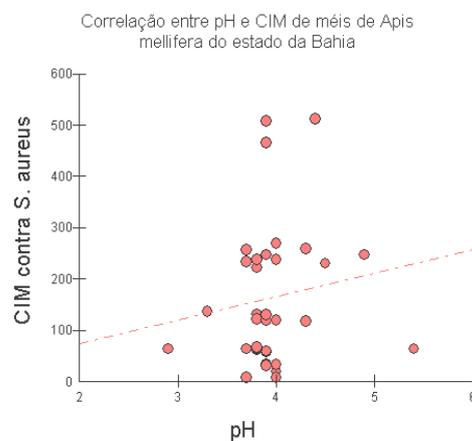


FIGURA15 – Dispersão da Correlação entre pH e CIM de méis de *A. mellifera* do estado da Bahia contra *S. aureus*

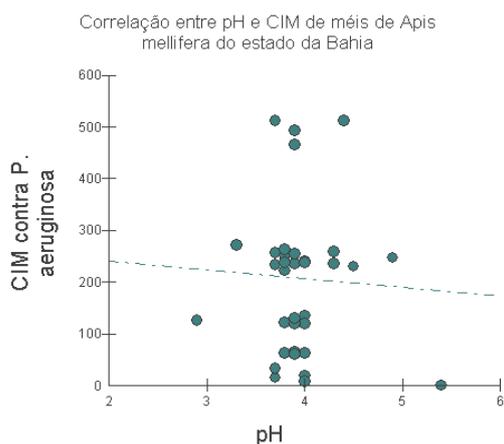


FIGURA 16 – Dispersão da Correlação entre pH e CIM de méis de *A. mellifera* do estado da Bahia contra *P. aeruginosa*

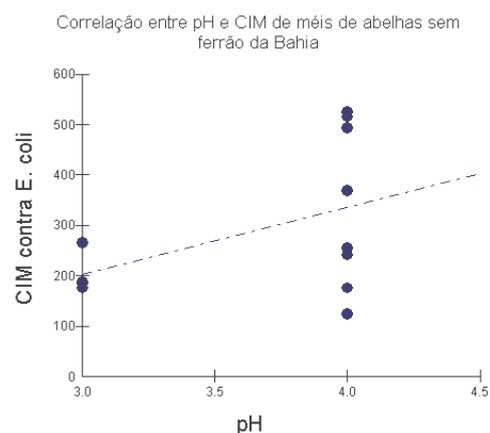


FIGURA 17 – Dispersão da Correlação entre pH e CIM de méis de abelhas sem ferrão do estado da Bahia contra *E. coli*

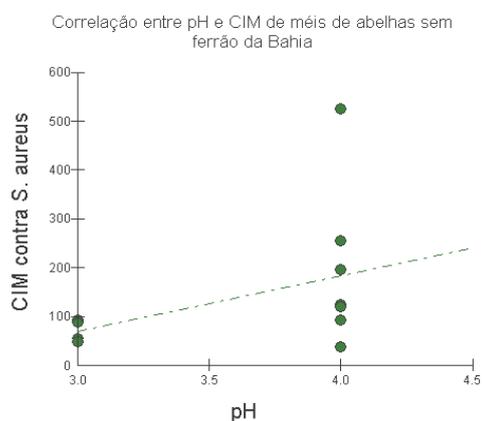


FIGURA 18 - Dispersão da Correlação entre pH e CIM de méis de abelhas sem ferrão do estado da Bahia contra *S. aureus*

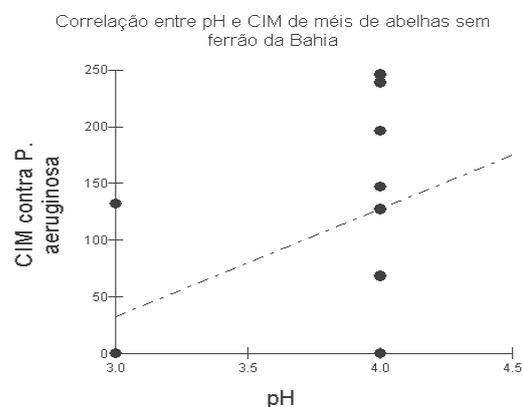


FIGURA 19 - Dispersão da Correlação entre pH e CIM de méis e abelhas sem ferrão do estado da Bahia contra *P. aeruginosa*

Por outro lado, é sabido que o pH ótimo para o crescimento de muitos patógenos animais normalmente está entre 7,2 e 7,4 e que os valores mínimos para o desenvolvimento de alguns micro-organismos comuns em fermentos contaminados são: 4,5 para *Streptococcus pyogenes*; 4,4 para *Pseudomonas aeruginosa*; 4,3 para *Escherichia coli*, e 4,0 para *Salmonella* sp. Dessa forma, mesmo em um mel diluído a acidez pode ser considerada um fator antibacteriano. Mas se o mel for diluído, especialmente pelos fluidos corporais que são tamponados, o pH pode elevar-se e a acidez já não ser um inibidor eficaz (WAIKATO, 2009).

A acidez do mel pode ser considerada como um importante fator responsável pela sua atividade antimicrobiana, haja vista que os ácidos dissolvidos em solução aquosa (WHITE JÚNIOR, 1989; ROOT, 1985), e a presença de íons inorgânicos como fosfato e cloretos (BARTH, 1989), dificultam o processo fermentativo e contribuem para a conservação desta matéria-prima. A presença de ácidos orgânicos no mel está relacionada com a sua estabilidade contra micro-organismos e pode indicar também as condições de armazenamento e manipulação (DE MARIA e MOREIRA, 2003; SODRÉ, 2000), constituindo-se em um critério de qualidade (MERCOSUL, 1999; BRASIL, 2000).

Bognadov (1997), trabalhando com méis de Manuka, concluiu que a atividade antimicrobiana desse mel é devido a sua fração ácida. Os dados de acidez das amostras deste trabalho (TABELA 10) mostram que os méis *A. mellifera* oscilaram em sua maioria entre 14,4 meq.Kg⁻¹ a 65,8 meq.Kg⁻¹ com exceção da amostra 29 que apresentou alta acidez (115,5 meq.Kg⁻¹) e baixo pH (2,9), ainda que não fossem detectados sinais sensoriais de fermentação.

Analisando-se os resultados de CIM das amostras 1, 3, 9, 12, 19, 25, 30 e 33 frente a *P. aeruginosa*, percebe-se que a amostra inativa (19) teve a mais baixa acidez e que as mais ácidas (3, 9 e 33) foram as mais ativas. Apesar disso, de maneira geral não pôde ser estabelecida uma relação direta entre a acidez e a ação antimicrobiana registrada nas outras amostras analisadas. Destacamos a amostra 19 que, mesmo apresentando o menor valor de acidez (14,4 meq.Kg⁻¹) na série avaliada, foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* com CIM de 62 mg.mL⁻¹, o mesmo valor da amostra 12, que apresentou acidez cerca de duas vezes superior (34,0 meq.Kg⁻¹). Possivelmente o valor de acidez registrado para a amostra 9 esteja englobando outros compostos, não necessariamente ativos e que podem não estar presentes na amostra 19.

No caso dos méis de abelhas sem ferrão (TABELA 11), podemos verificar uma ampla variação nos valores de acidez, de 17,8 a 116,7 meq.Kg⁻¹, bastante superior ao observado para os méis de *A. mellifera*. Vit et al. (1998), estudando amostras de méis das tribos Meliponini e Trigonini, oriundos da Venezuela, encontrou valores para a acidez variando de 9,2 a 69,6 meq.kg⁻¹ e de 20,0 a 94,0 meq.kg⁻¹, respectivamente. Já Souza et al. (2004), trabalhando com méis brasileiros

(de Itaberaba e Tucano, região semiárida do estado da Bahia), de *Melipona asilvai* observaram valores de acidez variando entre 21,5 e 80,5 meq.kg⁻¹.

Confrontando-se os dados de CIM (TABELA 7) com a Acidez (TABELA 11) de méis de abelhas sem ferrão, pode-se verificar que as amostras VII e XIV (entre as mais ácidas) apresentaram valores intermediários contra *E. coli* (CIM de 123, e 187 mq.mL⁻¹). Contra *S. aureus* a amostra XIV apresentou baixo valor de CIM (47 mq.mL⁻¹), intermediário contra *E. coli* (187 mq.mL⁻¹) mas já não foi efetiva contra *P. aeruginosa*. Já a amostra VI com uma das menores CIMs frente a *S. aureus* (37 mq.mL⁻¹) e CIMs intermediárias contra *E. coli* (175 mq.mL⁻¹) e *P. aeruginosa* (127 mq.mL⁻¹) apresentou acidez relativamente baixa (45,0 meq.kg⁻¹) dentro da amostragem.

Foi determinado o coeficiente de correlação de Spearman (rs) entre Acidez e CIM das amostras sobre os micro-organismos teste. Os dados estão na TABELA 13 e ilustrados nas FIGURAS 20, 21 e 22 as correlações (Spearman) para os valores de Acidez e CIM de méis de *A. mellifera*, e nas FIGURAS 23, 24 e 25 para os valores de Acidez e CIM de méis de abelhas sem ferrão do estado da Bahia contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* respectivamente.

TABELA 13- Correlação de Spearman (rs) entre valores de Acidez de méis de *A. mellifera* e de Abelhas sem ferrão do estado da Bahia e CIM contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*

Acidez X CIM	(rs) Spearman	
	<i>A. mellifera</i>	Abelhas sem ferrão
Contra <i>E.coli</i>	-0.2740 (p)= 0.1007	-0.6025 (p)= 0.0381
Contra <i>S.aureus</i>	-0.3121 (p)= 0.0600	-0.2632 (p)= 0.4085
Contra <i>P.aeruginosa</i>	-0.3767 (p)= 0.0215	-0.5148 (p)= 0.0867

(p)= probabilidade

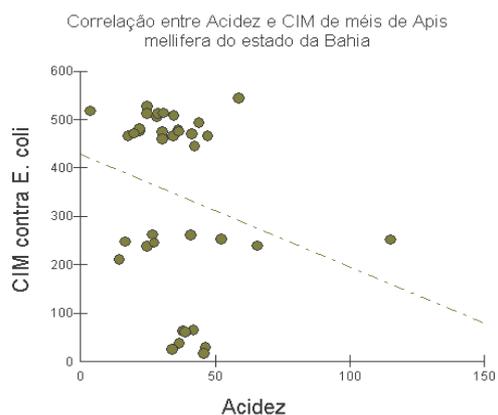


FIGURA 20 - Dispersão da Correlação entre Acidez e CIM de méis de *A. mellifera* do estado da Bahia contra *E. coli*

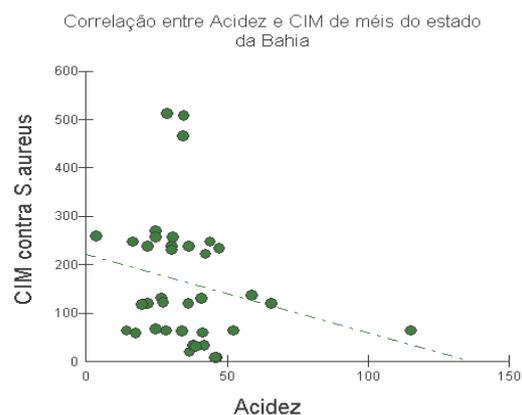


FIGURA 21 - Dispersão da Correlação entre Acidez e CIM de méis de *A. mellifera* do estado da Bahia contra *S. aureus*

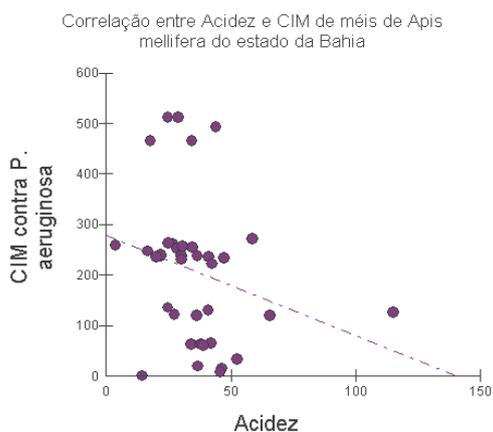


FIGURA 22 - Dispersão da Correlação entre Acidez e CIM de méis *A. mellifera* do estado da Bahia contra *P. aeruginosa*

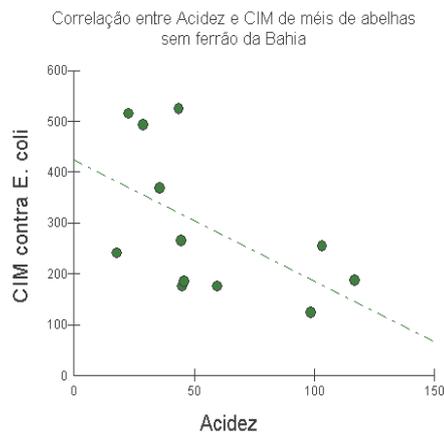


FIGURA 23 - Dispersão da Correlação entre Acidez e CIM de méis abelhas sem ferrão do estado da Bahia contra *E. coli*

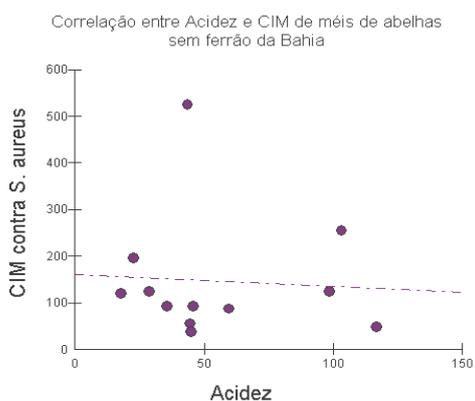


FIGURA 24 - Dispersão da Correlação entre Acidez e CIM de méis de abelhas sem ferrão do estado da Bahia contra *S. aureus*

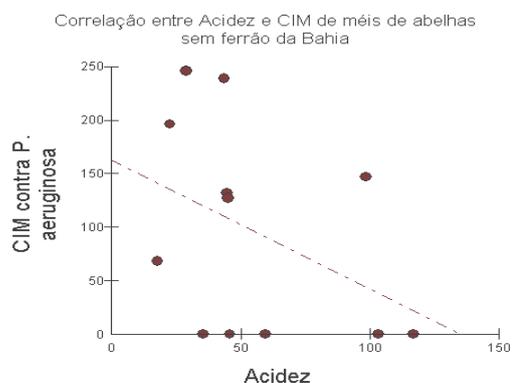


FIGURA 25 - Dispersão da Correlação entre Acidez e CIM de méis de abelhas sem ferrão do estado da Bahia contra *P. aeruginosa*

Nesta amostragem os méis de *A. mellifera* não apresentaram correlação entre o parâmetro Acidez e as CIMs apresentadas contra *E. coli*, (rs) Spearman = -0.2740 e $p > 0.05\%$, embora tenham mostrado fraca correlação negativa no caso de *S. aureus* e *P. aeruginosa* (-0.3121 e -0.3767). Dessa maneira, pode-se inferir que a variação na atividade antimicrobiana apresentada, praticamente não foi devida à influência deste parâmetro.

Como mostrado na TABELA 13, para os méis de abelhas sem ferrão foi encontrada média correlação negativa entre a acidez e a CIM contra *E. coli* (rs) Spearman = -0.6025, igualmente contra *P. aeruginosa* (-0.5148) embora com probabilidade menor que 95% ($p > 0.0867$), e não foi encontrada correlação para *S. aureus* (rs) Spearman = -0,2632). Assim, pode-se supor que houve uma leve ação da acidez sobre a variação da atividade biológica, fato já esperado dada a maior amplitude de valores de acidez encontrados nos méis de abelhas sem ferrão quando comparados aos méis de *A. mellifera*.

Bogdanov (1997) afirma que a atividade antimicrobiana do mel correlaciona-se significativamente com a acidez livre e total, mas não com o pH, onde a correlação entre a atividade antibacteriana e esses fatores, encontrada para 82 méis de diferentes origens apontaram valores de R (correlação) = 0,06; 0,35 e 0,31 com P (probabilidade)= 0,58; 0,001 e 0,005; respectivamente. Estes resultados estão de acordo com outros resultados do autor, nos quais a fração ácida foi apontada como a principal causa da atividade não-peróxido. Bogdanov (1997), no entanto, sugere que mesmo reconhecendo a fração ácida como responsável pela atividade biológica em questão, o pH do mel pode adicionalmente agir como um fator antimicrobiano.

Desta forma podemos assinalar que, embora os ácidos presentes no mel possam contribuir para sua estabilidade frente a micro-organismos (CARVALHO et al. 2005), a acidez e o pH não mostraram influencia decisiva na atividade das amostras, apesar de que, dada à incompatibilidade com o sistema enzimático dos micro-organismos, podem ter contribuído para a sua expressão.

Por outro lado, na TABELA 10 pode ser visto que alguns valores de pH e acidez não estão proporcionalmente correlacionados, ou seja, amostras de menor pH, não apresentam necessariamente maior acidez, a exemplo das amostras 1 e 9

(*A. mellifera*), com pH de 4,02 e 3,98 e acidez de 24,8 e 52,4 meq.kg⁻¹ respectivamente. Este fato pode ser entendido se considerarmos a variedade de ácidos orgânicos que podem ocorrer no mel, e que na determinação do pH, de acordo com os ácidos presentes pode haver maior ou menor dissociação de íons hidrogênio. A avaliação do pH, realizada através de eletrodo, mede a concentração hidrogeniônica do meio, ou seja, a concentração [H₃O⁺] da amostra. Esses íons são decorrentes do equilíbrio de ionização dos ácidos em meio aquoso, e as taxas variam e dependem dos valores de pKa dos ácidos envolvidos.

Quanto à acidez, Morrison (1983) afirma que as soluções aquosas dos hidróxidos convertem completamente os ácidos carboxílicos nos respectivos sais (princípio da determinação físico-química da acidez), mas reagem também com outros íons de caráter ácido, inclusive aqueles que não contribuem para o pH. Como na determinação da acidez, a dissociação é completa (acontece neutralização), este fato pode contribuir com as diferenças, e explicar a falta de correlação entre os valores encontrados. Dessa forma, quando uma amostra contém ácidos fracos (caso do mel) não é possível correlacionar diretamente a acidez com o pH.

Os valores deste estudo estão em sua maioria de acordo com Gonnet (1982) que relata, para acidez em méis de abelha, um intervalo de 10 a 60 meq kg⁻¹ de mel, embora duas das amostras analisadas tenham apresentado valor de acidez muito superior ao máximo recomendado para méis de *A. Mellifera*. Os valores registrados são superiores àquele preconizado pela legislação (BRASIL, 2000), que regulamenta méis de *A. mellifera*, embora os méis de abelhas sem ferrão sejam popularmente reconhecidos pelo *flavor* mais ácido. Segundo Silva et al. (2004), os tipos de florada explicariam essa variabilidade, uma vez que a acidez no mel tem origem nos diversos ácidos orgânicos contidos no néctar coletado pelas abelhas (ROOT, 1985).

3.3.2.2 Atividade de água (aW)

Apesar de não ser um parâmetro de qualidade contemplado pela legislação em vigor, a atividade de água (aW) ganha importância na determinação do potencial antimicrobiano pelo fato de estar fortemente relacionada à capacidade osmótica. Em termos gerais, o comportamento dos micro-organismos frente à aW é variável, mas os substratos com aW inferior a 0,600 estão assegurados contra a proliferação microbiana (HOFFMANN, 2001). A TABELA 14 mostra os dados de aW das amostras de méis de *A. mellifera* sem diluição e suas respectivas médias por região.

TABELA 14 - Atividade de água (aW) de méis de *A. mellifera* por microrregiões do estado da Bahia

Microrregião	Amostra	aW	aW Média
1 Metropolitana	-		
2 Litoral Norte	11	0,598	0,598
3 Recôncavo Sul	35	0,587	0,575
	36	0,558	
	37	0,580	
4 Litoral Sul	1	0,565	0,607
	2	0,618	
	3	0,615	
	9	0,603	
	15	0,592	
6 Nordeste**	10	0,547	0,565
	19	0,557	
	20	0,566	
	22	0,619	
	28	0,554	
	32	0,547	
7 Paraguaçu**	31	0,589	0,574
	33	0,559	
8 Sudoeste**	7	0,543	0,555
	8	0,555	
	12	0,559	
	13	0,561	
9 Baixo Médio São Francisco**	16	0,508	0,533
	29	0,558	
10 Piemonte da Diamantina**	4	0,598	0,598
11 Irecê**	30	0,592	0,592
12 Chapada Diamantina**	14	0,552	
	17	0,559	
	18	0,561	
	21	0,590	
	23	0,593	

TABELA 14 (continuação) - Atividade de água (aW) de méis de *A. mellifera* por microrregiões do estado da Bahia

	25	0,577	
	26	0,572	
	27	0,585	0,574
Serra Geral	5	0,551	
	6	0,581	
	34	0,560	0,564
15 Oeste	24	0,619	0,619

(*) Médias de aW; (**) Regiões do semiárido baiano; (-)= análise não realizada

Como pode ser visto na TABELA 14, de maneira geral méis de *A. mellifera* originários das regiões situadas no semiárido (Nordeste, Paraguaçu, Sudoeste, Baixo Médio São Francisco, Piemonte da Diamantina, Irecê, Chapada Diamantina e Serra Geral), apresentaram aW inferiores à média geral registrada para o estado (0,579); como exceção, foram registradas as regiões de Piemonte da Diamantina e Irecê, com valores similares aos do Litoral Norte e litoral Sul, que se aproximaram de 0,600 (limite de crescimento de micro-organismos). A região Oeste apresentou valor superior ao citado como limite (0,619) e os menores valores de aW foram encontrados nas regiões Sudoeste e Baixo Médio São Francisco, Serra Geral e Nordeste. As amostras 2, 3, 9, 22 e 24 apresentaram aW acima do limite de crescimento microbiano em geral (0,600), embora muito abaixo do limite para a maioria das bactérias (0,900). Denardi et al. (2005), pesquisando a atividade de água em méis de *A. mellifera* de São Paulo, encontraram resultados entre 0,49 e 0,66 concordantes com a maioria dos valores encontrados nesta pesquisa. Bendini et al. (2008), analisando méis de *A. mellifera* do Ceará, observou média de 0,72. Anacleto (2009), encontrou para méis de abelhas sem ferrão de Piracicaba, São Paulo, aW de 0,59 a 0,82 e Almeida-Muradian (2007), de 0,74 a 0,76. Mendes et al. (2006), observou valores de 0,548 a 0,624 em méis de *A. mellifera* do Pantanal e Correia-Oliveira et al. (2008), 0,543 a 0,639 em méis de *A. mellifera* do estado de Sergipe.

Os dados de aW de méis de abelhas sem ferrão puros e diluídos a 50% e halos de atividade bacteriostática estão na TABELA 15.

TABELA 15 - Atividade de água (aW) do mel puro e do mel diluído a 50% e halos de ação bacteriostática (em mm) de amostras de mel de abelhas sem ferrão do estado da Bahia

Amostra	aW mel puro (\pm DP)	aW mel a 50% (\pm DP)	<i>E. coli</i> (\pm DP)	<i>S. aureus</i> (\pm DP)
V	0,829 (0,0)	*	NS	17,5 (3,6)
VI	0,726 (0,0)	0,939 (0,0)	16,0 (0,0)	31,3 (1,5)
VII	0,689 (0,0)	0,940 (0,0)	NS	NS
VIII	0,720 (0,0)	0,948(0,0)	17,0 (2,5)	29,0 (3,0)
IX	0,746 (0,0)	0,951(0,0)	NS	30,0 (7,0)
X	0,735 (0,0)	0,944(0,0)	NS	30,5 (2,3)
XI	0,685 (0,0)	0,947(0,0)	NS	18,8 (4,0)
XII	0,757 (0,0)	0,943(0,0)	NS	20,3 (2,5)
XIII	0,799 (0,0)	0,954(0,0)	NS	20,9 (2,3)
XIV	0,787 (0,0)	0,947(0,0)	18,0 (1,0)	NS
XV	0,783 (0,0)	0,951(0,0)	NS	29,0 (0,5)
XVI	*	*	NS	28,3 (0,5)

DP= Desvio Padrão; * Não avaliada; NS= não sensível

Ao comparar os valores da aW dos méis de abelhas africanizadas com os méis de abelhas sem ferrão, observa-se que os méis destas últimas apresentam valores mais altos. Como nos testes antimicrobianos as amostras foram empregadas na diluição de 50%, a atividade de água foi novamente determinada para os méis VI, VII e VIII a título de comparação. Os valores de aW encontrados nesse estudo para as amostras diluídas a 50%, (TABELA 15) situaram-se acima do mínimo necessário para o crescimento dos micro-organismos testados. Dessa maneira, pode-se inferir não ter sido o potencial osmótico o responsável pela ação antimicrobiana verificada nas amostras VI e VIII.

Analisando a TABELA 6, onde a Concentração Inibitória Mínima foi determinada por diluições sucessivas das amostras de mel, percebe-se que a amostra 33, apresentou uma CIM de 8 mg.mL⁻¹ frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa*, onde provavelmente a aW já teria assumido valores superiores aos mínimos necessários ao crescimento bacteriano, e a atividade osmótica cessado.

Assim, para verificar em que extensão a atividade antimicrobiana de uma amostra pode estar relacionada ao conteúdo de água e à sua quantidade de soluto, foi determinada a CIM de uma solução de açúcares (COOPER et al. 1999) composta por 45 g de glicose, 35 g de frutose, 3 g de sacarose e 17 g de água. Esta solução

saturada foi diluída a 50% filtrada em membrana de 0,22 μm e testada nas mesmas condições de uma amostra de mel com atividade confirmada. O resultado está expresso na TABELA 16.

Comparando-se os valores de atividade antimicrobiana da solução de açúcares (TABELA 16), com as TABELAS 6 e 7 (CIM de méis de *A. mellifera* e de abelhas sem ferrão respectivamente) podemos observar que as amostras de mel apresentaram valores menores, ou seja, maior ação contra os micro-organismos. Neste caso, a solução de açúcar apesar de diluída foi efetiva contra três dos micro-organismos, embora o mel tenha sido mais eficiente, causando inibição em concentrações mais baixas e em 66% dos casos contra todas as cepas testadas.

TABELA 16- Atividade antimicrobiana de solução de açúcar e amostras de mel

Amostra (mg.mL ⁻¹)	Micro-organismos			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Solução de açúcares	622	622	622	NS
Mel	142	285	142	285
	16	8	8	NS
	60	30	60	466

NS= Não Sensível

Xaropes de açúcar saturados e pastas de açúcar têm osmolaridade suficiente para inibir crescimento microbiano, mas quando usados como uma camada de contato na ferida, a diluição através do exsudado reduz a concentração para um nível que não é mais capaz de controlar a infecção (MOLAN, 2001). De acordo com Chirife et al. (1983), açúcar granulado colocado diretamente em ferimentos abdominais é diluído pelos fluidos corporais a valores de a_w de 0,897, após 4 h de contato.

Chirife et al. (1982), testando a atividade antimicrobiana de soluções de açúcares, notou que quando diluídas a 29% ($a_w = 0,86$), estas cessam a sua atividade contra *S. aureus* muito mais rapidamente que méis. Estes em concentração próxima a 2% ainda inibiram o crescimento desta bactéria (MOLAN, 2001), evidenciando que a atividade antimicrobiana do mel não está unicamente relacionada ao potencial osmótico.

Este parâmetro pode adquirir importância quando o mel é usado puro como antimicrobiano diretamente em fermentos na pele (EFEM, 1988), visto que nesta situação os valores de a_w abaixo do limite de crescimento de micro-organismos, podem contribuir fortemente na ação antimicrobiana do mel. Henriques et al. (2009), estudando o efeito do mel de Manuka e mel artificial diluídos (avaliação do dano osmótico) sobre cepas de *S. aureus* através da CIM, verificaram mudanças estruturais nas células tratadas com mel, que foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão (TEM) e de varredura (MEV). As imagens observadas sugeriam que as células não foram capazes de completar o ciclo de divisão celular, permanecendo ligadas apesar de apresentarem septos plenamente formados. Os autores concluíram também que os açúcares não participaram da ação.

3.3.2.3 Cor

A cor é a propriedade física imediatamente percebida pelo consumidor, sendo um critério útil na classificação comercial. Os méis claros são apontados como de maior preferência embora em países como Alemanha, Áustria e Suíça, os méis de melato, de cor escura, sejam especialmente apreciados (BOGDANOV, 2004). A cor do mel está relacionada com sua origem botânica, processamento, armazenamento e a temperatura na qual o mel amadurece na colméia (SMITH, 1967), ou seja, uma conjunção de fatores que também podem estar relacionados à atividade antimicrobiana. Dessa forma, apesar de não ser por si só determinante da atividade contra micro-organismos, a cor pode indicar a presença de fatores responsáveis pela mesma. Taormina (2001) afirma que as cores escuras refletem em parte o conteúdo de pigmentos como carotenóides e flavonóides, muitos dos quais têm propriedades antioxidantes e que podem ser positivamente correlacionados com o conteúdo de água e a cor do mel.

A proporção de méis de *A. mellifera* do estado da Bahia determinados quanto à cor pela escala de Pfund está representada na FIGURA 26.

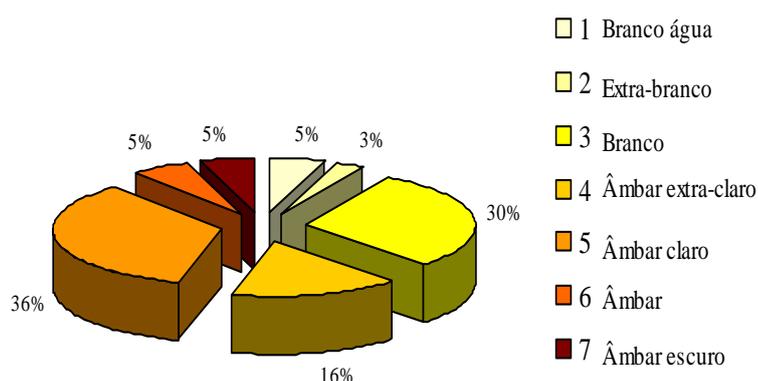


FIGURA 26 - Valores percentuais de cor de méis de *A. mellifera* coletados no estado da Bahia analisados segundo escala de Pfund

Analisando-se a FIGURA 26, pode-se verificar que 90% dos méis de *A. mellifera* do estado da Bahia correspondem à classificação Branco água a Âmbar-claro e 10% correspondem a méis de cor Âmbar a Âmbar-escuro, num universo de 37 amostras coletadas em 12 regiões econômicas do estado da Bahia. Das 16 amostras de abelhas sem ferrão coletadas, foi determinada a cor de apenas 11, devido a pouca disponibilidade de material, sendo encontrada majoritariamente a cor Branco-água. Autores como Almeida (2002), Marchini e Moretti (2001), Uñates et al. (1999) e Persano-Oddo et al. (1995), analisando a cor de méis de várias origens, encontraram a cor clara como predominante.

A FIGURA 27 mostra cores encontradas em méis de *A. mellifera* e de abelhas sem ferrão do estado da Bahia.

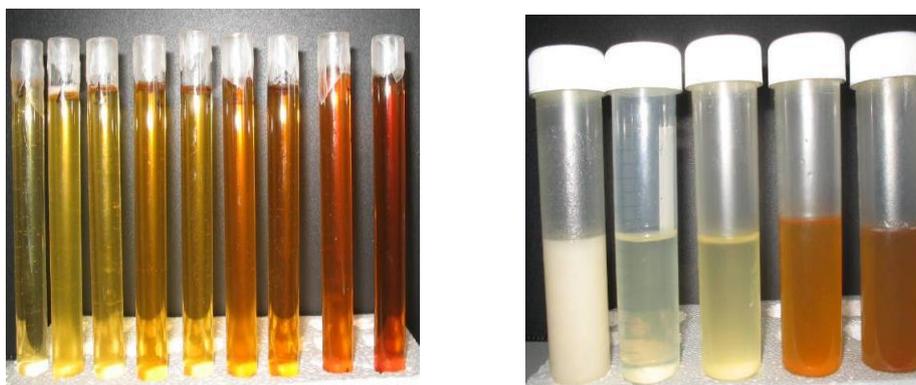


FIGURA 27 - Cores de méis coletados no estado da Bahia. À esquerda méis de *A. mellifera* e à direita méis de abelhas sem ferrão mostrando detalhe da cristalização na primeira amostra da série de abelhas nativas.

Foram comparados os dados da avaliação da Cor e CIM de méis de *A. mellifera* contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, por regiões econômicas. Os dados encontram-se na TABELA 17.

TABELA 17- Avaliação da Cor e CIM de méis de *Apis mellifera* do estado da Bahia contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, por microrregiões socioeconômicas

Região	Am	Cor Pfund		CIM (mg.mL ⁻¹)			
		mm	Classificação	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Litoral Norte	11	68,9	Âmbar Claro	470	59	235	NS
Recôncavo Sul	35	61,0	Âmbar Claro	62	32	62	503
	36	55,8	Âmbar Claro	64	32	64	508
	37	56,8	Âmbar Claro	60	30	60	466
Litoral Sul	1	37,9	Âmbar Extra Claro	237	270	135	NS
	2	81,4	Âmbar Claro	37	18	18	NS
	3	29,9	Branco	29	7	14	NS
	9	99,2	Âmbar	252	63	32	NS
	15	102,7	Âmbar	493	246	493	493
Nordeste	10	46,1	Âmbar Claro	465	58	465	465
	19	73,7	Âmbar Claro	210	62	NS	NS
	20	137,8	Âmbar Escuro	239	120	120	478
	22	56,8	Âmbar Claro	466	233	233	466
	28	16,9	Branco	260	130	130	520
Paraguaçu	32	19,8	Branco	512	256	256	512
	31	30,5	Branco	474	237	237	NS
	33	76,9	Âmbar Claro	16	8	8	NS
Sudoeste	7	167,1	Âmbar Escuro	247	247	247	494
	8	57,7	Âmbar Claro	480	120	240	480
	12	64,7	Âmbar Claro	25	62	62	NS
	13	69,1	Âmbar Claro	505	63	252	505
B. M. S. Francisco	16	15,2	Extra Branco	512	256	512	512
	29	19,9	Branco	251	63	125	501
P. da Diamantina	4	33,6	Branco	262	131	262	NS
Irecê	30	29,6	Branco	507	50	254	NS
C. Diamantina	14	21,5	Branco	526	66	263	526
	17	40,4	Âmbar Extra Claro	47	118	236	471
	18	27,2	Branco	479	120	120	479
	21	22,8	Branco	512	512	512	NS
	23	35,8	Âmbar Extra Claro	517	258	258	258
	25	48,3	Âmbar Extra Claro	466	466	466	NS
	26	22,5	Branco	474	237	237	474
	27	65,8	Âmbar Claro	459	230	230	460
Serra Geral	5	35,6	Âmbar Extra Claro	245	122	122	NS
	6	6,9	Branco Água	475	237	237	NS
	34	4,1	Branco Água	543	136	272	543
Oeste	24	61,3	Âmbar Claro	444	222	222	444

Am= amostra; B. M. S. Francisco = Baixo Médio São Francisco; P. da Diamantina = Piemonte da Diamantina; C. Diamantina = Chapada Diamantina

Verificando-se a correlação entre Cor e ação antimicrobiana, foi tomado o subconjunto de méis cor Âmbar-claro (amostras em destaque na TABELA 17), onde os valores de cada um dentro desta classificação foram comparados com os valores da CIM apresentado contra três dos micro-organismos teste. Os resultados desta análise estão na TABELA 18 e ilustrados nos nas FIGURAS 28, 29 e 30.

TABELA 18 - Correlação (rs) Spearman entre Cor de méis de *A. mellifera* do estado da Bahia e CIM contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*

Cor X CIM	(rs) Spearman
Contra <i>E.coli</i>	-0.1649 (p) = 0.6985
Contra <i>S.aureus</i>	-0.3040 (p) = 0.3366
Contra <i>P.aeruginosa</i>	-0.1634 (p) = 0.6117

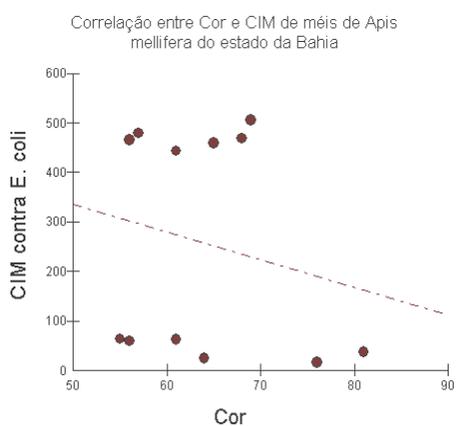


FIGURA 28 - Dispersão da Correlação entre Cor e CIM de méis de *A. mellifera* do estado da Bahia contra *E. coli*

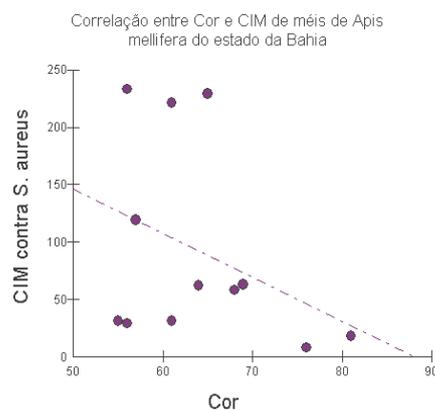


FIGURA 29- Dispersão da Correlação entre Cor e CIM de méis de *A. mellifera* do estado da Bahia contra *S. aureus*

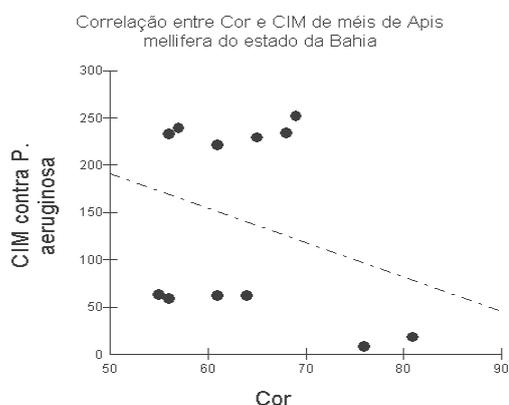


FIGURA 30 - Dispersão da Correlação entre Cor e CIM de méis de *A. mellifera* do estado da Bahia contra *P. aeruginosa*

Como pode ser observado nas figuras acima, nesta amostragem não houve correlação entre a cor e a CIM das amostras de cor Âmbar-claro contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Por outro lado, o caráter negativo da tendência pode sugerir alguma relação entre a Cor e o aumento da atividade biológica (menores valores de CIM), provavelmente devido a alterações nos teores de minerais ou de compostos do metabolismo secundário de plantas constituintes do mel. Dentro do universo considerado, é possível verificar que frente a *E. coli* os valores de CIM ficaram entre 16 e 505mg.mL⁻¹, contra *S. aureus* variaram entre 18 a 233mg.mL⁻¹, e contra *P. aeruginosa* de 8 a 252mg.mL⁻¹ (TABELA 18). Apesar da amplitude dos dados, analisando-se a quantidade de amostras com menores valores de CIM (41%), ou seja, maior efetividade pode ser visto que estas apresentam valor numérico de cor (maior absorbância) dentro da faixa de classificação Âmbar-claro.

Está citado na literatura que méis claros de *A. mellifera* geralmente apresentam melhor atividade antimicrobiana (WESTON, 2000), se comparados aos méis escuros. Já Taormina et al. (2001) afirma que méis de cor escura geralmente apresentam maior ação biológica que os de cor clara. Neste estudo, no entanto, pode-se verificar que os méis 35, 36 e 37 com alta atividade contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* e ainda com ação contra *C. albicans* são de cor Âmbar-claro. E as amostras 2, 12 e 33 (cor âmbar-claro), apesar de terem sido inativas contra a levedura apresentaram excelente atividade contra as bactérias. Também as amostras 9 (âmbar), 10 e 19 (âmbar claro), apresentaram boa atividade, sendo que a amostra 19 não foi efetiva contra *P. aeruginosa* nem contra *C. albicans*, mas a amostra 10, embora com atividade mais discreta, foi efetiva também contra a levedura. Das amostras de cor branca, as mais efetivas foram a 3, com excelente atividade contra *E. coli*, *S.aureus* e *P.aeruginosa*, e as amostras 14 e 29, que apresentaram boa atividade contra pelo menos um dos micro-organismos testados. As outras amostras de cores branco-extra-claro, branco-água e branco, apresentaram baixa efetividade, não confirmando nesta amostragem a afirmação de Weston (2000). Arruda (2003) cita, que autores como Marchini e Moretti (2001), analisando méis do estado de São Paulo, Carvalho et al. (2000), do estado da Bahia, Uñatez et al. (1999), da Argentina, Persano-Oddo et al. (1995), da Itália e Martínez et al. (1992), do Paraguai, encontraram cores variando do âmbar-extra-claro ao âmbar escuro, com predominância do âmbar claro.

Sodré et al. (2002a), Marchini et al. (2005) e Vargas (2006), analisando méis brasileiros de várias origens, encontraram colorações variando do branco-água até âmbar escuro, com maior incidência de âmbar claro e âmbar extra-claro. Na análise de méis de diferentes origens florais, menores concentrações de minerais (SEEMANN e NEIRA 1988) e de substâncias fenólicas foram observadas nos claros (ARRUDA, 2003), que naqueles de cor escura.

Quanto aos méis de abelhas sem ferrão, das amostras que tiveram sua cor determinada, as de *Melipona scutellaris*, amostras VI, IX e XIV apresentaram atividade mais expressiva contra *S. aureus* (37; 55 e 47mg.mL⁻¹), estas de cores branco-água, âmbar-claro e extra-branco, respectivamente. Em seguida, as amostras XIII, XV e XVI, de *Melipona quadrifasciata*, cor branco-água, com valores de 92, 87 e 92 mg.mL⁻¹, respectivamente (TABELA 19).

TABELA 19 - Concentração Inibitória Mínima (mg.mL⁻¹) e Cor Pfund de mel de abelhas sem ferrão por espécies, coletados no estado da Bahia

Am	Abelha	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	Cor
I	<i>Melipona asilvai</i>	72	72	NS	NS	---
II	<i>Friseomelita doederleinei</i>	74	19	NS	NS	---
III	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	70	35	NS	NS	---
IV	<i>Tetragonisca angustula</i>	132	33	NS	NS	---
V	<i>Plebeia sp</i>	254	254	NS	NS	---
VI	<i>Melipona scutellaris</i>	175	37	NS	NS	Branco- água
VII	<i>Tetragonisca angustula</i>	123	123	NS	---	Âmbar
VIII	<i>Melipona scutellaris</i>	493	123	NS	---	Branco
IX	<i>Melipona scutellaris</i>	265	55	NS	---	Âmbar claro
XI	<i>Melipona scutellaris</i>	241	120	68	NS	Branco- água
XII	<i>Melipona quadrifasciata</i>	525	525	239	NS	Branco- água
XIII	<i>Melipona quadrifasciata</i>	184	92	NS	NS	Branco- água
XIV	<i>Melipona quadrifasciata</i>	187	47	NS	NS	Extra branco
XV	<i>Melipona quadrifasciata</i>	174	87	NS	NS	Branco- água
XVI	<i>Melipona quadrifasciata</i>	369	92	NS	NS	Branco- água
X	X	515	196	257	NS	Branco água

Am = Amostra; (---) = não realizado, (X)= não idetificada

Os valores encontrados não são conclusivos. Para a amostra VII, por exemplo, de cor âmbar-claro, a CIM frente a *E. coli* foi inferior a da amostra VIII, de cor branco-água, enquanto frente a *S. aureus* os resultados foram similares para as

duas amostras. Esta tendência se repete entre as amostras XI a XVI, sinalizando que a cor, sem a análise conjunta de outros fatores, não pode indicar a atividade antimicrobiana. Pode, no entanto, contribuir no entendimento da atividade biológica de méis de determinada origem.

3.3.2.4 Ação do Peróxido de Hidrogênio

A participação do H_2O_2 na atividade antimicrobiana foi verificada segundo metodologia usada por Mundo et al. (2004). Foram selecionadas 6 (seis) amostras com valores de concentração inibitória mínima já demonstrada, para determinação da CIM de méis em presença de catalase (10 mg.mL^{-1}). Os resultados obtidos estão expostos na TABELA 20.

TABELA 20 - CIM (mg.mL^{-1}) de méis do estado da Bahia – sem e com catalase (10 mg.mL^{-1}) para inibição do H_2O_2

Amostras	Micro-organismo					
	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	S/C	C/C	S/C	C/C	S/C	C/C
VI	175	277	37	138	--	--
IX	265	275	55	275	--	--
9	252	588	63	294	32	294
12	25	562	62	281	62	281
30	507	596	507	NS	254	298
33	16	334	8	167	8	334

S/C= sem catalase; C/C= com catalase; (--) = não realizado; NS= não sensível.

Na TABELA 20 pode-se verificar que as amostras com variados níveis de atividade antimicrobiana sofreram diminuição desse potencial, mostrando valores superiores de CIM quando misturadas à enzima catalase (cuja ação nesse teste era decompor o H_2O_2 formado a partir da oxidação da β -glicose). A variação nos resultados indica certamente diferenças no teor de peróxido de hidrogênio em cada mel quando diluído, fato relacionado aos teores de ácido glicônico e da enzima glicose oxidase presentes em cada amostra, e à ação da enzima catalase sobre o H_2O_2 . Além disso, as características particulares de cada micro-organismo também têm influência direta nos resultados de atividade biológica, pois oferecem reações diversas ao antimicrobiano via mecanismos de defesa.

Os dados encontrados estão de acordo com a afirmação de Mundo et al. (2004) e Molan (2001), que o H₂O₂ tem participação na atividade antimicrobiana.

Comparando-se a relação entre os valores de atividade das amostras 9, 12 e 33 COM e SEM catalase, contra, *S. aureus* e *P. aeruginosa* respectivamente, pode-se verificar razões aproximadas que vão de 2 a 22 vezes (TABELA 21).

TABELA 21 - Razão entre valores de CIM de méis de *A. mellifera* com e sem catalase

Micro-organismos	Amostra 9	Amostra 12	Amostra 33
<i>E. coli</i>	2 (588/252)	22 (562/25)	21 (334/16)
<i>S. aureus</i>	5 (294/63)	4 (281/62)	21 (167/8)
<i>P. aeruginosa</i>	9 (294/32)	4 (281/62)	21 (167/8)

O efeito foi variado mostrando que diferenças na expressão da atividade de cada mel podem depender da sua origem botânica, da espécie de abelha produtora e também do micro-organismo alvo.

3.3.2.5 Compostos fenólicos (UV-Vis)

Os valores da CIM dos méis de *A. mellifera* (amostras 1 a 37) e das amostras de abelhas sem ferrão (VI a XVI), e dos teores de compostos fenólicos totais analisados por espectrofotometria UV-Vis estão apresentados na TABELA 22, calculados em mg AG.100g⁻¹ de mel (ANEXO 1), segundo a equação da curva: $y = 29.754x - 0.0127$, onde “y” representa a concentração de ácido gálico (padrão), “x” é a absorvância a 750nm, e o coeficiente de determinação $R^2 = 0,9998$. Os valores de flavonóides totais por sua vez estão apresentados da TABELA 23, em mg QE.100g⁻¹ mel, com quercetina como padrão, lidos a 510 nm e calculados segundo equação da curva $y = 0.0024 + 0.0028x$ com $R^2 = 0,9997$. Os valores encontram-se no ANEXO 1.

TABELA 22 - CIM ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), teor de Compostos Fenólicos Totais e Flavonóides totais ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$) de méis de *Apis mellifera* de florada silvestre da Bahia, por microrregião socioeconômica

Am	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	^(B) <i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	C. Fen.T.(DP)	Flav. T. (DP)	Região
11	470	59	235	NS	12,9 (0,7)	7,8 (0,0)	Litoral Norte
35	62	32	62	503	14,7 (0,3)	5,7 (0,2)	Recôncavo Sul
36	64	32	64	508	13,4 (0,2)	6,5 (0,0)	Recôncavo Sul
37	60	30	60	466	13,9 (0,4)	4,0 (0,2)	Recôncavo Sul
1	237	270	135	NS	9,5 (0,6)	3,8 (0,0)	Litoral Sul
2	37	18	18	NS	13,0 (0,8)	1,4 (0,0)	Litoral Sul
3	29	7	14	NS	12,1 (0,3)	5,4 (0,0)	Litoral Sul
9	252	63	32	NS	16,3 (0,4)	7,2 (0,1)	Litoral Sul
15	493	246	493	493	17,1 (0,6)	8,3 (0,3)	Litoral Sul
10	465	58	465	465	9,7 (0,3)	1,5 (0,1)	Nordeste
13	505	63	252	505	12,0 (0,2)	6,4 (0,0)	Nordeste
19	210	62	NS	NS	32,1 (0,4)	15,8 (0,9)	Nordeste
20	239	120	120	478	24,9 (0,5)	22,4 (0,4)	Nordeste
32	512	256	256	512	7,9 (0,2)	1,4 (0,0)	Nordeste
31	474	237	237	NS	11,9 (0,6)	4,4 (0,2)	Paraguaçu
33	16	8	8	NS	26,9 (0,5)	17,9 (0,0)	Paraguaçu
6	475	237	237	NS	7,7 (0,4)	0,7 (0,0)	Sudoeste
7	247	247	247	494	15,0 (0,2)	10,6 (0,3)	Sudoeste
8	480	120	240	480	9,3 (0,7)	5,4 (0,1)	Sudoeste
12	25	62	62	NS	12,3 (0,3)	5,2 (0,3)	Sudoeste
14	526	66	263	526	8,0 (0,4)	2,1 (0,5)	Sudoeste
26	474	237	237	474	7,9 (0,2)	1,4 (0,1)	Sudoeste
27	459	230	230	459	11,8 (0,2)	5,1 (0,3)	Sudoeste
16	512	256	512	512	12,1 (0,8)	1,5 (0,1)	B.M.S. Francisco
29	251	63	125	501	9,8 (0,4)	4,0 (0,0)	B.M.S. Francisco
4	262	131	262	NS	12,5 (0,8)	3,9 (0,0)	P. Diamantina
30	507	507	254	NS	16,2 (0,3)	4,2 (0,1)	Irecê
17	471	118	236	471	8,2 (0,1)	5,2 (0,2)	C. Diamantina
18	479	120	120	479	8,7 (0,2)	2,7 (0,1)	C. Diamantina
21	512	512	512	NS	11,1 (0,4)	5,3 (0,3)	C. Diamantina
22	466	233	233	466	14,6 (0,6)	8,7 (0,1)	C. Diamantina
23	517	258	258	258	9,8 (0,3)	4,6 (0,1)	C. Diamantina
25	466	466	466	NS	9,7 (0,6)	4,0 (0,1)	C. Diamantina
28	260	130	130	520	13,9 (0,2)	7,8 (0,1)	C. Diamantina
34	543	136	272	543	5,5 (0,2)	5,3 (0,2)	C. Diamantina
5	245	122	122	NS	10,7 (0,3)	2,5 (0,1)	Serra Geral
24	444	222	222	444	9,4 (0,4)	5,6 (0,2)	Oeste

P.aerug.=*P. aeruginosa*; C. Fen. T.= Compostos Fenólicos Totais; Flav. T. = Flavonóides Totais; DP= Desvio Padrão; B. M. S. Francisco= Baixo Médio São Francisco; P. Diamantina = Piemonte da Diamantina; C. Diamantina =Chapada Diamantina

TABELA 23 - Valores da Concentração Inibitória Mínima ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), Teor de Compostos Fenólicos Totais e de Flavonóides Totais ($\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$) de mel de abelhas sem ferrão por espécies e região, coletados no estado da Bahia, de florada silvestre

Am	Abelha	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aerug.</i>	<i>C. alb.</i>	C. Fen. T.(DP)	Flav. T. (DP)	Região
I	<i>Melipona asilvai</i>	72	72	NS	NS	-	-	Nordeste
II	<i>Friseomelita doederleinei</i>	74	19	NS	NS	-	-	Nordeste
III	<i>Melipona quadrifasciata anthidioides</i>	70	35	NS	NS	-	-	Nordeste
IV	<i>Tetragonisca angustula</i>	132	33	NS	NS	-	-	Recôncavo Sul
V	<i>Plebeia sp</i>	254	254	NS	NS	-	-	Nordeste
VI	<i>Melipona scutellaris</i>	175	37	127	NS	9,86 (0,30)	4,01 (0,23)	C. Diamantina
VII	<i>Tetragonisca angustula</i>	123	123	147	-	18,66 (0,53)	11,02 (0,38)	Metropolitana
VIII	<i>Melipona scutellaris</i>	493	123	246	-	6,60 (0,24)	5,20 (0,39)	Paraguaçu
IX	<i>Melipona scutellaris</i>	265	55	132	-	6,27 (0,38)	5,58 (0,33)	Paraguaçu
X	X	515	196	257	NS	6,31 (0,21)	5,85 (0,26)	-----
XI	<i>Melipona scutellaris</i>	241	120	68	NS	12,80 (0,23)	4,71 (0,14)	Sudoeste
XII	<i>Melipona quadrifasciata</i>	525	525	239	NS	7,55 (0,58)	0,13 (0,00)	Paraguaçu
XIII	<i>Melipona quadrifasciata</i>	184	92	NS	NS	8,32 (0,33)	3,93 (0,34)	Nordeste
XIV	<i>Melipona quadrifasciata</i>	187	47	NS	NS	6,44 (0,44)	1,88 (0,07)	Nordeste
XV	<i>Melipona quadrifasciata</i>	174	87	NS	NS	3,96 (0,12)	1,91 (0,12)	Nordeste
XVI	<i>Melipona quadrifasciata</i>	369	92	NS	NS	8,80 (0,18)	4,93 (0,20)	B. M. S.Francisco

Am = Amostra; (-) = não realizado; x= não identificada; P.aerug.= *P. aeruginosa* ; C. alb.= *C. albicans*; C. Fen. T. = Compostos Fenólicos Totais; (DP) = Desvio Padrão; Flav. T. = Flavonóides Totais.

Analisando a atividade antimicrobiana em um subconjunto de amostras (TABELA 22), frente aos teores de compostos fenólicos totais e flavonóides, pode-se notar que apesar das amostras 1, 2, 3, 9 e 15 serem da mesma região, estas apresentam variações na atividade que vão de 493 mg.mL⁻¹ (mel a 37,5% v/v) a 7 mg.mL⁻¹ (mel a 0,6% v/v), inclusive inatividade (NS). É possível observar que o maior teor de fenólicos neste grupo, não corresponde à melhor atividade (vide amostra 15).

Similaridades podem ser observadas dentro de uma mesma região (Recôncavo) onde as amostras (35, 36 e 37) pertencem a um mesmo período e mantêm comportamento similar entre si. Em contrapartida, as amostras 21 e 23 (11,1 e 9,8 mg.100g⁻¹ de C. fenólicos e 5,3 e 4,0 mg.100g⁻¹ de flavonóides respectivamente), oriundas do mesmo município, na Chapada Diamantina, apresentam diferenças na atividade antimicrobiana apesar dos teores próximos dos compostos analisados. Comparando as amostras 19 e 20 (Nordeste), com a 33 (Paraguaçu), podemos notar que estas apresentaram os maiores valores para compostos fenólicos e flavonóides, mas com atividade antimicrobiana bastante variada, sendo a amostra 19, inclusive inativa contra *P. aeruginosa* e *C. albicans*. As amostras 2 e 3 (Litoral Sul), bastante efetivas contra as bactérias e inativas contra *C. albicans*, apresentaram entre si valores próximos de compostos fenólicos, mas teores de flavonóides totais notoriamente diferentes.

Os méis de abelhas sem ferrão nesta amostragem seguiram o mesmo comportamento apresentado pelos méis de *A. mellifera*, e como pode ser visto na TABELA 23, as amostras com maiores teores de compostos fenólicos e flavonóides também não apresentaram necessariamente as melhores atividades (VII e XI). Por outro lado, a amostra XII, com o menor teor de flavonóides totais foi menos efetiva em termos quantitativos, embora com ação contra três dos micro-organismos. Acredita-se que diferenças na ação biológica podem ser devidas ao período e local de coleta, já que esses fatores incidem diretamente na produção de metabólitos secundários nas plantas, modificando a oferta de compostos fenólicos no mel. À luz desses dados a ação antimicrobiana dos méis analisados não parece estar sustentada apenas nos teores, mas também, na especificidade estrutural dos compostos fenólicos presentes em cada amostra.

Os dados da análise estatística de Correlação de Spearman entre a ação dos compostos fenólicos e flavonóides na atividade antimicrobiana dos méis de *A. mellifera* e de abelhas sem ferrão estão expostos na TABELA 24 e ilustrados nas FIGURAS 31, 32, 33, 34, 35 e 36 (Compostos fenólicos) e 37, 38, 39 e 40, 41 e 42 (Flavonóides), respectivamente

TABELA 24- Correlação (rs) Spearman entre Compostos Fenólicos e Flavonóides versus Atividade antimicrobiana (CIM) de méis de *A. mellifera* e de Abelhas sem ferrão do estado da Bahia contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*

Acidez X CIM	(rs) Spearman			
	Compostos Fenólicos		Flavonóides	
	<i>A. mellifera</i>	Abelhas sem ferrão	<i>A. mellifera</i>	Abelhas sem ferrão
Contra <i>E. coli</i>	-0.5027 (p)= 0.0015	-0.3151 (p)= 0.3453	-0.2812 (p)= 0.0917	0.0023 (p)= 0.9947
Contra <i>S. aureus</i>	-0.3038 (p)= 0.0674	0.1098 (p)= 0.7478	-0.2202 (p)= 0.1902	0.2380 (p)= 0.4810
Contra <i>P. aeruginosa</i>	-0.4095 (p)= 0.0118	0.0093 (p)= 0.9783	-0.2953(p)= 0.0759	0.4010 (p)= 0.2215

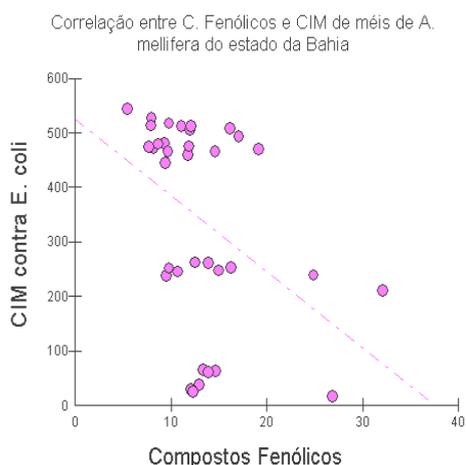


FIGURA 31 - Dispersão da Correlação entre C. Fenólicos e CIM de méis de *A. mellifera* da Bahia contra *E. coli*

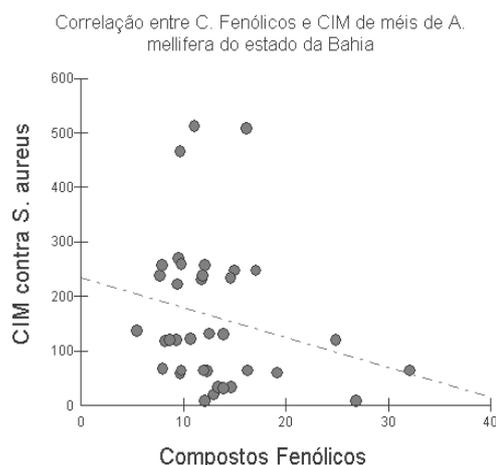


FIGURA 32 - Dispersão da Correlação entre C. Fenólicos e CIM de méis de *A. mellifera* da Bahia contra *S. aureus*

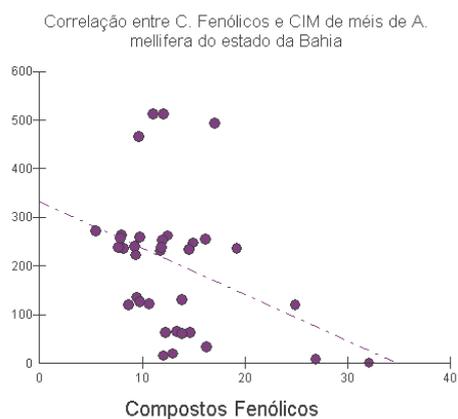


FIGURA 33 - Dispersão da Correlação entre C. Fenólicos e CIM de méis de *A. mellifera* da Bahia contra *P. aeruginosa*

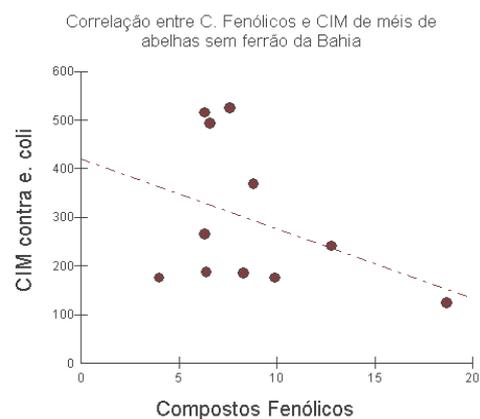


FIGURA 34 - Dispersão da Correlação entre C. Fenólicos e CIM de méis de abelhas se ferrão da Bahia contra *E. coli*

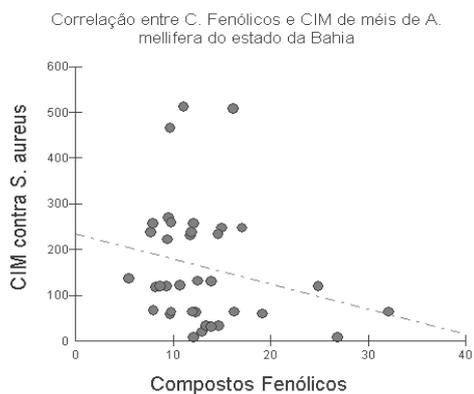


FIGURA 35 - Dispersão da Correlação entre C. Fenólicos e CIM de méis de abelhas se ferrão da Bahia contra *S. aureus*

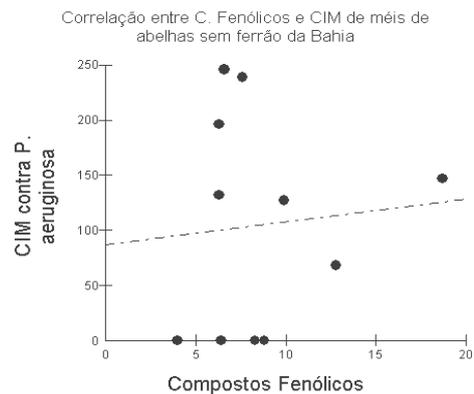


FIGURA 36 - Dispersão da Correlação entre C. Fenólicos e CIM de méis de abelhas se ferrão da Bahia contra *P. aeruginosa*

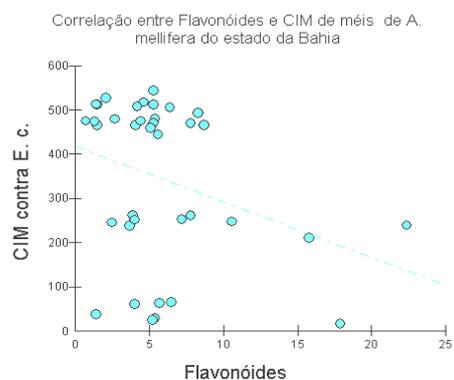


FIGURA 37- Dispersão da Correlação entre Flavonóides e CIM de méis de *A. mellifera* do estado da Bahia contra *E. coli*

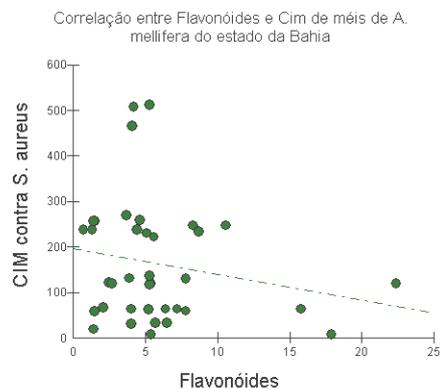


FIGURA 38- Dispersão da Correlação entre Flavonóides e CIM de méis de *A. mellifera* do estado da Bahia contra *S. aureus*

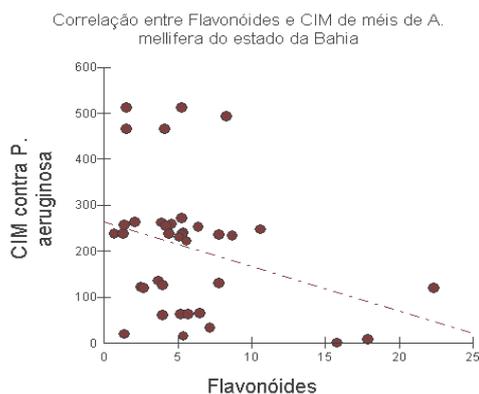


FIGURA 39 - Dispersão da Correlação entre Flavonóides e CIM de méis de *A. mellifera* da Bahia contra *P. aeruginosa*

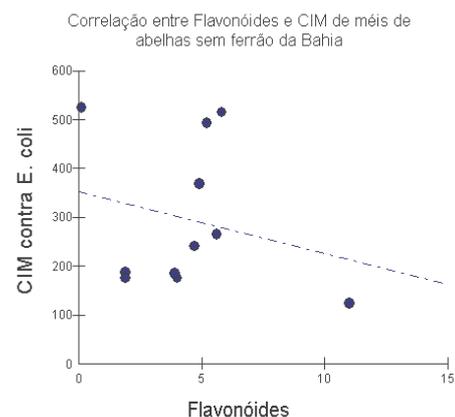


FIGURA 40 - Dispersão da Correlação entre Flavonóides e CIM de méis de abelhas sem ferrão da Bahia contra *E. coli*

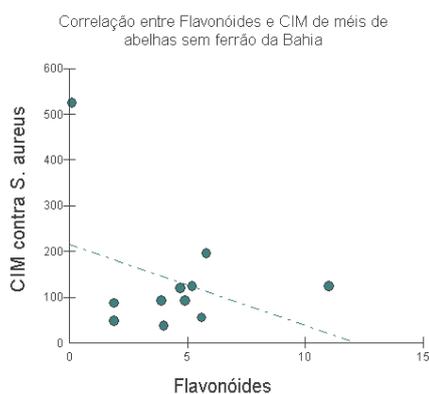


FIGURA 41- Dispersão da Correlação entre Flavonóides e CIM de méis de abelhas sem ferrão da Bahia contra *S.*

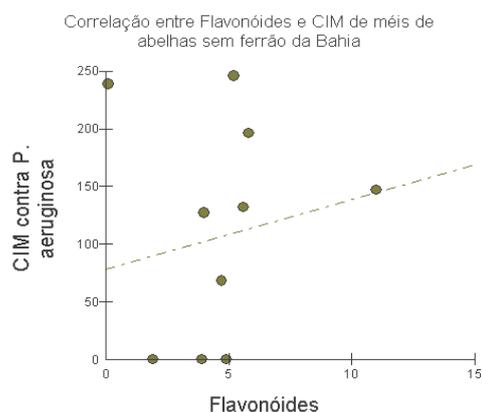


FIGURA 42- Dispersão da Correlação entre Flavonóides e CIM de méis de abelhas sem ferrão da Bahia contra *P. aeruginosa*

Como ilustrado acima (TABELA 24) e FIGURAS 31 a 33, as correlações apresentadas entre compostos fenólicos e as CIMs de méis de *A. mellifera* contra os micro-organismos teste, ficaram entre (rs) Spearman= -0.5027 *E. coli*, e -0.4095 *P. aeruginosa* (média correlação negativa), e baixa correlação negativa, (rs) Spearman= -0.3038, *S. aureus* com (p) = 0.0674. Entre Compostos fenólicos e CIM dos méis de abelhas sem ferrão contra *E. coli*, *P. aeruginosa* (FIGURAS 34 a 36) não houve correlação (valores de (rs) Spearman baixos com (p) bastante superiores a 0.05). No caso de *S. aureus* (FIGURA 35), a correlação baixa negativa (rs) Spearman = -0.3151 não foi considerada devido ao valor de (p)>0.05. A análise

entre Flavonóides e CIM de méis de *A. mellifera* e de abelhas sem ferrão não apresentaram correlação, embora no primeiro caso (méis de *A. mellifera*) o caráter negativo tenha sido apresentado (FIGURAS 37 a 39). Estes dados podem indicar de maneira geral, dada a baixa correlação (r_s) Spearman entre a atividade antimicrobiana (CIM) dos méis de *A. mellifera* e teores de Compostos Fenólicos, que estes não interferiram de maneira significativa na variação da atividade, embora possam ter participado da ação biológica. O caráter negativo das correlações apresentadas (apesar de pouco significativas) é um indicativo dessa participação, pois quanto maior o teor em questão (compostos fenólicos das amostras 2, 3, 9, 12, 33, 35, 37), menor o valor do MIC (maior atividade) apresentado, podendo sinalizar a contribuição do parâmetro na ação antimicrobiana (TABELA 22).

3.3.2.6 Compostos fenólicos (CLAE)

Na análise de compostos fenólicos visando identificação, quantificação e estabelecimento de marcadores químicos para caracterização botânico-geográfica de méis, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) junto a outras ferramentas analíticas, representa a metodologia de consenso entre pesquisadores (D'ARCY 2005; YAO et al., 2004a; PARK et al., 2002; MARTOS et al., 2000; TOMÁS-BARBERÁN et al., 1993; SABATIER et al., 1992; FERRERES et al., 1992; AMIOT et al., 1989). Ferreres et al. (1994a) analisando méis da Espanha, encontraram flavonóides como pinocembrina, pinobanksina, galangina, crisina, luteolina, apigenina, isorhamnetina e 3-metil quercetina. O flavonol canferol foi encontrado em mel de rosmaninho (FERRERES et al., 1998 e 1994b) e a quercetina em mel de girassol (TOMÁS-BARBERÁN et al., 2001). Martos et al. (2000), identificaram os flavonóides miricetina, tricetina, quercetina, luteolina e canferol em diversos méis europeus de eucalipto e propuseram que a miricetina, tricetina e luteolina (não haviam sido associadas, até então, com qualquer origem floral específica) como marcadores do mel eucalipto.

Martos et al. (2000) e Yao et al. (2004a), analisando flavonóides em méis de eucaliptos da Austrália e da Europa, encontrou perfis similares com a presença de miricetina, tricetina, quercetina, luteolina e canferol. Porém, os flavonóides

pinocembrina, pinobanksina e crisina encontrados no mel europeu, não foram encontrados no mel australiano que apresentou por sua vez, a 3-metilquercetina que não havia sido relatada no mel de eucalipto europeu.

No trabalho de Yao et al. (2004b), os ácidos fenólicos foram investigados como marcadores químicos de méis de eucalipto australiano (*E. intermédia*, *E. ochrophloia*, *E. crebra*, *E. nubila*, *E. melliodora*, *E. moluccana*, *E. camaldulensis*, *E. globoidia*, *E. largiflorens*). O ácido gálico foi encontrado em maior concentração em todos os méis estudados (exceção do mel de *E. globoidia*, onde o ácido elágico foi majoritário), sendo indicado como marcador floral para méis de eucaliptos australianos.

Considerando que os flavonóides são polifenóis, e que duas bandas de absorção UV são características deste tipo de molécula (FIGURA 4), acredita-se que a Banda II, com um máximo entre 240 e 285nm, surge a partir do anel A, e a Banda I, com um máximo na faixa de 300-550nm, provavelmente decorra do anel B (SIVAM, 2002).

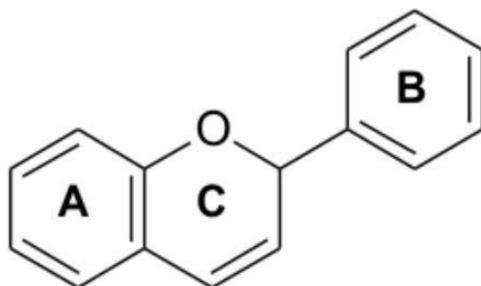


FIGURA 4 (repetição) - Núcleo básico dos flavonóides composto por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C)

Dessa forma, pode-se esperar que compostos com apenas um anel aromático e mais polares como os ácidos fenólicos, em um cromatograma tenham maior expressão na menor faixa de comprimento de onda, e sejam captados em menores tempos de retenção. Os flavonóides, por sua vez, com mais de um anel, seriam mais intensamente registrados em comprimentos de onda maiores (300-550nm), posicionando-se via de regra, em tempos de retenção maiores.

Na análise cromatográfica (CLAE) realizada em méis do estado da Bahia (florada silvestre), foi constatada maior incidência de compostos expressos com maior intensidade a 254nm, sugerindo predominância dos ácidos fenólicos em relação aos flavonóides. Os teores registrados por espectrofotometria de absorção molecular (UV-Vis) mostrados nas TABELAS 22 e 23 reafirmam esta análise, dado que 73% das amostras de *A. mellifera* e 60% de méis de abelhas sem ferrão apresentaram diferenças favoráveis aos ácidos fenólicos, com exceção das amostras 11,13, 20, 33, 7, 8, 17, 22, 28, 34, 24 e VII, VIII, IX e X de *A. mellifera* e abelhas sem ferrão, respectivamente.

A predominância de ácidos fenólicos foi também observada por outros autores em méis brasileiros (LIANDA, 2004; DA SILVA, 2004). Em amostras de méis silvestres do Rio de Janeiro e de São Paulo, (LIANDA 2009) encontrou teores de compostos fenólicos mais elevados, enquanto que os valores de flavonóides totais foram menos significativos, mantendo a afirmação de que, diferentemente dos europeus (ANDRADE et al. 1999; TOMÁS-BARBERÁN et al. 1993; FERRERES et al. 1992; SABATIER et al. 1992; AMIOT et al. 1989), nos méis brasileiros os ácidos fenólicos são bem mais abundantes (DA SILVA, 2004; LIANDA, 2004). Lianda (2009) pode observar ainda, grande variedade com pouca repetição para as substâncias fenólicas identificadas nas amostras desses méis. A autora inferiu que isto poderá dificultar a indicação de um marcador químico que possa contribuir na caracterização da origem botânica dos méis silvestres brasileiros, possivelmente devido à riqueza da flora.

Nesta amostragem (méis silvestres do estado da Bahia), o perfil fenólico analisado por CLAE, embora tenha se mostrado de maneira geral bastante variado, apresentou também, similaridades entre as amostras. Este detalhe pode ser corroborado através da análise estatística multivariada (de correspondência), considerando tempos de retenção dos compostos fenólicos (integração a partir do limite de quantificação) expressa nas FIGURAS 43 e 44 para méis de *A. mellifera* e abelhas sem ferrão, respectivamente. Nessas ilustrações estão representadas afinidades e diferenças entre as amostras caracterizadas pela presença ou ausência, e correspondência de seus constituintes fenólicos.

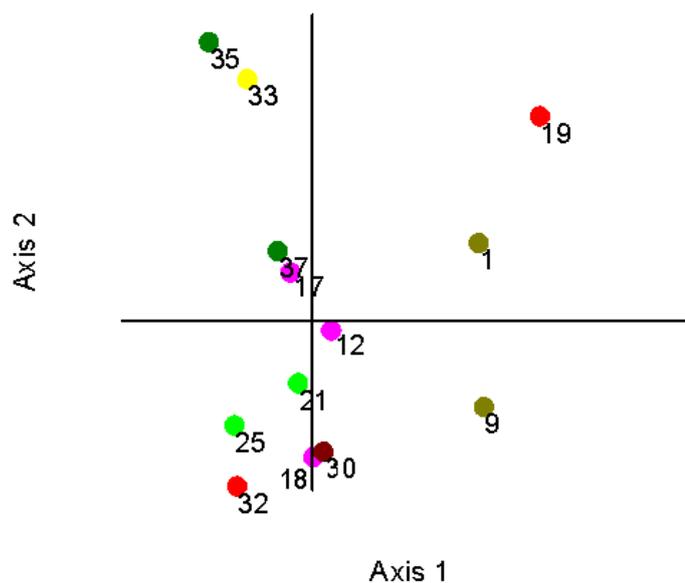


FIGURA 43- Análise Multivariada de Correspondência entre amostras de méis de *A. mellifera* do estado da Bahia e respectivos tempos de retenção de compostos fenólicos (CLAE). LEGENDA: ● Litoral Sul; ● Nordeste; ● Sudoeste; ● Recôncavo Sul; ● Irecê; ● Chapada Diamantina; ● Paraguaçu

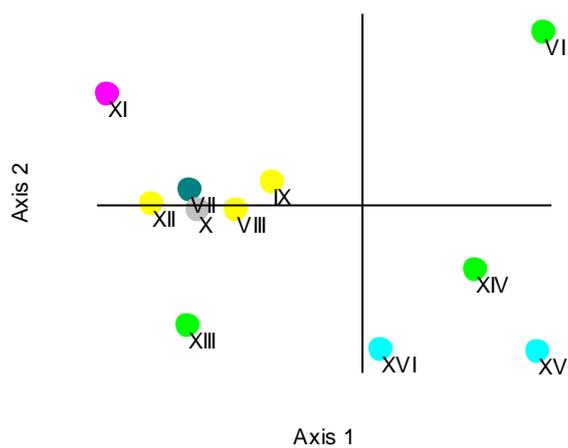


FIGURA 44 - Análise Multivariada de Correspondência entre amostras de méis de abelhas sem ferrão do estado da Bahia e respectivos tempos de retenção de compostos fenólicos (CLAE).

LEGENDA: ● Sudoeste; ● Chapada Diamantina; ● Paraguaçu; ● Metropolitana; ● Baixo Médio São Francisco; ● não identificada

Comparando-se o agrupamento observado nas FIGURAS 43 e 44 com os dados de atividade antimicrobiana não foi possível estabelecer um paralelo entre a similaridade das amostras através do perfil fenólico e os resultados de CIM. As amostras de *A. mellifera* 37, 17, 12, 21, 25, 32, 18 e 30, por exemplo, que estão próximas conforme o gráfico da FIGURA 43, apresentaram CIM frente a *S. aureus* num intervalo de 30 a 512 mg.mL⁻¹; já as amostras 35 e 33, agrupadas a esquerda do gráfico apresentaram CIM de 32 e 8 mg.mL⁻¹, respectivamente, e as amostras isoladas 19, 1, e 9, registraram CIM de 62, 270 e 63 mg.mL⁻¹. O mesmo é observado nas amostras de abelhas sem ferrão, que frente a *S. aureus*, os méis VII, VIII, IX, X e XII, agrupados conforme o perfil fenólico na FIGURA 44, apresentaram CIM entre 55 e 525 mg.mL⁻¹.

As FIGURAS 45 e 46 mostram a disposição de compostos fenólicos comuns à maioria das amostras (área de maior concentração dos pontos) e aqueles mais afastados, que indicam diferenças entre elas. Estes pontos afastados podem representar compostos que exerceram influencia sobre a diferença de atividade biológica exibida pelas amostras.

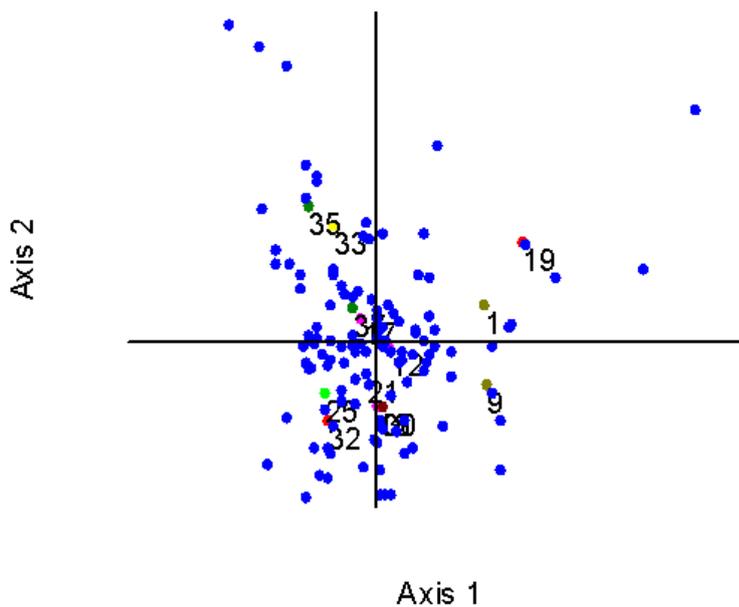


FIGURA 45- Análise Multivariada de Correspondência entre amostras de méis de *A. mellifera* do estado da Bahia e respectivos tempos de retenção de compostos fenólicos (CLAE). LEGENDA: ● Litoral Sul; ● Nordeste; ● Sudoeste; ● Recôncavo Sul; ● Irecê; ● Chapada Diamantina; ● Paraguaçu; ● Compostos Fenólicos

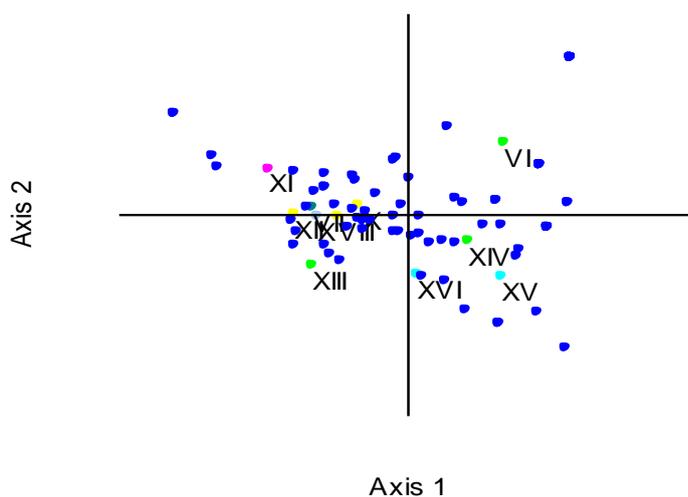


FIGURA 46 - Análise Multivariada de Correspondência entre amostras de méis de abelhas sem ferrão do estado da Bahia e respectivos tempos de retenção de compostos fenólicos (CLAE).

LEGENDA: ● Sudoeste; ● Chapada Diamantina; ● Paraguaçu; ● Metropolitana; ● Baixo Médio São Francisco; ● não identificada; ● Compostos Fenólicos

A FIGURA 47 localiza as amostras nas microrregiões socioeconômicas do estado da Bahia contempladas.

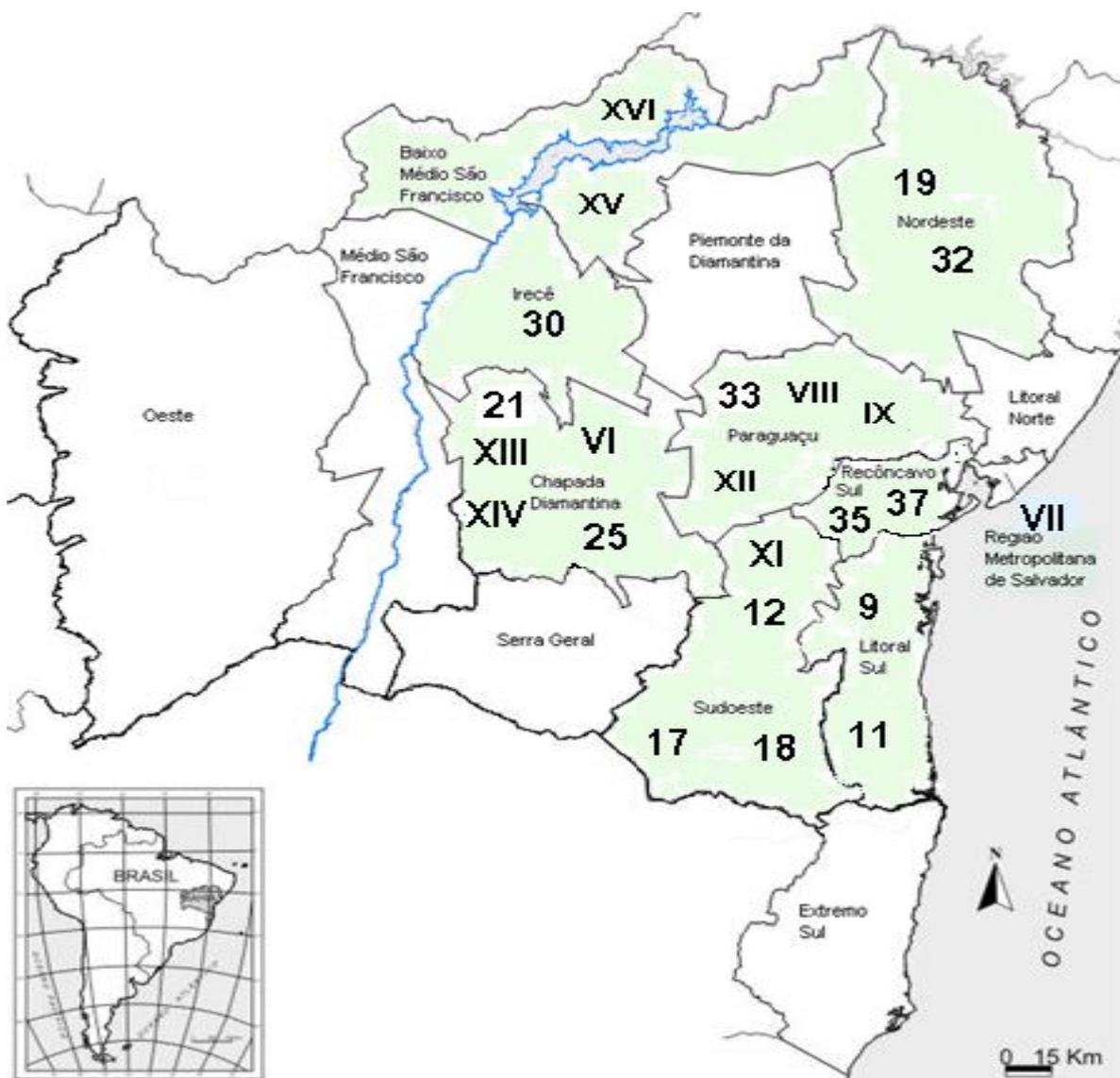


FIGURA 47 - Localização por região, de méis do estado da Bahia (árabicos=méis de *Apis*; romanos=méis de abelhas sem ferrão)

FONTE: SEI, 2007 (modificado).

A análise cromatográfica com DAD, considerando apenas picos majoritários de ácidos fenólicos e flavonóides (registrados a 254 e 340nm, respectivamente), mostrou espectros de UV sugerindo espécies químicas como ácido gálico, ácido elágico, vanílico, e o flavonóide crisina como ilustrado a seguir, na FIGURA 48.

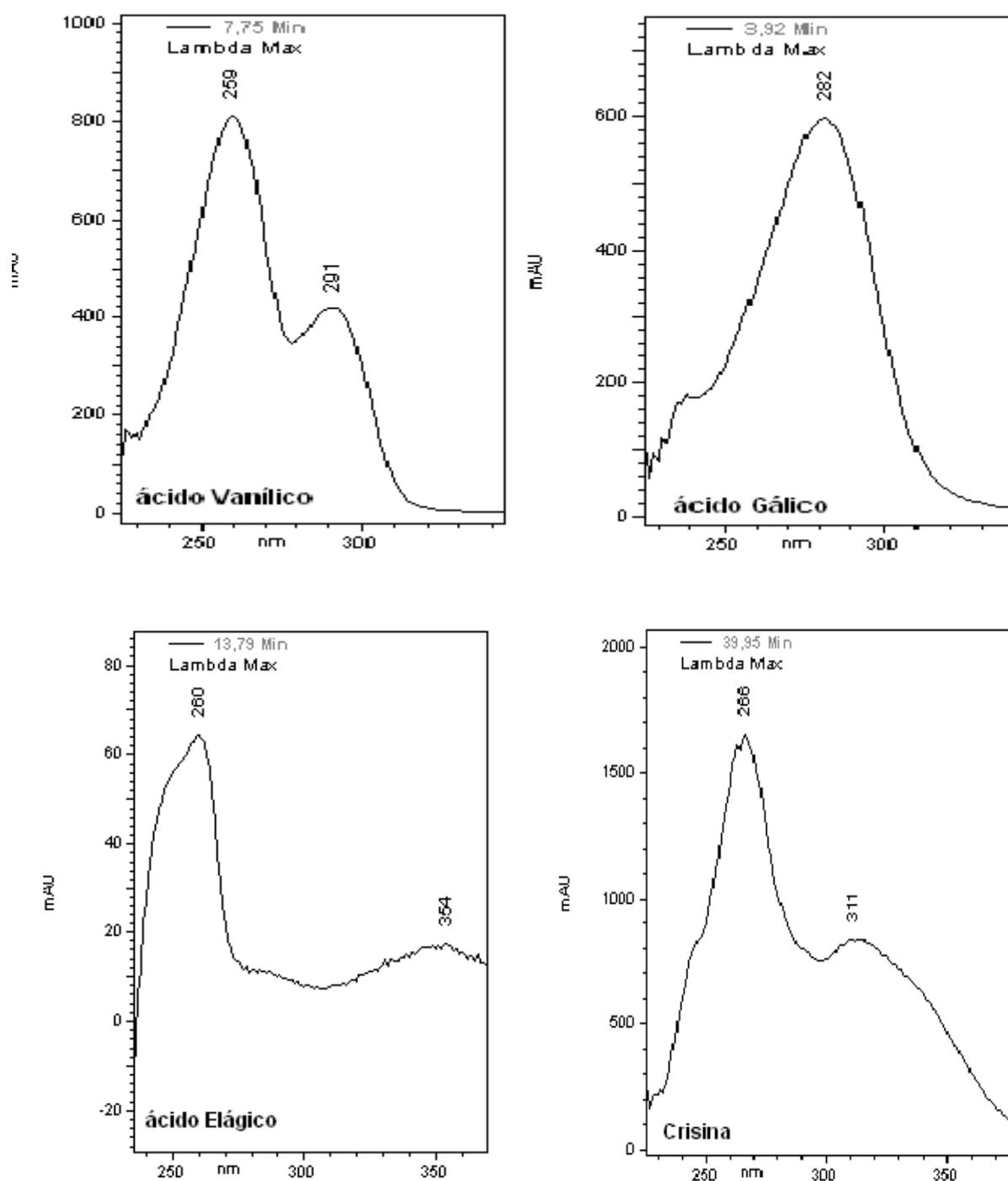


FIGURA 48 - Espectros UV de compostos fenólicos de méis de *A. mellifera* do estado da Bahia.

Os tempos de retenção dos compostos comparados com padrões, e aqueles identificados por seus λ máximos encontram-se na TABELA 25. Os cromatogramas (CLAE) e espectros UV de compostos não identificados encontram-se no ANEXO 1.

TABELA 25 - Tempos de retenção (RT) e λ maximos de picos majoritários em méis do estado da Bahia analisados por CLAE e CLAE-DAD

Amostra (<i>A. mellifera</i>)	RT (min.)	λ max. (nm)	Substância
35; 37	3.41	287	ácido gálico
9; 12; 18; 25; 35; 37	3.29	237	-
12; 25	5.41	249	-
33	5.39	240-275	-
12	6.01	237-270	-
35; 37	6.19	240	-
12;18; 25; 33; 35; 37	7.80	259-291	ácido vanílico
12; 18; 25, 35, 37	15.92	260-361-379	ác. elágico
35; 37	40.05	267-313	crisina
(abelhas sem ferrão)	RT	λ Max.	Substância
VIII; IX	3.35	237	-
VIII; IX	6.65	245-297	-
VIII; IX	13.02	264	-

- = não identificado; min.= minutos

Lianda (2009) em seu estudo observou a presença de canferol, dos ácidos protocatecuico, para-hidroxi-benzóico e para-metoxibenzóico, associando-os com a flora da Mata Atlântica. A autora cita que para os méis silvestres foram encontrados além dos ácidos citados, o vanílico, para-cumárico e cinâmico, e os flavonóides morina, quercetina, canferol e isoquercetina, porém o ácido gálico e o flavonóide rutina não foram registrados.

Nos méis do estado da Bahia analisados (por DAD, comparação com RT de padrões e dados de literatura-LIANDA 2009; D'ARCY 2005; MABRY et al. 1970), foram encontrados o ácido gálico, p-cumárico, ferúlico, vanílico e elágico, e os flavonóides rutina, quercetina, pinocembrina e 3,6-dihidroxi-flavona, na maioria das amostras consideradas. O flavonóide crisina foi detectado em duas amostras (a 35 e a 37), ambas da região do Recôncavo Sul. Deve ser levado em consideração que os méis analisados neste trabalho têm origem silvestre dos três biomas mais expressivos no estado, principalmente caatingas, configurando um cenário de grande riqueza botânica. Segundo Lianda (2009), devido à variedade e baixa frequência das substâncias encontradas, no citado trabalho não pode ser estabelecido nenhum marcador químico de origem botânica.

O perfil fenólico dos méis analisados de *A. mellifera* do estado da Bahia, apresentou grande variedade, enquanto que os méis de abelhas sem ferrão de maneira geral apresentaram menor diversidade de compostos fenólicos embora em alguns casos, com significativa expressão. Estes detalhes podem ser vistos nas FIGURAS 49, 50, 51 e 52.

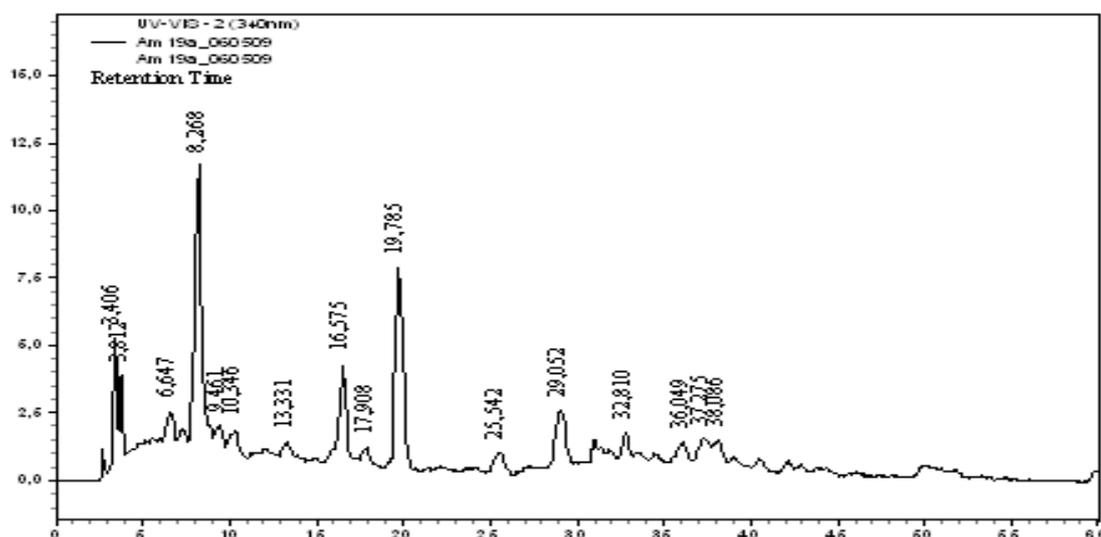


FIGURA 49 - Cromatograma de compostos fenólicos (CLAE) de mel (amostra 19) de *A. mellifera* do estado da Bahia em cromatógrafo líquido Shimadzu SCL-10Aup, coluna Lichrospher RP-18 (fase reversa) de 25,0 x 0,42cm , com partícula de 5µm.

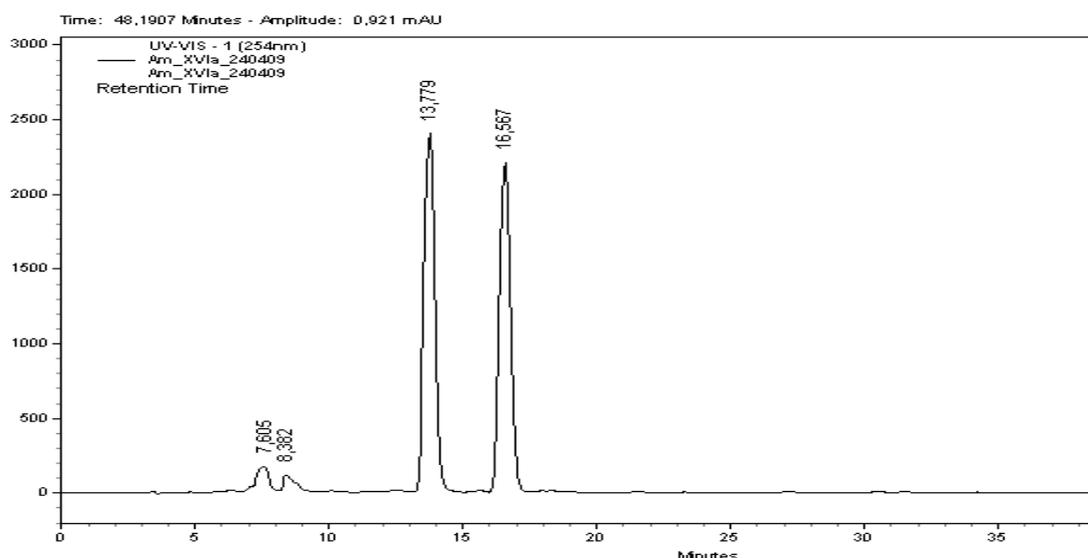


FIGURA 50 - Cromatograma de compostos fenólicos (CLAE) de mel (amostra XVI) de abelha sem ferrão do estado da Bahia em cromatógrafo líquido Shimadzu SCL-10Aup, coluna Lichrospher RP-18 (fase reversa) de 25,0 x 0,42cm, com partícula de 5µm.

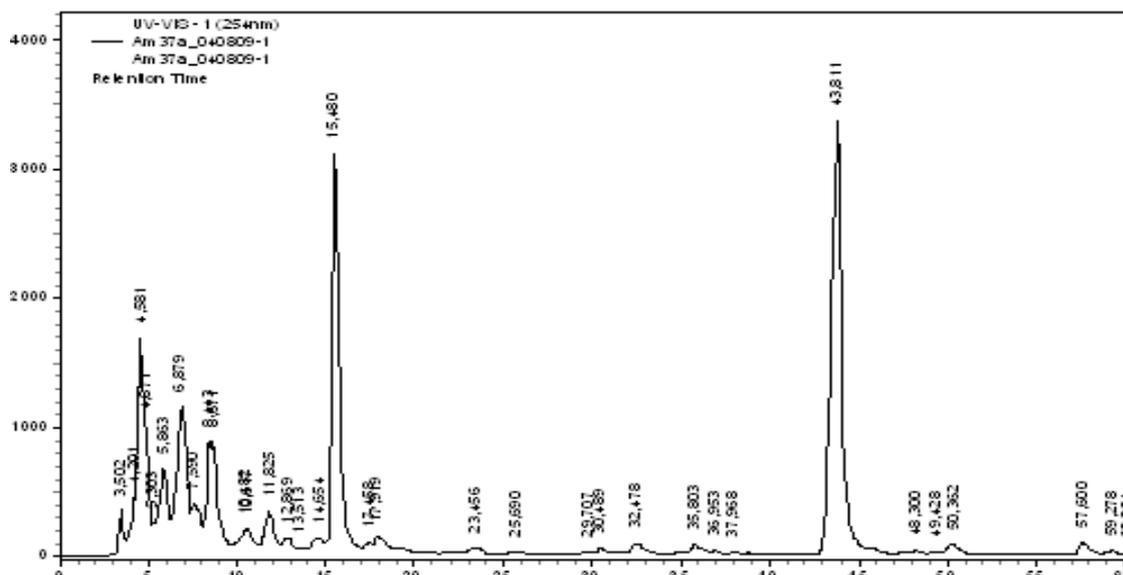


FIGURA 51 - Cromatograma de compostos fenólicos (CLAE) de mel (amostra 37) de *A. mellifera* do estado da Bahia em cromatógrafo líquido Shimadzu SCL-10Aup, coluna Lichrospher RP-18 (fase reversa) de 25,0 x 0,42 cm, com partícula de 5µm.

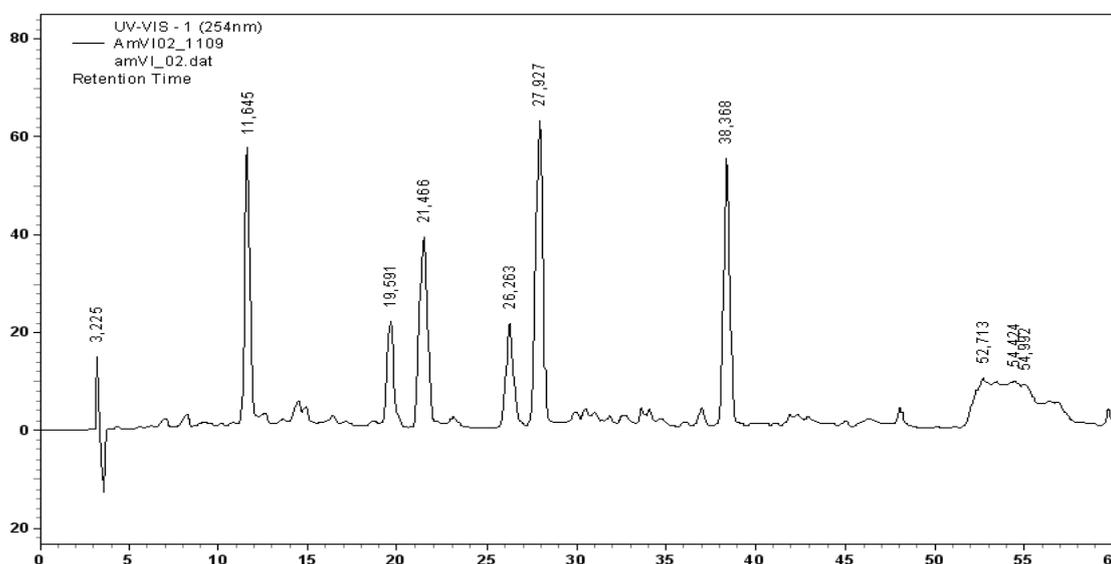


FIGURA 52 - Cromatograma de compostos fenólicos (CLAE) de mel (amostra VI) de abelha sem ferrão do estado da Bahia em cromatógrafo líquido Shimadzu CL-10 Aup, coluna Lichrospher RP-18 (fase reversa) de 25,0 x 0,42 cm, com partícula de 5µm.

Apesar de que na CLAE, o tempo de retenção (RT) é característico de cada composto (é o seu modo de interação com a fase estacionária) e pode fornecer indícios da sua presença, por si só não o identifica. Este resultado deverá ser validado pela comparação do padrão da provável substância, analisado nas mesmas condições da amostra, e/ou com técnicas auxiliares, qual seja a CLAE-DAD

(Cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV com arranjo de fotodiodo), LC-MS (Cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massa) entre outras.

Neste estudo, foi utilizada comparação com de tempos retenção de padrões e registros em DAD de algumas amostras. Haja vista ter a leitura de padrões apresentado oscilações de mais ou menos 2 (dois) minutos nos tempos de retenção (quando analisados em diferentes dias), essa variação foi aceita também na leitura das amostras.

Selecionando microrregiões onde foram coletados os méis de *A. mellifera* mais ativos analisados por CLAE, e agrupando por tempo de retenção aqueles picos com absorção mais expressiva (TABELA 25), pode-se verificar que o composto de RT igual a 11.8 esteve presente em todas as regiões contempladas (Frequência Relativa - RF = 100%). Em seguida com presença de 86% observa-se o pico de RT igual a 36.8, e os de RT igual a 5.3, 6.5, 6.8, 7.5, 8.4, 10.5, 13.5, 15.2, aparecendo em 71% dos casos. A tabela mostra ainda maior presença de ácidos fenólicos (RTs menores numa faixa de 0 a 60 minutos), sugerindo maior participação dessa classe de compostos na atividade expressada pelos méis considerados. Dentre as regiões analisadas pode ser observado que a Chapada Diamantina, Nordeste, Paraguaçu e Recôncavo Sul apresentaram maior ocorrência e distribuição de ácidos fenólicos e flavonóides, enquanto que as regiões Sudoeste e Litoral Sul foram menos contempladas, esta última inclusive, com baixa incidência de flavonóide (picos majoritários).

Considerando todos os compostos fenólicos registrados acima do valor de detecção do método, ou seja, picos majoritários e minoritários, pode ser visto que nos méis do Litoral Sul os flavonóides foram menos frequentes. Já a Chapada Diamantina foi mais expressiva em variedade de picos, tanto nos méis de *A. mellifera* (TABELA 25), como nos de abelhas sem ferrão, para os dois grupos de compostos. Analisando-se particularmente esta microrregião, relacionando este dado com a atividade antimicrobiana em uma escala de valores onde alta atividade seria $> 0 < 47$, atividade média $> 47 < 158$, e atividade baixa > 158 até 526 mg.mL^{-1} , os méis de *A. mellifera* desta microrregião, apresentaram baixa a média atividade, e os de abelhas sem ferrão, atividade entre média a alta. Nesta análise, a região com atividade mais expressiva para ambos os tipos de mel foi a Recôncavo Sul, mas

nenhum padrão de atividade *versus* compostos fenólicos foi evidenciado, como sinalizado pela a análise multivariada de correspondência. A diversidade botânica sustentada pelas variações climáticas e geográficas das diversas microrregiões imprime diferenças nos méis, dificultando comparações, quando locais e períodos de produção restritos não foram contemplados na amostragem.

A TABELA 26 mostra a incidência de compostos fenólicos em méis de *Apis mellifera* do estado da Bahia, considerando tempos de retenção dos compostos.

TABELA 26 - Ocorrência (RF%) de picos majoritários (RT em minutos) de compostos fenólicos (CLAE) de méis de *Apis mellifera* de microrregiões socioeconômicas do estado da Bahia

Microrregiões socioeconômicas do estado Bahia								RF(%)
RT (min.)	C. Diamantina	Irecê	Lit. Sul	Nordeste	Paraguaçu	Rec. Sul	Sudoeste	
3.4			x	x		x		43
4.0		x	x					28
4.8	x			x	x	x	x	71
5.3		x		x		x		43
5.7				x	x	x		43
6.5	x	x		x	x		x	71
6.8	x		x	x		x	x	71
7.5	x	x	x		x	x		71
8.4	x		x		x	x	x	71
9.0	x	x	x	x				57
9.5	x		x	x			x	43
10.1	x	x		x	x		x	71
10.5			x			x		28
11.8	x	x	x	x	x	x	x	100
13.5	x		x	x		x	x	71
14.4		x			x	x		43
15.2	x	x	x	x	x			71
15.5	x					x		28
16.1	x	x		x				43
16.5				x			x	28
16.8	x						x	28
17.8		x			x	x		43
19.5	x			x				28
29.7	x					x		28
31.9	x	x			x			43
33.0	x				x			28
35.6		x		x				28
35.8				x		x		28
36.8	x	x		x	x	x	x	86
39.3	x	x						28
43.7					x	x		28
49.4	x	x				x		43
50.9		x			x			28
57.5					x	x		28
50.9					x	x		28
60.1	x					x		28

Dentre os tempos de retenção (RT em minutos) apresentados na TABELA 26, alguns foram comuns aos padrões de ácido gálico (3,4), ácido para-cumárico (10,5), ácido ferúlico (11,8), e aos flavonóides rutina (16,5), quercetina (31,9), pinocembrina (43,7) e 3,6-dihidroxiavona (49,4). Vários compostos não puderam ser identificados, o que demanda novos estudos no sentido de refinar o conhecimento sobre o perfil fenólico dos méis do estado da Bahia.

3.3.3 Validação da metodologia (CLAE)

Para validação da metodologia empregada na detecção de compostos fenólicos por CLAE, foi calculada a estimativa do limite de detecção do método segundo a expressão: $LD = 3,3DP / \text{coeficiente angular da curva}$ (DP= desvio padrão), cujo valor encontrado foi = $0,0068 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. A estimativa para o limite de quantificação ($LQ = 10DP / \text{Coeficiente angular}$) foi = $0,0207 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

A linearidade do método foi determinada através de curvas analíticas (n=3) cada uma com 5 (cinco) concentrações (31,25 a 500,00 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de um *pool* de padrões diluídos em metanol, lidos em dois comprimentos de onda (254 e 340nm). As equações resultantes apresentaram coeficientes de correlação (R^2) = 0,9997 e 0,9998 respectivamente, valores superiores a 0,99, recomendado como mínimo pela ANVISA (2009).

Os testes de precisão ou repetibilidade foram realizados através do cálculo de desvio padrão relativo (DPR) de injeções de amostras repetidas em triplicata no mesmo dia e em dias consecutivos segundo a equação:

$$\text{DPR} = (\text{DP}/\text{CMD}) * 100$$

Onde, **DP** é o desvio padrão e **CMD**, a concentração média determinada. Os valores encontrados (0,93% e 0,27%, **DP** e **CMD**, respectivamente) estão de acordo com a ANVISA (2009), cujo valor máximo preconizado é 5%.

A atividade antimicrobiana do mel está inegavelmente relacionada, entre outros fatores, aos seus constituintes químicos advindos da sua origem botânica. Assim sendo, a combinação de métodos físicos e químicos poderia ser uma abordagem promissora para demonstrar autenticidade dos diferentes méis (ANKLAM 1998), com indicação de uso e agregação de valor econômico. A análise polínica e das substâncias fenólicas, incluindo os flavonóides, têm sido sugeridas na identificação de mel (AMIOT et al. 1989), e dessa forma têm sido usadas como ferramenta para o estudo da origem botânica e geográfica de méis de várias partes do mundo. Esta é uma lacuna que precisa ser preenchida nos méis do estado da Bahia, dada a sua importância como matéria prima cuja produção pode trazer benefícios às populações de áreas menos favorecidas e ao meio ambiente.

REFERÊNCIAS

AHN, C. e STILES, M. E., Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed meats, **Journal of Applied Bacteriology**, Edmonton, Canada, n. 69, p. 302–310, 1990.

AL, M. L.; DANIEL, D.; MOISE, A.; BOBIS, O.; LASLO, L.; BOGDANOV, S., Physical-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania, **Food Chemistry**, Cluj-Napoca, Romania, n.112, p. 863-867, 2009.

ALCONFORADO-FILHO, F. G., GONÇALVES, J. C., Flora apícola e mel orgânico. In: VIVLEA, S. L. de O. (org.). **Cadeia Produtiva do mel no Estado do Piauí**, Teresina: **Embrapa Meio-Norte**, p.48-59, 2000.

ALENCAR, S. M., Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil, Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - **Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, 120 pp., 2002.

ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKO, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species, **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Athens, Greece, v.40, p.4168-4170, 2001.

ALLEN, K. L., MOLAN, P. C., REID, G. M. A., Survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Arlington, USA, v. 43, p. 817-822, 1991.

ALMEIDA, D. de, Espécies de abelhas (Hymenoptera Apoidea) e tipificação dos méis por elas produzidos em área de cerrado do município de Pirassununga, Estado de São Paulo, Piracicaba, , **Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP**, 2002.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B. de; BARION, F., Physicochemical evaluation of Brazilian honey from Jataí bee (*Tetragonisca angustula*). In: **APIMONDIA INTERNATIONAL APICULTURAL CONGRESS, 40**, Melbourne, **Proceedings...**

Melbourne, Austrália: [s.n.], p. 90-91, 2007.

AMIOT, M. J.; AUBERT, S.; GONNET, M. e TACCHINI, M., The phenolic compounds in honeys: preliminary study upon identification and family quantification, **Apidologie**, Montfavet, France, v.20, n.2, p.115-125, 1989.

ANACLETO, D. A.; SOUZA, B. A.; MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. C. C., Composition of the honey of samples originated from Jataí bees (*Tetragonisca angustula* L., 1811), **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.29, n.3, p. 535-541, 2009.

ANDRADE, P. B.; AMARAL, M. T.; ISABEL P. et al. Physicochemical attributes and pollen spectrum of Portuguese heather honeys., **Food Chemistry**, Oxon, England, v.66, n.4, p.503-510, 1999.

ANKLAM, E., A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey, **Food Chemistry**, Ispra, Italy, v. 63, n.4, p. 549–562, 1998.

ANVISA Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, GUIA PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS E BIOANALÍTICOS. Disponível em: https://anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso: dez. /2009.

A.O.A.C.-16th Edition, Rev. 4th - 969.38 B / 962.19, 1999.

APACAME (2010). Disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/102/evento.htm>. Acesso: abril/2010.

ARRUDA, C. M. F. Características físico-químicas e polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L., 1958 (Hymenoptera, Apidae) da região da Chapada do Araripe, município de Santana do Cariri, estado do Ceará, **Dissertação** (Mestrado em Ciência) - **ESALQ**, Piracicaba, São Paulo, 86 ff., 2003.

BARTH, O. M., O pólen no mel brasileiro, Rio de Janeiro: **Gráfica Luxor**, 150 pp., 1989.

BASTOS, D. H. M.; SILVA, J. R. Análise de méis produzidos na região de Bragantina, **Revista LECTA**, São Paulo, v. 12, n. 2, p. 121-134, 1994.

BENDINI, J. N.; SOUZA, D. C., Caracterização físico-química do mel de abelhas proveniente da florada do cajueiro **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v.38, n.2, p.565-567, 2008.

BERTONCELJ, J.; DOBERŠEK, U.; JAMNIK, M.; GOLOB, T., Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey, **Food Chemistry**, Eslovenia, n.105, p. 822-828, 2007.

BIO, Disponível em: BIO-ORGANIC CHEMISTRY, F:\Flavonoides\t-BOC-L – theoretical Bio-Organic Chemistry Laboratory - Flavonóides.mht Acesso: mai./ 2009.

BIOESTAT 5.0- Aplicações Estatísticas nas áreas das Ciências Biomédicas, Belém, Pará. Disponível em: <http://www.mamiraua.org.br/download/index.php?dirpath=./BioEstat%205%20Portugues&order=0>. Acesso em: dez./2009.

BLASA, M.; CANDIRACCI, M.; ACCORSI, A.; PIACENTINI, M. P.; ALBERTINI, M. C.; PIATTI, E., Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants, **Food Chemistry**, Urbino, Italy, v. 97, p. 217–222, 2006.

BOGDANOV, S., RUOFF, K., PERSANO ODDO, L., Physico-chemical methods for the characterization of unifloral honeys: a review, **Apidologie**, Roma, Italy, v.35, p S54-S17, 2004.

BOGNADOV, S., Nature and origin of the antibacterial substances in honey, **Lebensmittel-Wissenschaft-und-Tchnologie**, Bern, Switzerland, v. 30, n. 7, p. 748-753, 1997.

CÁMARA, J. Q., SOUZA, A. H. de, VASCONCELOS, W. E., Estudos de meliponíneos, com ênfase a *Melípona subnitida* D. no município de Jandaíra, RN. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Paraíba, v.4, n.1, p.1-20, 2004.

CARVALHO, C. A. I. de; MARCHINI, L. C.; SODRÉ, G. S., Análises de amostras de méis provenientes do recôncavo da Bahia, In: **Encontro sobre Abelhas**, 4, Ribeirão Preto, **FFCL, FM- USP**, p.352, 2000.

CARVALHO, C. A. L. de; SOUZA, B. DE A.; SODRÉ, G. da S., Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química, Cruz das Almas: **Nova Civilização**, 32 pp. (Série Meliponicultura, 4), 2005.

CEPLAC (2010). Disponível em:

<http://www.ceplac.gov.br/radar/semfaz/apicultura.htm>. Acesso: abril/ 2010.

CHANCHAO, C., Antimicrobial activity by *Trigona laeviceps* (Stingless Bee) honey from Thailand, **Pak J. Med Sci.**, Bangkok, Thailand, v.25, n. 3, p. 364-369, 2009.

CHIRIFE, J.; HERSZAGE, L., Sugar for infected wounds. **Lancet**, Buenos Aires, v. 2, n. 8290, p. 157, 1982.

CHIRIFE, J.; HERSZAGE, L.; JOSEPH, A.; KOHN, E.S. In vitro study of bacterial growth inhibition in concentrated sugar solutions: microbiological basis for the use of sugar in the treatment of infected wound, **Antim. Agents Chemoth.**, Buenos Aires, v. 23, p.766-773, 1983.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; **Approved Standard—Eighth Edition. CLSI document M2-A8** (ISBN 1- 56238- 485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, 1908 - 1898, USA, 2003a.

CLSI, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; **Approved standard- six edition. CLSI document M7-A6** (ISBN 1- 56238-486-4), CLSI, 940 West Valley Road, suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 2003b.

CLSI, Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras; **Norma aprovada-2. edição- CLSI document M27-A2** [ISBN 1-56238-469-4], CLSI, 940 West Valley Road, suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 2002.

CONCEIÇÃO, A. A., GIULIETTI, A. M., Composição florística e aspectos estruturais de campo rupestre em dois platôs do Morro do Pai Inácio, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil, **Hoehnea**, 29 (1) 37-48, 2002.

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

CORREIA-OLIVEIRA, M. E. ; FERREIRA, A. F.; PODEROSO, J. C. M.; LESSA, A. C. V.; ARAÚJO, E. D.; CARNELOSSI, M. A. G.; RIBEIRO, G. T., Atividade de água (aW) em amostras de pólen apícola desidratado e mel do estado de Sergipe, **Revista da Fapese**, SE, v.4, n.2, p.27-36, 2008.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; GELLI D. S., Pollen Analysis: physicochemical properties and antibacterial action of brazilian honeys from africanized honeybees (*Apis-mellifera* L) and stingless bees, **Apidologie**, USA, v. 22, n. 1, p. 61-73, 1991.

CRANE, E., O livro do mel, São Paulo: **Editora Nobel**, 226 pp., 1987.

D'ARCY, B. R. Antioxidants in Australian Floral Honeys—Identification of health-enhancing nutrient components. **Rural Industries Research and Development Corporation**. RIRDC Publication n. 05/040-RIRDC Project n. UQ-102A., Australia, 94 pp., 2005.

DA SILVA, R. F., Investigação de ácidos fenólicos em amostra de mel por cromatografia líquida de alta eficiência e sua aplicação na caracterização da origem floral. **Dissertação** (Mestrado), **PPGQO-UFRRJ**, RJ, ff. 82, 2004.

DENARDI, C.A.S.; NISHIMOTO, E.J.; BALIAN, S.C.; TELLES, E.O., Avaliação da Atividade de água e da contaminação por bolores e leveduras em mel comercializado na cidade de São Paulo, **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, SP, v. 64, n.2, p. 219-222, 2005.

DRUMOND, P., Abelhas indígenas sem ferrão. Disponível em: <http://www.cpafac.embrapa.br/chefias/cna/artigos/abelhas.htm>. Acesso em: jul./2007.

EFEM, S. E. E., Clinical observations on the wound healing properties of honey. **British Journal of Surgery**, Oxford, v.75, n.7, p. 679-681, 1988.

EFEM, S. E. E.; IWARA, C. I. The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance, **Infection**, Calabar, Nigeria, v.20, n.4, p.227-229, 1992.

FERRERES, F.; JUAN, T.; PEREZ-ARQUILLUE, C.; HERRERA-MARTEACHE, A.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A., Evaluation of pollen as a source of kaempferol in rosemary honey, **Journal Science Food Agric.**, Washington, n.77, p. 506-510, 1998.

FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; SOLER, C.; GARCÍA-VIGUERA, C.; ORTIZ, A.; TOMÁS-LORENTE, F., A simple extractive technique for honey flavonoid HPLC analysis, **Apidologie**, Murcia, Spain, v. 25, n.1, p. 21–30, 1994a.

FERRERES, F.; ANDRADE, P.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A., Flavonoids from Portuguese heather honey, **Z. Lebensm. Unter. Forsch.**, Murcia, Spain, v. 199, p. 132–137, 1994b.

FERRERES, F.; ORTIZ, A.; SILVA, C.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; TOMÁS-LORENTE, F., Flavonoids of “La Alcarria” honey. A study of their botanical origin, **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, Berlin, Germany, n. 194, v.2, p.139-143, 1992.

FUKUDA, E.K.; VASCONCELOS, A.F.D. ;MATIAS, A. C.; BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; SILVA, M. L. C., Fungal cell wall polysaccharides: purification and characterization, **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, PR, v. 30, n. 1, p. 117-134, 2009.

GARCIA, M. V.; ARTURI, M. J.; ANSIN, O. E., Phenotypic and genetic variability in wild populations of dallis Grass (*Paspalum dilatatum* Poir.), **Agricultura Técnica**, Chillán, Chile, v. 62, n. 2, 2002.

GETHIN, G.T.; COWMAN, S.; CONROY, R.M., The impact of Manuka honey dressings on the surface pH of chronic wounds, **Int. Wound J.**, Dublin, Ireland (RCSI), v. 5, n.2, p.185-194, 2008.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M., QUEIROZ, L. P., Espécies endêmicas da caatinga. *In*: SAMPAIO, E. V. C. B. et al. (Ed.) *Vegetação & Flora da Caatinga*, Recife: **APNE, CNIP**, p. 103-118, 2002.

GIULIETTI, A. M.; PIRANI, J. R., Patterns of geographic distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil, In: W R. Hever; P. E. Vanzolini, **Proceedings of a workshop on Neotropical distribution patterns**, Rio de Janeiro, **Academia de Ciências**, p. 39-69,1988.

GONÇALVES, A. L., ALVES FILHO, A., MENEZES, H., Atividade antimicrobiana do mel da abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera: Apidae, meliponini). **Arquivo Instituto de Biologia**, São Paulo, v.72, n.4, p.455-459, 2005.

GONNET, M. **Le miel**: composition, propriétés, conservation. 2. ed. **Montfavet: OPIDA**, France, 109 pp., 1982.

HAMMER, O., HARPER, D.A.T., and P. D. RYAN,. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp, 2001, disponível em: <http://folk.uio.no/ohammer/past> , acesso: dez./2009.

HOFFMANN, F. L., Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos, **Brasil Alimentos, Unesp**, São José do Rio Preto, SP, v. 9, n. 1, p. 23-30, 2001.

HONEY, as an antimicrobial agent, **Waikato Honey Research Unit** Disponível em: http://bio.waikato.ac.nz/honey/honey_intro.shtml#Acidity, Acesso: dez./ 2009.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/> Acesso em: jan./2007.

IBGE, 2002, Disponível em: <http://www.cabecadecuia.com/noticias/47391/piaui-e-destaque-no-ranking-de-exportacoes-de-mel-no-pais.html>. Acesso em: ago./ 2009.

INTERNATIONAL TRADE FORUM. Upswing in the honey market. International

Trade Forum, Geneva, v.13, n.3, p.21-31, 1977. **Resumo em Apic. Abstr.**, London, v.30, n.3, p.214, 1979.

ISCS-SUL - **Manual Prático de Microbiologia**, Cap. 5 Instituto Superior de Ciências da Saúde. Disponível em: <[www. pt/ficheiros/alunos/microbiologia/pratica/](http://www.pt/ficheiros/alunos/microbiologia/pratica/)> Acesso em: jun./ 2007.

JAMES, O.B.O'L.; S EGROE, W.; V ENTURA, A.K., Some antibacterial properties of Jamaican honey, **West Indian Medical Journal**, [S.l], v.21, p.7-17, 1972.

KERR,W. E., CARVALHO, G. A., NASCIMENTO, V. A., Abelha Uruçu: biologia, manejo e conservação. Belo Horizonte: **Fundação Acangaú**, 143 pp., 1996.

KIM, D-O. ; JEONG, S. W.; LEE, C. Y., Antioxidant capacity of phenolic phytochemic various cultivars of plums, **Food Chemistry**, New York, USA, v.81, 321–326, 2003.

KOMATSU, S. S., Caracterização físico-química de méis de *Apis mellifera* L.,1758 (HYMENOPTERA: APIDAE) de diferentes municípios de São Paulo, **Tese** (Doutorado - Entomologia) – **ESALQ**, Piracicaba, SP, 89ff., 1996.

LAMBERT, P. A., Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria, **J. Appl. Microbiol.**, Aston, Birmingham, UK, Supl. n. 92, p. 46S-54S, 2002.

LEVY JR. N.C., Estudo da atividade antimicrobiana de méis e própolis de *Apis mellifera* e Meliponinae brasileiros, **Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências**, Rio Claro, Dissertação (Mestrado), 116 ff., 1997.

LIANDA, R. L. P., Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros e avaliação do potencial antioxidante, Tese (Doutorado), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 156 ff., 2009.

LIANDA, R.L.P. Caracterização de mel de *Apis mellifera* pelo seu perfil em substâncias fenólicas por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação da atividade biológica, Dissertação (Mestrado), **PPGQO-UFRRJ**, RJ,142 ff., 2004.

LUSBY P.E.; COOMBES A.L.; WILKINSON J.M., Bacterial activity of different honeys against pathogenic bacteria, **Arch. Med. Res.**, Wagga Wagga, Australia, v. 36, n.5, p.464-467, 2005.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B., The systematic identification of flavonoids, Ed. **Springer-Verlag New York Inc.**, USA, 354 pp., 1970.

MANUAL de Instruções de Amberlite XAD2.

MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. C. C. Características físico-químicas de amostras de mel de cinco diferentes espécies de eucaliptos. In: **SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 4**, Campinas, **Resumos...** Campinas: **SBCTA**, p. 42, 2001.

MARCHINI, L. C.; CARVALHO, C. A. L. de; ALVES, R. M. de O.; TEIXEIRA, G. M.; OLIVEIRA, P. C. F. de; RUBIA, V. R., Características físico-químicas de amostras de méis da abelha uruçú (*Melipona scutellaris*), In: **Anais do XII Congresso Brasileiro de Apicultura**, Salvador, BA, p.201, 1998.

MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. de C. C.; OTSUK, I. P., Análise de agrupamento, com base na composição físico-química, de amostras de méis produzidos por *Apis mellifera* L. no estado de São Paulo, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 8-17, 2005.

MARCHINI, L. C.; SODRÉ, G. S.; RODRIGUES, R. S., Características físico-químicas de amostras de méis de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidea) provenientes do Mato Grosso do Sul, In: **SIMPÓSIO Latinoamericano de Ciência de Alimentos, 4**, Campinas, **Resumos**, Campinas: **Vieira Gráfica & Editora Ltda.**, 160 p., 2001.

MARTINS, C. F. Diversity of the bee fauna of the Brazilian caatinga. In: **KEVAN P.G.; IMPERATRIZ-FONSECA V. L. (eds.)**, **Pollinating bees: the conservation link between agriculture and nature**. Brasília, **Minist. Meio Ambiente**, p.131-134, 2002.

MARTINS, S. C. S.; ALBUQUERQUE, L. M. B.; MATOS, J. H. G.; SILVA, G. C.; PEREIRA A, J.B., Atividade antibacteriana em méis de abelhas africanizadas (*Apis*

mellifica) e nativas (*Melipona scutellaris*, *M. subnitida* e *Scaptotrigona bipunctata*) no estado do Ceará, **Higiene Alimentar**, v.52, p.50-53, 1997.

MARTÍNEZ, C. A. E.; MEZA, G. G. G.; MENDOZA, M. R. Q., Mieles de abejas de flora paraguaya: composición, tipificación y normalización. San Lorenzo: **Ministerio de Agricultura y Ganadería, Universidad Nacional de Asunción, Asociación Suiza para el Desarrollo y la Cooperación**, 31 pp., 1992.

MARTOS, I. ; FERRERES, F.; YAO, L. H.; D'ARCY, B.; CAFFIN, N.; TOMAS-BARBERAN, F .A., Flavonoids in monospecific Eucalyptus honeys from Australia, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.48, n.10, p. 4744-4748, 2000.

MENDES, J.C.; CANO, C.B.; FELSNER, M.L., **CONGRESSO BRASILEIRO DE APICULTURA, 16. CONGRESSO BRASILEIRO DE MELIPONICULTURA, 2.**, Aracaju. **Anais...** Aracaju, (Cd-Rom), 2006.

MERCOSUL. **Regulamento Técnico Mercosul “Identidade e Qualidade do Mel”**. Resolução GMC Nº 15/94. Motevidéu, 1999. Disponível em: <<http://anvisa.gov.br/legis/resol/mercosul/alimentos/89-99.htm>> Acesso: Jun. 2007.

MOLAN, P. C. The antibacterial activity of honey: 1.The nature of the antibacterial activity, **Bee World**, Hamilton, New Zealand, 73, n.1, p.5-28, 1992.

MOLAN, P. C., Potential of honey in the treatment of wounds and burns, **Am. J. Clin. Dermatol**, Wales, v.1, p. 13-19, 2001.

DE MARIA, C.A.B.; MOREIRA, R.F.A. Volatile compounds in floral honeys, **Revista Quím. Nova**, São Paulo, v.26, n.1, p. 90-96, 2003.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N., Química orgânica, **Fundação Calouste Gulbenkian**, 8. ed., Lisboa, p.1850, 1983.

MUNDO, M.A.; PADILLA-ZAKOUR, O.I.; WOROBO, R.W. Growth and inhibition of

foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys, **International Journal of Food Microbiology**; in press (Partially funded by the National Honey Board), 2004.

MURRAY, P. R.; DREW, W. L.; KOBAYASHI, S. G.; THOMPSON, J. J. H., Microbiologia médica, **Ed. Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, p.79-95, 2000.

NAMIAS, N., Honey in the management of infections, **Surgical Infections**, Miami, USA, v. 4, n. 2, p. 209-226, 2003

PARK, Y. K. ; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L., Estudo da composição fenólica de méis e própolis oriundos de mesma colméia, **Mensagem Doce**, São Paulo - SP, n. 67, p. 1-11, 2002.

PERSANO-ODDO, L.; PIAZZA, M. G.; SABATINI, A. G., ACCORTI, M., Characterization of unifloral honeys, **Apidologie**, Florence, Italy, v. 26, p.453-465, 1995.

PORTELA, M. B., Estudo de proteínas funcionais de *Candida* spp. isoladas da cavidade bucal de crianças infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana, RJ, UFRJ/Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (**IMPPG**, XV, **Tese** (Doutorado em Ciências Biológicas-concentração Microbiologia), 176ff., 2006.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. Microbiology, 5.^a ed. **The McGraw-Hill Companies**, USA, 1147 pp., 2002.

ROOT, A. I., ABC y xyz de la apicultura: encyclopedia de la cria científica y práctica de las abejas, Buenos Aires: **Editorial Hemisfério Sur**, 723 p., 1985.

SABATIER, S.; AMIOT, M.J.; TACCHINI, M.; AUBERT, S. Identification of flavonoids in sunflower honey, **Journal of Food Science**, Chicago, 57 (3), 773-777, 1992.

SANT'ANA, A.; CONCEIÇÃO, C.; AZEREDO, D. R. P., Comparação entre os métodos rápidos simplate R TPC- Cl e petrifilm RAC e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes, **Brazilian Journal of Food Technology**, Vassouras, RJ, v. 6, n. 1, p.85-89, 2003.

SLAMA, T. G., Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay, **Critical Care**, Indianapolis, USA, n.12 (Suppl 4): S4, 2008.

SEEMANN, P.; NEIRA, M. **Tecnología de la producción apícola**, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, **Empaste**, , Valdivia, 202p., 1988.

SEI, 2007. Disponível em:

www.sei.ba.gov.br/publicacoes/publicacoes_sei/bahia_dados/est_municipios/xls/2004/1.3.1.xls , Acesso: Nov./2007.

SILVA, D. da, Atividade antimicrobiana do conocarpano seus derivados e análogos frente a cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*, **Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas**, Universidade do Vale do Itajaí, SC, 66 ff., 2007.

SILVA, L. C.; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIRÊDO, R. M. F. Caracterização físico-química de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Paraíba, v.8, n. 23, p. 260-265, 2004.

SILVA, R. F. Investigação de ácidos fenólicos em amostra de mel por cromatografia líquida de alta eficiência e sua aplicação na caracterização da origem floral, **Dissertação** (Mestrado), **PPGQO-UFRJ**, 82ff., 2004.

SILVA, T. R. S.; GIULIETTE, A. M.; HARLEY, R. M., 2005, Flora da Bahia: História e Organização. Disponível em: <http://www.uefs.br/floradabahia/apresent.html>
Acesso: Nov. 2006.

SIVAM, G., Analysis of Flavonoids, In: **Analysis of Functional Foods**, ed. Hurst W, **CRC Press**, 2002, Disponível em: www.bastyr.edu › **Research**, Acesso: dez./2009.

SMITH, F. G., Deterioration of the color of honey, **Journal of Apicultural Research**, Bucharest, v. 6, n. 2, p. 95-98, 1967.

SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L. C.; CARVALHO, C. A. L. de, Características físico-

químicas de amostras de méis de *Apis mellifera* da região litoral norte do estado da Bahia, **Revista de Agricultura**, v. 77, n.2, p. 243-256, 2002a.

SODRÉ, G.S. Características físico-químicas e análises polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L. 1758 (Hymenoptera: Apidae) da região litoral norte do Estado da Bahia, **Dissertação** (Mestrado), **USP/ESALQ**, Piracicaba, SP, 83ff., 2000.

SOUZA, B. A.; CARVALHO, C. A. L.; SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L. C., Physico-chemical characteristics of samples of stingless bee *Melipona asilvai* (Hymenoptera: Apidae) honey, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1623-1624, 2004.

SOUZA, B. A.; MARCHINI, L.C.; ODA-SOUZA, M.; CARVALHO, C. A. L.; ALVES, R. M. O., Caracterização do mel produzido por espécies de *Melipona* Illiger, 1806 (apidae: meliponini) da região nordeste do Brasil: 1. Características físico-químicas, **Química Nova**, Teresina, PI, v. 32, n. 2, p.303-308, 2009.

TAJIK, H.; JALALI, F. S. S.; JAVADI, S.; SHAHBASI, Y.; AMINI, M., Clinical and microbiological evaluations of efficacy of combination of natural honey and yarrow on repair process of experimental burn wound, **Journal of Anim. And Veterin. Adv.**, Urmia, Iran, v. 8, n. 5, p. 907-911, 2009.

TAORMINA, P. J.; NIEMIRA, B. A.; BEUCHAT, L. R. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power, **Int. J. Food Microb.**, Griffin, n. 69, p. 217-225, 2001.

THRASYVOULOU, A.; MANIKIS, J. Some physiochemical and microscopic characteristics of Greek Unifloral honeys, **Apidologie**, França, v. 26, p. 441-452 1995.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; FERRERES, F.; BLÁZQUEZ, A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; TOMÁS-LORENTE, F., High-performance liquid chromatography of honey flavonoids, **Journal of Chromatography**, Washington, n. 634, p. 41-46, 1993.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A; MARTOS, I.; FERRERES, F.; RADOVIC, B.S.; ANKLAM, E., HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys, **Journal Science Food Agric.**, Washington, n.81, p.485-496,

2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L., **Microbiologia**, 8. ed - Gerard J., Porto Alegre: **Artmed**, 920 pp., 2005.

UÑATES, M. A.; AGUILAR, A. B.; PIOLA, H.D. et al Estudio físico-químico de mieles de la provincia de San Luis–República Argentina, **Archivos Latin. de Nutrición**, Guatemala, v. 49, n. n.2, p. 193-196, 1999.

VARGAS, T., Avaliação da qualidade do mel produzido na região dos Campos Gerais do Paraná, Ponta Grossa, Dissertação (Mestrado-Ciências Bioquímica) – **Universidade Federal de Ponta Grossa**, São Paulo, 134 ff., 2006.

VIT, P.; TOMAS, F., Flavonoids in Meliponinae honeys from Venezuela related to their botanical, geographical and entomological origin to assess their putative anticataract activity, **Z. Lebensm. Unters Torsch A.**, Mérida, Venezuela, v. 206, p. 288–293, 1998.

WAHDAN, H., Causes of the antimicrobial activity of honey, **Infection**, Cairo, Egypt, v. 26, 26-31, 1998.

WAIKATO RESEARCH UNIT, The University of Waikato, New Zealand, Disponível em:<http://www.umfactivemanukahoney.com/antimicrobial.htm>. Acesso: dez./ 2009.

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

WHITE JÚNIOR, J. W. La miel. In: **Dadant, H. La colmena y la abeja melífera**.Montevideo: **Hemisfério Sul**, cap.1, p. 21-35, 1989.

WILLIX, D.J.; MOLAN, P.C.; HARFOOT, C.G., A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey. **J. Appl. Bacteriol.**, Hamilton, New Zealand, v.73, n.5, p. p.388-394,

1992.

YAO, L.; JIANG, Y.; D'ARCY, B.; SINGANUSONG, R.; DATTA, N.; CAFFIN, N.; RAYMONT, K., Quantitative high-performance liquid chromatography analyses of flavonoids in australian eucalyptus honeys, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Guangzhou ReYiJu, People's, Republic of China, v. 2, n.52, p. 210-214, 2004a.

YAO, L.; JIANG, Y.; SINGANUSONG, R.; DATTA, N.; RAYMONT, K., Phenolic acids and abscisic acid in australian eucalyptus honeys and their potential for floral authentication, **Food Chemistry**, Guangzhou ReYiJu, People's Republic of China, n.86, p.169-177, 2004b.

CAPÍTULO 2

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MÉIS DO ESTADO DA BAHIA EM DOIS PERÍODOS DE PRODUÇÃO

RESUMO

A composição química do mel está diretamente relacionada à sua origem botânico-geográfica e dessa forma, diferenças no forrageamento das abelhas podem representar mudanças nas características de cada mel. O pasto apícola visitado pelas abelhas pode ser identificado pela análise polínica do mel fornecendo indícios da sua origem botânica. O pólen pode ser usado como indicador da origem floral de méis, porque tem quase todo o perfil de flavonóides. A averiguação dos compostos fenólicos é de grande importância no conhecimento da composição química, principalmente na determinação de sua qualidade biológica. Como a disponibilidade das espécies fornecedoras de néctar pode variar segundo o período do ano e o clima estabelecido, foram analisadas amostras de méis de *A. mellifera* de uma mesma colméia do município de Canarana (Bahia), produzidos em dois períodos consecutivos de fluxo de néctar. Foi montado um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com 7 (sete) amostras em cada período, analisadas em triplicata. Além dos parâmetros citados, fatores como pH, acidez, aW e cor, também foram analisados e comparados com a atividade antimicrobiana registrada por difusão em meio líquido contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Todos os valores coletados foram confrontados com o intuito de verificar a incidência do período de produção na atividade biológica. Os compostos fenólicos apresentaram alça no 2.^o período o que se refletiu na ação antimicrobiana contra todos os microorganismos. A espécie *Mimosa tenuiflora* apareceu como pólen dominante com 88% de frequência.

Palavras chaves: mel, atividade antimicrobiana, períodos, Canarana.

ABSTRACT

Chemical composition of honey is directly related to its botanical and geographical source and thus, differences in foraging bees may represent changes in the characteristics of honey. Pasture bee visited by bees can be identified by pollen analysis of honey providing evidence of its botanical origin. Pollen can be used as an indicator of floral origin of honey, because it has almost all the profile of flavonoids. The investigation of phenolic compounds is very important in understanding the chemical composition, mainly to determine its biological quality. As the availability of species providing nectar can vary according to time of year and climate set were analyzed honey samples from *A. mellifera* in the same hive in the city of Canarana (Bahia), produced in two consecutive periods of nectar flow. Was mounted a completely randomized design (CRD), with 7 (seven) samples in each period, analyzed in triplicate. Besides the parameters mentioned, factors such as pH, acidity, aW and color, were also analyzed and compared with the antimicrobial activity recorded by diffusion in liquid medium against *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*. All the collected data were compared in order to assess the impact of the production period in biological activity. The phenolic compounds present in the second period which was reflected in the antimicrobial activity against all microorganisms. *Mimosa tenuiflora* species appeared as dominant pollen with 88% of frequency.

Key words: honey, antimicrobial activity, periods, Canarana.

4 CAPÍTULO 2

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MÉIS DO ESTADO DA BAHIA EM DOIS PERÍODOS DE PRODUÇÃO

4.1 INTRODUÇÃO

O Semiárido brasileiro abriga em seu ecossistema zonas de Cerrado, Floresta Semidecidual, Restinga, Mangue, e com predominância o bioma Caatinga, um habitat favorável para plantas medicinais e aromáticas, de características apropriadas para a apicultura. Pobre em pastagens, a caatinga oferece a sua vegetação nativa como suporte ao forrageamento de animais de criação e outros como as abelhas melíferas, e também para o uso cultural e diferenciado na medicina popular (BEZERRA, 2008).

O Estado da Bahia localizado no sul da região Nordeste do Brasil, ocupa uma área de 567.295 km² (MELO FILHO e SOUZA 2006), dos quais 57% estão inseridos na zona semiárida brasileira (TERRITÓRIO, 2010). Na maior parte do interior do Estado (o semiárido baiano), o clima predominante seco e a baixa precipitação pluviométrica contribuem para que cerca de 60% do território apresentem caatingas como vegetação predominante (TERRITÓRIO, 2010).

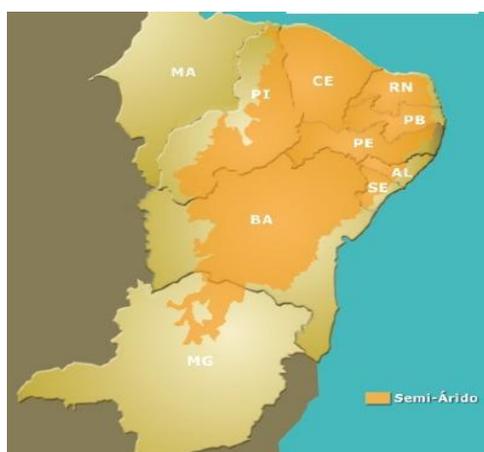


FIGURA 53 - Semiárido brasileiro
Disponível em: www.ebda.ba.gov.br

A região de Irecê, uma das quinze microrregiões socioeconômicas do estado da Bahia, é constituída pela caatinga arbórea, aberta sem palmeiras, formada por plantas como barriguda, xique-xique, mandacarus, umburana, mané ventura, mocambo, quebra facão, umbuzeiros, São João, etc., e está inserida totalmente no semiárido baiano, fazendo parte da Caatinga. Este bioma é caracterizado por um período de chuvas que perduram geralmente, de três a quatro meses com cerca de oito meses de estiagem. O índice pluviométrico médio varia entre 500 e 700 mm por ano, mas as chuvas, irregulares podem variar entre 200 e 1000 mm por ano (PLANO, 2009).

Canarana é um município do estado da Bahia, situado a uma latitude de 11°41'05" Sul e longitude 41°45'08" Oeste, a uma altitude de 691 metros, onde a apicultura está apoiada na vegetação silvestre. Com uma área de 617,99 km² (IBGE, 2010), está localizado no centro da Região de Irecê, fazendo parte da Chapada Diamantina setentrional, a uma distância de 451 km da capital Salvador (PLANO, 2009).



FIGURA 54- Mapa da Região de Irecê e localização do município de Canarana/BA.
 FONTE: Departamento Rodoviário de Morro do Chapéu-BA (modificado)

O mel é um produto elaborado a partir do néctar das flores e exsudado vegetais, e o seu uso remonta há séculos atrás, tanto como adoçante como na terapêutica popular (MOLAN, 1992; ZUMLA e LULAT, 1989). Pesquisas envolvendo a ação biológica desta matéria prima são realizadas em todo o mundo (MUNDO et al. 2004; COOPER et al. 2002 e 1999; MOLAN, 2001; WILLIX et al. 1992; EFEM, 1988), e ainda hoje ela é utilizada por comunidades tradicionais para tratamento de várias afecções humanas (MODRO et al. 2009; VIT et al., 2004).

A atividade biológica do mel está intimamente relacionada com a sua composição química (BOGDANOV, 1997), e esta à sua origem. Assim, a identificação da origem do mel é uma informação importante a ser considerada quando atividades biológicas são estudadas (WESTON et al., 1999).

O pasto apícola visitado pelas abelhas para coleta de néctar, pode ser identificado pela análise polínica do mel (ALVES et al., 2006; NOVAIS et al., 2006), o que contribui para determinação da sua origem. Os grãos de pólen presentes representam o seu espectro polínico, que pode constituir um indicativo das fontes adequadas de néctar ou de pólen (BARTH, 1989), maximizando o aproveitamento de áreas de vegetação natural (OLIVEIRA, 2009). A análise dos grãos de pólen além de trazer indícios da origem botânica do mel, permite classificá-lo como monofloral, quando o néctar foi coletado de uma única espécie de planta (>45% do total de grãos de pólen), polifloral, se mais de uma espécie contribuiu com o néctar (com 15 a 45% de pólen acessório), e silvestre se produzido em área vegetação primária, onde várias espécies nativas participaram da sua formação, com pólen isolado importante (3% a 14%) e (< 3%) pólen isolado ocasional (LOUVEAUX et al., 1978).

A caracterização de méis através da sua origem botânica é uma das importantes ferramentas de diferenciação e agregação de valor com que pode contar o apicultor (BOLETÍN, 2001). O pólen pode ser usado como indicador da origem botânica de méis, porque tem quase todo o perfil de flavonóides (D'ARCY, 2005; CAMPOS et al., 1997; AMIOT et al., 1989; TOMÁS-BARBERÁN, 1993). Estes por sua vez, ocorrem no pólen como glicosídeos ou como agliconas, são de maneira geral altamente hidroxilados (FERRERES et al., 1992, 1991), e ganham importância devido à sua onipresença e grande diversidade (HAVSTEEN, 2002). Os flavonóides do mel, que têm origem no pólen (PETERSON E DWYER, 1998) são hidrolisados e

transformados em agliconas pelas enzimas salivares das abelhas melíferas (FERRERES et al. 1998,1992, 1991; AMIOT et al. 1989; SABATIER et al., 1988).

Os compostos fenólicos ou polifenóis são metabólitos secundários de plantas e constituem um dos maiores e amplamente distribuídos grupos de substâncias no reino vegetal. Dentre eles, os flavonóides e os compostos fenólicos derivados simples são os mais comuns (BRAVO, 1998). Os ácidos fenólicos são divididos em duas subclasses: o ácido benzóico substituído e o cinâmico (ESTEVINHO et al., 2008). Os flavonóides presentes no mel são divididos em três classes, estruturalmente semelhantes: flavonóis, flavonas e flavanonas. Estes estão envolvidos na coloração, sabor e aroma do mel e são importantes devido aos seus efeitos biológicos (HAVSTEEN, 2002).

Estruturalmente derivados do 1,3-difenilpropano (SIVAM, 2002), os flavonóides entre outras funções estão envolvidos na proteção da planta contra o ataque de micro-organismos, através da inibição da germinação de esporos de patógenos. A sua atividade bioquímica e dos seus metabólitos depende da sua estrutura química e da orientação relativa das partes da molécula (BRAVO, 1998).

A identificação dos compostos fenólicos em méis é determinante para o conhecimento da composição química e mais especificamente como possível indicador de sua qualidade biológica (YAO et al., 2004; FERRERES et al., 1993). Dessa forma, o reconhecimento do pasto apícola utilizado é de grande importância para a caracterização do mel e determinante para a preservação e multiplicação dessas plantas com vistas à sustentação da atividade. De acordo com Al-Mamary et al. (2002) e Yao et al. (2003), a composição fenólica do mel depende de suas fontes florais, que por sua vez sofrem interferência de fatores sazonais e ambientais. Os compostos fenólicos no mel têm sido estudados por vários autores como Tomás-Barberán et al. (2001); Martos et al. (2000); Vit et al. (1997); Ferreres et al. (1991) e Amiot et al. (1989), para determinar a correlação com a origem botânica.

Considerando que a atividade biológica do mel está intimamente relacionada com a sua composição química, e esta com a vegetação local (PARK et al. 2002) e o clima, é muito importante analisar a influência desses fatores em diferentes períodos de fluxo de néctar.

Apesar de que estudos da composição química e do potencial terapêutico de méis vêm sendo realizados em várias partes do mundo, no Brasil estes são incipientes e mais especificamente, no estado da Bahia não foram encontrados estudos na literatura científica.

4.2 OBJETIVOS

Dado que diferenças de pasto apícola visitado pelas abelhas podem representar diferenças nas características de cada mel, este trabalho teve como objetivo comparar os parâmetros físico-químicos e a atividade antimicrobiana de mel de uma mesma colméia em dois períodos de produção e verificar a composição polínica dessas amostras.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de mel para este estudo foram coletadas no município de Canarana, microrregião socioeconômica de Irecê/BA.

O mel foi coletado de um mesmo quadro (subdivisão da colméia) segregado em dois períodos consecutivos de produção. O 1.º período considerado foi fevereiro de 2008 e o 2.º período, setembro de 2008. Estes obedeceram ao manejo normal do apicultor, sendo direcionados pelo movimento da colméia e pelo fluxo de néctar resultante da flora disponível. Dessa forma, os méis coletados foram produzidos em períodos em que as condições climáticas foram diferentes, com notório déficit hídrico no 2.º período (setembro).

Foi montado um DIC (Delineamento Inteiramente Casualizado) onde cada período foi considerado um tratamento, e o quadro selecionado em cada período por sua vez, forneceu 7 (sete) amostras que foram filtradas e armazenadas em potes de vidro sob refrigeração a 10°C. Para análise, as amostras foram levadas à temperatura ambiente em banho de ultrassom para descristalização e posterior

análise no Laboratório de Pesquisas em Microbiologia (LAPEM), no Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais e Bioativos (LAPRON) e no Laboratório Central de Farmácia da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS/BA).

De cada amostra foi medida (v) e pesada (g) uma alíquota; esta foi diluída a 50% (v/v) com água destilada e homogeneizada. As amostras diluídas foram esterilizadas através de filtração em membrana de celulose (0,22 μm) e testadas em triplicata contra os micro-organismos *Escherichia coli* CCMB261 (resistente a Sulfonamida), *Staphylococcus aureus* CCMB262 (resistente a Estreptomicina e Dihidroestreptomicina), *Pseudomonas aeruginosa* CCMB268 e a levedura *Candida albicans* CCMB266 (isolado clínico).

4.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (CIM)

Colônias de 18-24h de crescimento cultivadas em placa foram retiradas para um tubo contendo 1,8 mL de solução salina a 0,45%. A densidade da suspensão bacteriana foi ajustada para a concentração aproximada de $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ e da levedura, para aproximadamente 5×10^5 UFC.mL⁻¹. Dessas suspensões foram tomados 10 μL e estes diluídos para 1000 μL com solução salina a 0,45%, resultando em concentrações de $1,5 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ das bactérias e 5×10^3 UFC.mL⁻¹ da levedura.

Em triplicata, 150 μL de amostra de mel diluída e filtrada foram colocados nos primeiros poços da placa (coluna 1, linha A) já contendo 40 μL de Caldo Müller Hinton (CMH) [4X] concentrado. Desses primeiros poços foram retirados 95 μL para os poços seguintes já acondicionados com 95 μL de caldo MH [1X] concentrado, caracterizando a diluição seriada, até o oitavo poço de cada coluna. Cinco microlitros das suspensões de micro-organismos foram adicionados aos poços e as concentrações finais foram de $7,5 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ e $2,5 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹ para bactérias e levedura, respectivamente. As placas foram incubadas em estufa a 37° C por 24h as bactérias e em B.O.D. a 28° C por 48h a levedura e, após esse tempo, reveladas com 50 μL de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5% em cada poço.

As placas foram reincubadas nas respectivas temperaturas e o resultado lido após 3h de incubação. A coloração vermelha indicou crescimento microbiano.

Em amostras com interferentes, é comum a utilização do corante TTC para a revelação de crescimento bacteriano. Quando oxidado, o TTC é incolor, mudando para a cor vermelha quando, em contato com as enzimas dos micro-organismos vivos é reduzido. O formazano, composto de cor vermelha formado, acumulado no interior dos grânulos das células, facilita a identificação do resultado (SANT'ANA, 2003).

4.4.1 Controles da CIM

As colunas 10, 11 e 12 da placa de 96 poços mostram os controles realizados. O controle da esterilidade do meio de cultura foi feito com 95µL nos poços da linha A (meio [1X] concentrado, e B meio [4X] concentrado); da esterilidade das amostras com 50µL de mel diluído a 50% (v/v) + 50µL de meio [1X] concentrado nas linhas C (amostra 1), D (amostra 2) e E (amostra 3); da água, com 50µL de água + 50µL de meio [1X] concentrado na linha F, e da viabilidade microbiana com 95µL de meio [1X] concentrado + 5µL (cinco) de suspensão de micro-organismo na linha G, para um volume final de 100µL por poço. A FIGURA 53 ilustra uma placa de CIM revelada com o TTC, onde pode ser visto o desenvolvimento da técnica com disposição de amostras e controles.

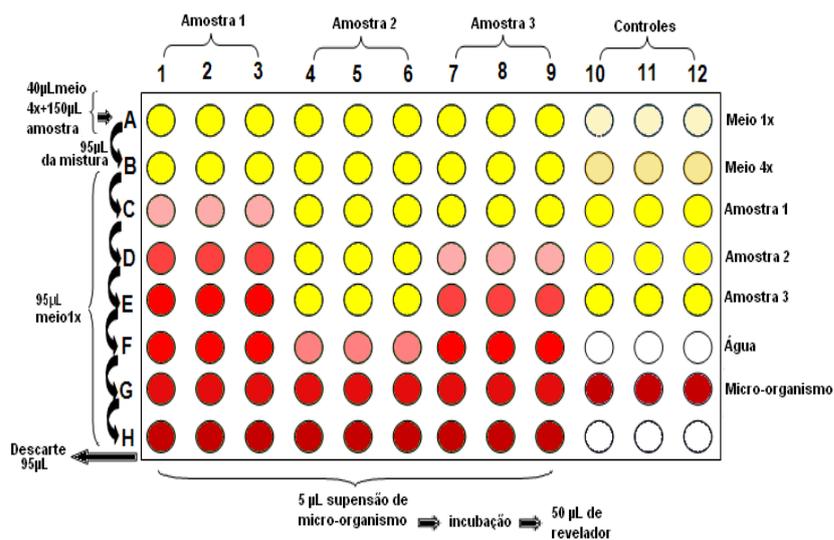


FIGURA 55- Placa de CIM (esquemático) apresentando aspectos de poços com amostras e poços controles revelados com TTC.

4.4.2 Controle de Antibióticos padrões

Para os controles positivos foram utilizados os antibióticos cloranfenicol e gentamicina para as bactérias e o antifúngico nistatina para a levedura. Os testes foram realizados em triplicata para cada micro-organismo, e o volume final de cada poço foi de 100µL.

Dez microlitros do antibiótico cloranfenicol (200mg.mL⁻¹) e 85µL de água estéril foram adicionados aos três primeiros poços das colunas 1, 2 e 3 (linha A) da placa já acondicionados com 95µL de CMH 2X concentrado(CMH [2X]). Em seguida, procedeu-se à diluição seriada até os últimos poços (linha H). Foram adicionados 5 (cinco) µL da suspensão de micro-organismo em todos os poços. A concentração final do cloranfenicol nos primeiros poços foi de 10mg. mL⁻¹.

Noventa e cinco microlitros do antibiótico gentamicina (10mg.mL⁻¹) foram adicionados aos três primeiros poços da linha A da placa de 96 poços, acondicionados com 95µL de CMH [2X] concentrado. De cada poço foram retirados 95µL para o poço seguinte, contendo 95µL de meio CMH [1X] concentrado, e assim

sucessivamente, (diluição seriada) até o oitavo poço da placa (linha H). Cinco (5) μL da suspensão do micro-organismo teste foram adicionados em todos os poços. A concentração final da gentamicina nos primeiros poços foi de $4,75\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. A FIGURA 54 ilustra os controles positivos usados para as bactérias.

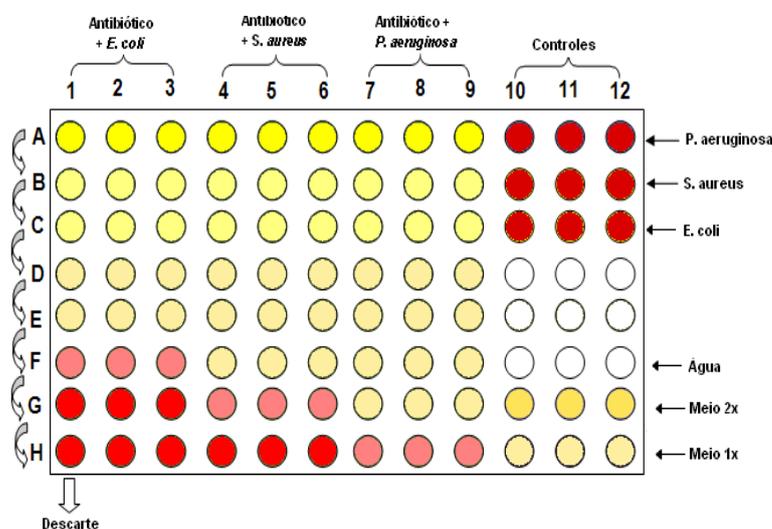


FIGURA 56 - Placa de CIM (esquemático) apresentando ação de amostras de mel, controle de antibióticos contra bactérias, e esterilidade da água e meios de cultura utilizados.

4.5 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Além da atividade antimicrobiana foram analisados os parâmetros de pH, acidez, aW, umidade, cor (Pfund), compostos fenólicos e perfil polínico.

4.5.1 pH - Potencial hidrogeniônico de uma solução através de pHmetro segundo AOAC (1999).

4.5.2 Acidez livre - Método baseado numa titulação simples dos ácidos livres na amostra, utilizando-se pHmetro para acompanhar a medida do pH até a neutralização - pH de mudança de cor da fenolftaleína - 8,3 a 8,5 de acordo com AOAC (1999).

4.5.3 Atividade de água (aW) e Umidade -A medida do conteúdo de água livre (aW) na amostra foi lida em Aqualab Mod 3TE série 1299510 e a umidade (água total) foi determinada em refratômetro ABBÉ, através da tabela de Chataway (AOAC, 1999).

4.5.3 Atividade de água (aW) e Umidade -A medida do conteúdo de água livre (aW) na amostra foi lida em Aqualab Mod 3TE série 1299510 e a umidade (água total) foi determinada em refratômetro ABBÉ, através da tabela de Chataway (AOAC, 1999).

4.5.4 Cor - A determinação da cor foi realizada pela medida da absorção da luz utilizando-se espectrofotômetro UV-Vis Femto 700 com leitura de densidade ótica a 625 nm segundo escala de Pfund (BIANCHI, 1981). A classificação da cor de cada amostra foi dada pela escala de Pfund (TABELA 3-repetição).

TABELA- 3 (repetição) - Escala de Pfund - Cor de Mel em milímetros (mm)

MEL	COR (mm)	Absorbância (635 nm)
Branco – água	0 - 7,9	0,104 - 0,124
Extra – branco	8- 16,4	0,125 - 0,147
Branco	16,5 - 33,9	0,148 - 0,194
Âmbar extra-claro	34 - 49,9	0,195 - 0,237
Âmbar claro	50 - 84,9	0,238 - 0,332
Âmbar	85 - 113,9	0,333 - 0,410
Âmbar escuro	114 ou mais	0,411 ou mais

Fonte: BIANCHI, 1981.

4.5.5 Determinação de compostos fenólicos - As substâncias fenólicas foram analisadas por espectrofotometria no UV-Vis, de acordo com o método de Folin-Ciocalteau (compostos fenólicos totais) modificado por Beretta et al. (2005) citado por Bertoncej (2007), e de flavonóides totais, pelo método descrito por Kim, Jeong e Lee (2003) modificado por Blasa et al. (2005) para amostras de mel (AL et al. 2009), e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) segundo modificação da metodologia descrita por Martos (2000).

4.5.5.1 Análise espectrofotométrica – compostos fenólicos totais

Para determinação do teor de compostos fenóis totais (BERTONCELJ et al. (2007), amostras de mel (2,5 g) foram diluídas para 10 mL em balão volumétrico com água destilada. Foram filtradas em papel qualitativo e a 100 µL da solução (25

mg de mel puro) foi adicionado 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu a 10%. A mistura foi agitada em vórtex por 2 minutos e após 20 minutos em repouso e na ausência de luz, foi lida a absorbância em espectrofotômetro (FEMTO 700 UV-Vis) a 750 nm, contra uma solução análoga de açúcar. O resultado foi expresso em equivalentes de ácido gálico (mgAG/100g), através de curva padrão $y = 29.754x - 0.0127$ (0,01 a 1,00 mg.mL⁻¹ de ácido gálico) com coeficiente de determinação (R^2)= 0,9998.

4.5.5.2 Análise espectrofotométrica - flavonóides totais

A determinação de flavonóides totais (Kim, Jeong e Lee, 2003), para amostras de mel (AL et al., 2009). A reação colorimétrica deu-se a partir da mistura de 250 µL (62,5 mg de mel puro) da amostra anterior mais 750 µL de metanol e 300 µL de nitrito de sódio (NaNO₃) a 5%; após 5 minutos foram adicionados 300 µL de cloreto de alumínio (AlCl₃) a 10%. As amostras foram filtradas em membranas de 0,2 µm e após 6 minutos lida a absorbância em espectrofotômetro (FEMTO 700) a 510 nm. O conteúdo de flavonóides foi expresso em equivalentes de quercetina (mgQE/100g) calculados através de curva analítica $y = 0.0024x + 0.0028$ (0,1 a 100 µg.mL⁻¹) que apresentou $R^2 = 0,9997$.

4.5.5.3 Análise cromatográfica – CLAE

As análises foram realizadas no LAPRON (Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais e Bioativos- UEFS).

A amostra de mel (50g) foi misturada com 250 mL de água destilada, acidificada a pH 2 com HCl (ácido clorídrico), e agitada à temperatura ambiente até completa dissolução. A mistura foi filtrada através de algodão para eliminar possíveis partículas suspensas. O filtrado foi agitado com cerca de 75 g de Amberlite XAD-2 (poro 9 nm, partícula 0,3-1,2 mm, Supelco, Bellefonte, P.A., U.S.A.), por 30 minutos

e, em seguida, empacotado em uma coluna de vidro (45 x 3,5 cm). A coluna foi então lavada com uma solução ácida (pH 2 com HCl, 100 mL), e em seguida com água destilada (300 mL) para remover os açúcares e outros compostos polares, permanecendo as substâncias fenólicas na resina. A fração fenólica adsorvida na coluna foi eluída com metanol (~ 250 mL). O extrato metanólico obtido foi concentrado à pressão reduzida em um evaporador rotatório a 40°C. O resíduo foi dissolvido com 5 mL de água destilada, e extraído em funil de separação com acetato de etila (3 x 5 mL). As frações orgânicas foram reunidas e o solvente eliminado. O extrato seco foi ressuscitado em metanol (grau CLAE) e filtrado em membrana celulósica de 0,45µm, para análise em cromatógrafo líquido Shimadzu SCL-10Aup com detector UV. Foi utilizada uma coluna Lichrospher RP-18 (reversa) de 12,0 x 0,4cm, com tamanho de partícula de 5(cinco) mm, usando gradiente binário com uma mistura de água ultra pura (MilliQ), e ácido acético grau espectrométrico (Mallinckrodt Chemicals) na proporção 19:1 (solvente A) e metanol (Mallinckrodt Chemicals) solvente B. O fluxo total da mistura de solventes usado para eluição das amostras foi de 1 mL por minuto; a corrida da amostra foi realizada em 65 minutos com mais 24 minutos de lavagem e acondicionamento da coluna; a temperatura do forno foi mantida em 30°C e o volume de injeção foi de 20µL. O gradiente de eluição começou com 20% a 30% de solvente B em 10 minutos, modo isocrático com 30% de B até 20 minutos, de 30% a 40% de B em 25 minutos, a 45% de B em 35 minutos, a 60% de B em 55 minutos, e a 80% de B em 65 minutos.

Foram utilizados padrões autênticos de quercetina, canferol, apigenina, pinocembrina, galangina, morina, miricetina, tectocrisina, triacetina, luteolina, rutina, cabreuva, 3,6-dihydroxiflavona, 5,7-dihydroxiflavona, ácido p-cúmarico, ácido gálico, elágico, e ácido ferúlico (Extrasynthese Co.).

A curva analítica foi preparada com padrões (0,5mg.mL⁻¹) de ácido p-cumárico, gálico e ferúlico e os flavonóides rutina, 3,6-di-hidroxiflavona, quercetina e pinocembrina, em metanol grau cromatográfico (Mallinckrodt Chemicals), filtrados em membrana de 0,45 µm.

Os compostos fenólicos das amostras foram identificados por comparação dos tempos de retenção e dos espectros de UV obtidos do Cromatógrafo HITACHI Autosampler L-2200 com injetor automático SIL-10ADvp, detector de arranjo de

fotodiodos SPDM10Avp e forno de colunas CTO-10Avp mantido a 30 °C. A fase móvel e o gradiente foram mantidos.

4.6 ANÁLISE POLÍNICA

A análise polínica, realizada no Laboratório Micromorfologia Vegetal (LAMIV), seguiu a metodologia de LOUVEAUX et al. (1978), e 10g de mel foram pesados e misturados com 20 ml de água destilada; a mistura foi dividida em dois tubos e estes colocados em centrífuga a 2.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e 5 mL de água destilada foram adicionados (em cada tubo). A mistura foi centrifugada por 10 minutos (a 2.500 rpm) e o sobrenadante desprezado. O sedimento polínico resultante foi acetolisado (hidrólise ácida) (ERDTMAN, 1960). Este procedimento consiste na adição de anidrido acético e ácido sulfúrico na proporção de 9:1, onde seu conteúdo celular é eliminado para observação da parede externa do pólen (exina).

Ao resíduo foram adicionados 5 mL de glicerina a 50%; após 30 minutos de repouso, a mistura foi centrifugada por 5 minutos; o sobrenadante foi desprezado e os tubos emborcados sobre o papel absorvente por alguns minutos. Para a montagem da lâmina foi utilizado estilete flambado e gelatina glicerinada; após tocar com o estilete o material do tubo desejado (grãos de pólen) colocando-o sobre a lâmina, esta foi levemente aquecida. Uma lamínula foi colocada sobre a amostra e esta foi fixada com parafina.

Para determinação das classes de freqüência ($\geq 45\%$ - pólen dominante; 16-45% - pólen acessório; $\leq 15\%$ - pólen isolado) adotou-se a contagem mínima em microscópio ótico de 1.000 grãos de pólen.

A identificação dos tipos polínicos foi realizada por comparação da morfologia externa dos grãos com o laminário referência da Palinoteca do LAMIV (UEFS), cuja composição principal está baseada em táxons da flora da caatinga, sendo referência para a região Nordeste. Além disso, foram utilizados catálogos polínicos como

Melhem et al.(2003) para espécies da flora da caatinga e Lima et al. (2008) para as espécies de Mimosa do semiárido brasileiro.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para esta amostragem foi realizado um delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os resultados dos ensaios físico-químicos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), onde as comparações entre as médias foram realizadas através do Teste t e de Tukey a 1% de significância. Foi analisada também a correlação (Pearson) entre os teores de compostos fenólicos e flavonóides *versus* CIM contra os micro-organismos teste. Para estas análises foi utilizado o programa BioEstat 5.0.

4.8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de mel foram coletadas em fevereiro (1.º período) e em setembro (2.º período) de 2008. No mês de fevereiro as chuvas foram escassas e em setembro a seca já era extrema.

Para a caracterização climática de períodos, Galvani (2008) citando F. Bagnouls e H. Gaussen (1953) propõe um índice que indica meses secos e úmidos em função da variação média anual da temperatura do ar e da precipitação. Esta definição é expressa por meio de uma reta onde um mês seco é considerado aquele em que o total mensal das precipitações (mm) é igual ou inferior ao dobro da temperatura média (graus Celsius). A FIGURA 55, um informe climatológico do Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos (CPTEC/INPE) para a microrregião de Irecê em 2008, ilustra esta informação.

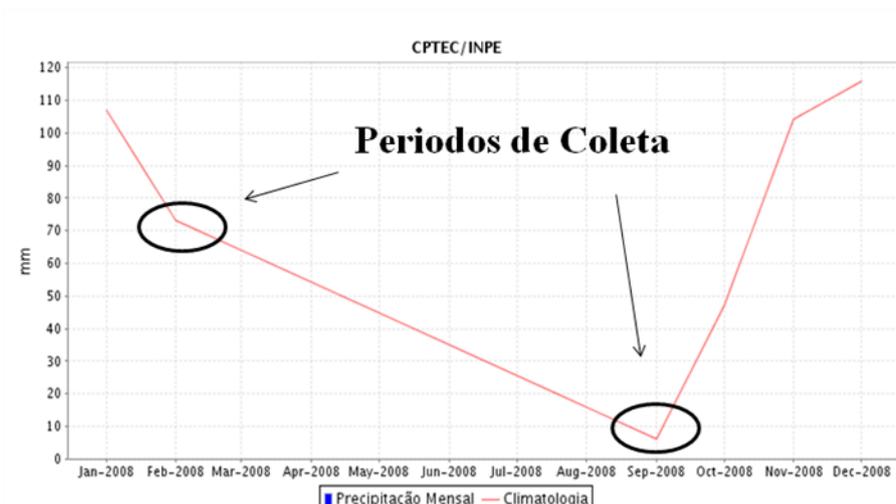


FIGURA 57- Condições climáticas na região de Irecê referentes ao período de amostragem.

Fonte: INPE, 2009.

4.8.1 Atividade antimicrobiana

Os resultados da atividade antimicrobiana dos méis analisados estão registrados na TABELA 27.

TABELA 27 - Atividade antimicrobiana (CIM) de méis de *Apis mellifera* do município de Canarana-BA, coletados em fevereiro (1.º período) e setembro de 2008 (2.º período de produção)

1.º Período				
Micro-organismo				
Am	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
1.1	301	288	301	NS
2.1	298	291	298	NS
3.1	304	289	304	NS
4.1	300	288	300	NS
5.1	294	288	294	NS
6.1	311	286	311	NS
7.1	306	287	306	NS
2.º Período				
Micro-organismo				
1.2	142	285	142	285
2.2	142	285	142	285
3.2	142	285	142	285
4.2	142	285	142	285
5.2	142	285	142	285
6.2	142	285	142	285
7.2	142	285	142	285

Am=amostra; S.a.= *S. aureus*; E c.= *E. coli*; P.a.= *P. aeruginosa*; C.a.= *C. albicans*;NS= Não Sensível

Como pode ser observado na TABELA 27, houve pouca variação entre os resultados dentro de cada período de coleta. Já entre os períodos, os méis coletados em setembro apresentaram atividade contra todos os micro-organismos testados, mostrando-se mais ativo do que as amostras de méis coletadas em fevereiro. *S. aureus* e *P. aeruginosa* apresentaram maior sensibilidade frente a todas as amostras coletadas em setembro, com CIM na faixa de concentração de 9,4%, e na concentração de 18,8% essas amostras inibiram *E. coli* e *C. albicans*. Na mesma concentração, as amostras coletadas em fevereiro não foram capazes de inibir a levedura.

Foram realizados testes de CIM dos antimicrobianos contra os micro-organismos teste. Os resultados estão plotados na TABELA 28.

TABELA 28 – Concentração Inibitória Mínima (mg.mL^{-1}) dos antibióticos gentamicina e cloranfenicol e do antifúngico nistatina usados como controle

Antimicrobianos	CIM (mg.mL^{-1})			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Gentamicina	0,005	0,009	< 0,005*	--
Cloranfenicol	10,00	< 0,078*	1,25	--
Nistatina	--	--	--	<625.10 ⁻⁵

*O crescimento microbiano foi impedido até o último poço; (--)= teste não realizado.

Comparando-se os valores da CIM (TABELA 27) das amostras de méis, com aqueles registrados para os antibióticos (TABELA 28), pode-se notar que os micro-organismos foram mais sensíveis aos antimicrobianos do que às amostras analisadas. Na análise desses resultados, deve ser levado em consideração que o mel é um produto natural que, além de inibir o crescimento de micro-organismos, pode promover limpeza da ferida e a epitelização quando utilizado como tratamento tópico na reparação de tecidos (Molan, 2001); e que antibióticos sintéticos, conforme relatado por Subrahmanyam (1991) são moléculas com alvos definidos que apenas impedem o crescimento do micro-organismo sem atuar na recuperação do ferimento.

Analisando ainda a TABELA 27, é possível perceber que mesmo diluído, o mel foi ativo contra os micro-organismos, sugerindo que o potencial osmótico não foi isoladamente o fator determinante para a atividade antimicrobiana das amostras. Pode-se considerar que em dado momento a osmolaridade contribui com a ação contra os micro-organismos, indisponibilizando água no meio, mas, após a

sequência de diluições, a relação soluto/solvente já ultrapassa o limite de aW (0,600) (Molan, 2001), para a ação da atividade osmótica (HOFFMANN, 2001).

Amostras de méis com atividade antimicrobiana comprovada foram misturadas à enzima Catalase (10 mg.mL⁻¹) para a inativação do H₂O₂ (MUNDO et al., 2004) formado, e a CIM foi determinada contra os micro-organismos teste. O resultado está exposto na TABELA 29.

TABELA 29 - CIM de amostra (7.2) de mel de *A. mellifera* do município de Canarana-BA com atividade antimicrobiana com e sem catalase.

AMOSTRAS	Micro-organismos			
	<i>S.aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Com catalase	285	570	570	570
Sem catalase	143	285	143	285

Estes resultados podem indicar que o H₂O₂ participou da atividade inicial registrada (mel sem catalase), pelo fato de que quando inativado, o mel teve a sua ação reduzida. Dessa maneira o teste da CIM reforça o fato da diluição promover a ativação da enzima glicose-oxidase com formação do H₂O₂ e sua reconhecida ação biológica (MOLAN, 2001). Por outro lado, sendo o mel uma mistura complexa, outros compostos como metabólitos vegetais ou das abelhas podem também estar envolvidos na atividade antimicrobiana não peróxido (D'ARCY 2005), explicando a ação apresentada pelo mel com catalase.

4.8.2 Parâmetros físico-químicos

Foram realizadas análises de umidade e de aW das amostras de méis dos dois períodos. Os valores encontram-se na TABELA 30.

TABELA 30 - Atividade de água e Umidade (%) de méis de *A. mellifera* do município de Canarana/BA a 100% e a 50% coletados em fevereiro (1.º período) e setembro de 2008 (2.º período de produção)

1.º Período			
Amostra	aW-100% (\pm DP)	Umidade %	aW-50% (\pm DP)
1.1	0,557 (0,002)	16,8	0,884 (0,004)
1.2	0,563 (0,006)	16,8	0,903 (0,003)
1.3	0,560 (0,001)	16,8	0,881 (0,001)
1.4	0,585 (0,011)	16,8	0,873 (0,003)
1.5	0,622 (0,011)	17,0	0,910 (0,008)
1.6	0,562 (0,001)	16,8	0,882 (0,003)
1.7	0,543 (0,001)	16,8	0,891 (0,003)
2.º Período			
1.2	0,551 (0,003)	16,8	0,905 (0,005)
2.2	0,553 (0,001)	16,8	0,893 (0,003)
3.2	0,551 (0,002)	16,4	0,906 (0,032)
4.2	0,552 (0,005)	16,4	0,903 (0,004)
5.2	0,544 (0,005)	16,4	0,897 (0,005)
5.2	0,551 (0,004)	16,6	0,900 (0,005)
7.2	0,557 (0,001)	16,8	0,902 (0,004)

DP=Desvio padrão da média.

Quanto ao parâmetro umidade, as amostras dos dois períodos variaram de 17,00% (amostra 5.1) a 16,40% (amostra 5.2) acompanhando o comportamento da aW (TABELA 30), que apresentou 0,622 (o maior valor) e 0,544 (o 2.º menor valor encontrado), relativos às amostras 5.1 e 5.2 respectivamente. Neste ensaio, não é possível relacionar estes parâmetros com a atividade antimicrobiana apresentada dado que as amostras usadas na determinação da CIM estavam inicialmente diluídas a 50% com água. Este parâmetro, no entanto, adquire importância quando o mel é usado puro como antimicrobiano, diretamente em ferimentos na pele (EFEM, 1988).

Geralmente as bactérias são mais exigentes quanto à disponibilidade de água do que as leveduras e os bolores que se destacam pela tolerância a baixa atividade de água. A maioria das bactérias se desenvolve em aW mínima de 0,91 – 0,88; as leveduras em 0,88 e os bolores em 0,80. Mundo et al. (2004), por outro lado, afirmam que o limite de aW para o crescimento de *E. coli* e *Salmonella* spp. é 0,96; para *Pseudomonas* spp. 0,97, *Bacillus subtilis* 0,95 e *S. aureus* 0,86.

Dado que a ação antimicrobiana de uma amostra pode estar intimamente relacionada ao conteúdo de água e à sua quantidade de soluto, foi determinada a CIM de uma solução de açúcares composta por 45g de glicose, 35g de frutose, 3g de sacarose e 17g de água. Esta solução saturada foi diluída a 50%, filtrada em

membrana de 0,22 μm e testada nas mesmas condições de uma amostra de mel do segundo período (amostra 7.2). O resultado está expresso na TABELA 31 e como pode ver-se, a solução de açúcares, mesmo diluída, foi efetiva contra três dos micro-organismos testados. Por outro lado a amostra de mel apresentou maior atividade, tanto em relação à abrangência quanto à quantidade inibitória mínima, sendo 2,2 vezes mais efetiva contra *E. coli* e 4,4 vezes contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Contra *C. albicans* a solução de açúcares não apresentou atividade.

TABELA 31 - Valores de CIM da solução de açúcares (glicose, frutose e sacarose) e solução mel a 50% sobre os micro-organismos testes

Solução	Micro-organismos e CIM (mg.mL^{-1})			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Açúcares a 50%	622	622	622	NS
Mel-amostra 7.2 a 50%	142	285	142	285

NS= Não Sensível

Com esses resultado pode-se inferir que soluções de açúcares podem ser efetivas contra alguns micro-organismos, porém se comparadas a méis, estes podem apresentar um maior espectro e maior capacidade de inibição mesmo quando diluídos. Wahdan et al. (1998) compararam a atividade antimicrobiana de mel e de uma calda de açúcar similar ao mel, contra vinte e uma espécies de bactérias e dois fungos. Eles constataram que não houve diferença na atividade bacteriostática entre o mel e o xarope de açúcar, mas que o mel foi significativamente mais bactericida. Diluído, o mel sempre foi mais bactericida e bacteriostático que o xarope. Os autores supuseram que além da atividade osmótica, outras propriedades do mel poderiam ser responsáveis, pelo menos parcialmente pela sua atividade antimicrobiana.

Na análise da Cor os dados estão expostos na TABELA 32.

TABELA 32 - Cor de méis (Pfund a 635nm) de *Apis mellifera* do município de Canarana-BA, coletados nos meses de fevereiro (1.º período) e setembro de 2008 (2.º período de produção)

1.º Período		
Amostra	mm	Cor
1.1	47	Âmbar extra claro
2.1	63	Âmbar claro
3.1	50	Âmbar extra claro
4.1	50	Âmbar extra claro
5.1	54	Âmbar claro
6.1	39	Âmbar extra claro
7.1	38	Âmbar extra claro
2.º Período		
1.2	45	Âmbar extra claro
2.2	37	Âmbar extra claro
3.2	43	Âmbar extra claro
4.2	45	Âmbar extra claro
5.2	36	Âmbar extra claro
6.2	34	Âmbar extra claro
7.2	48	Âmbar extra claro

Quanto ao parâmetro Cor, apesar de ter havido pouca variação entre os dois períodos, confrontando-se os valores numéricos (TABELA 32) com o resultado de atividade antimicrobiana (TABELA 27), pode ver-se que as amostras de setembro, apresentaram em média, melhor atividade contra os micro-organismos testados, especialmente *C. albicans*. Estes resultados concordam (embora existam controvérsias – TAORMINA et al., 2001) com a afirmação de que méis claros geralmente apresentam maior atividade biológica (WESTON et al., 2000). De acordo com Amiot et al. (1989), compostos fenólicos em méis interferem na cor e aqueles de cor escura têm sido reportados por sua maior quantidade de ácidos fenólicos derivativos, porém menor de flavonóides, que os de cor clara. Com estreita dependência da sua origem botânica, a cor do mel sofre interferência de um conjunto de fatores que podem estar relacionados à sua atividade biológica (BATH E SINGH 1999). A presença de flavonóides como a pinocembrina (BOGDANOV 1983) e a galangina (ANKLAM 1998), indicados como responsáveis por atividade antibacteriana e antifúngica, e o metil-siringato e o ácido sirínico encontrados no mel de manuka, com significativa atividade contra *S. aureus* (D'ARCY 2005), podem contribuir com cor do mel. Estevinho (2008), no entanto, analisando méis portugueses de *Apis*, claros e escuros, de modo geral não detectou diferença significativa entre eles quanto à atividade antimicrobiana.

Na análise do pH e Acidez os valores encontrados estão expostos na TABELA 33.

TABELA 33 – Valores de pH e Acidez (meq.kg⁻¹) de méis de *A. mellifera* do município de Canarana/BA coletados em fevereiro (1.º período) e setembro de 2008 (2.º período de produção)

1.º Período		
Amostra	pH (±DP)	Acidez (±DP)
1.1	4,5 (0,10)	19,5 (0,66)
2.1	4,5 (0,10)	19,5 (0,55)
3.1	4,5 (0,08)	19,7 (0,44)
4.1	4,5 (0,09)	19,7 (1,49)
5.1	4,5 (0,07)	20,6 (0,54)
6.1	4,5 (0,09)	20,4 (0,15)
7.1	4,7 (0,09)	19,9 (0,62)
2.º Período		
1.2	4,6 (0,01)	19,2 (0,19)
2.2	4,6 (0,00)	19,2 (0,13)
3.2	4,6 (0,02)	19,5 (0,65)
4.2	4,6 (0,04)	19,1 (0,19)
5.2	4,6 (0,05)	19,2 (0,08)
6.2	4,6 (0,05)	19,6 (0,60)
7.2	4,6 (0,06)	19,1 (0,25)

(DP)= Desvio padrão da média.

A TABELA 33 mostra que em ambos os períodos, os valores de pH estão próximos ao limite (4,00) considerado desfavorável para a maioria dos patógenos humanos (MOLAN, 2001). Cortopassi-Laurino & Gelli (1991) encontraram para méis brasileiros de *Apis* valores entre 3,95 a 4,09 e os de meliponíneos (abelhas sem ferrão), de 3,39 a 4,63. Peralta et al. (2007), analisando méis da Bahia encontraram valores de pH entre 2,91 a 5,41 para méis de *A. mellifera* e 3,2 a 3,9 para méis de abelhas sem ferrão respectivamente (dados não publicados). No presente estudo, a acidez esteve relativamente baixa, em torno de 19,5 meq.kg⁻¹. A legislação vigente (BRASIL 2000), permite até 50 meq.kg⁻¹ para méis comercializáveis, e como pode ser visto, estes parâmetros não forneceram indícios de terem sido responsáveis pela diferença na atividade observada entre os dois períodos. Cornejo (1988) e Campos (1998), analisando méis de várias origens encontraram valores de acidez que variaram de 8,20 meq.Kg⁻¹ a 62,50 meq.Kg⁻¹.

Os compostos fenólicos e os flavonóides foram analisados quantitativamente por espectrofotometria (com Folin-Ciocalteu e AlCl₃ respectivamente), e os teores encontrados estão expostos na TABELA 34. A análise qualitativa por CLAE e DAD está ilustrada nas FIGURAS 56 a 57.

TABELA 34 - Estimativa de Compostos Fenólicos Totais e Flavonóides Totais ($\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$) em méis de Canarana-BA em fevereiro (1.º período) e setembro de 2008 (2.º período de produção)

1.º Período		
Amostra	Compostos Fenólicos Totais (\pm DP)	Flavonóides Totais (\pm DP)
1.1	16,88 (0,03)	7,16 (0,09)
2.1	15,88 (0,41)	6,89 (0,21)
3.1	16,23 (0,56)	6,15 (0,28)
4.1	16,55 (0,44)	7,59 (0,16)
5.1	15,65 (0,85)	8,11 (0,11)
6.1	17,42 (0,42)	6,86 (0,33)
7.1	17,00 (0,53)	7,59 (0,06)
2.º Período		
Amostra	Compostos Fenólicos Totais (\pm DP)	Flavonóides Totais (\pm DP)
1.2	18,79 (0,03)	7,03 (0,35)
2.2	18,07 (0,41)	7,95 (0,24)
3.2	18,29 (0,56)	6,90 (0,22)
4.2	20,89 (0,44)	8,82 (0,21)
5.2	20,36 (0,85)	7,10 (0,19)
6.2	21,52 (0,42)	8,03 (0,13)
7.2	21,42 (0,53)	8,67 (0,31)

(DP)=Desvio padrão da média

Nesta amostragem, os teores de flavonóides apresentaram em média pequena variação entre si e entre os períodos (8%), com vantagem para o 2.º período. Já os compostos fenólicos totais, embora tenham apresentado certa homogeneidade dentro do mesmo período, quando comparados entre si, pode-se notar no 2.º período um incremento de 20,5% em relação ao 1.º. Comparando-se estes resultados (TABELA 34) com os da CIM (TABELA 27), pode ser vista maior atividade das amostras do 2.º período, com inibição inclusive contra a levedura, sugerindo que a diferença na atividade relatada entre os períodos pode estar relacionada além da especificidade estrutural dos compostos presentes, à quantidade deles. Alvarez et al. (2008) acredita, que a ação sinérgica entre esses compostos pode determinar ou modificar a ação antimicrobiana.

Dado que a constituição química do mel está absolutamente ligada à sua origem botânica e geográfica, os importantes compostos do metabolismo secundário das plantas ocorrem nos méis de diferentes origens, com marcadas variações tanto qualitativas como quantitativas (CHANCHAO, 2009; AL-MAMARY et al., 2002). Bertonec et al. (2007), analisando méis da Eslovênia encontrou teores de compostos fenólicos de 2,50 a 19,20 $\text{mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$. Al-Mamary (2002), verificando méis de várias partes do mundo encontrou valores de compostos fenólicos totais variando

de 56,32 a 246,21 mg/100g de mel. Al et al (2009), registrou em méis da Romania teores entre 2,00 e 45,00 mg.100g⁻¹ para fenólicos totais e 0,91 a 15,33 mg.100g⁻¹ para flavonóides. Para Ferreres et al. (1992), o teor de flavonóides no pólen de aproximadamente 0,5%, na própolis 10% e cerca de 0,005 - 0,010% no mel.

A variação na atividade biológica de méis tem sido atribuída entre outros fatores (Mundo et al,2004; Taormina et al, 2001; Weston, 2000) a diferenças na origem botânica e geográfica (Mundo et al, 2004; Weston, 2000). Namias (2003) também relacionou a atividade biológica de méis a compostos fenólicos, mas Truchado et al. (2009), analisando méis da Espanha não encontraram relação entre esses compostos e a ação inibitória. Levando em consideração que vários fatores participam da atividade biológica do mel, no citado caso, a contribuição de outros fatores podem ter encoberto a ação do parâmetro analisado.

A análise dos compostos fenólicos dos méis por CLAE (picos majoritários) apontou quase que integralmente, o mesmo perfil (FIGURAS 56 e 57), apresentando-se o 2.º período geralmente mais expressivo que o 1.º em termos de absorção. Este comportamento se manteve basicamente nos dois comprimentos de onda considerados (254 e 340nm) em quase todas as amostras, com pequenas variações deste comportamento em um ou outro pico (FIGURAS 58 e 59)

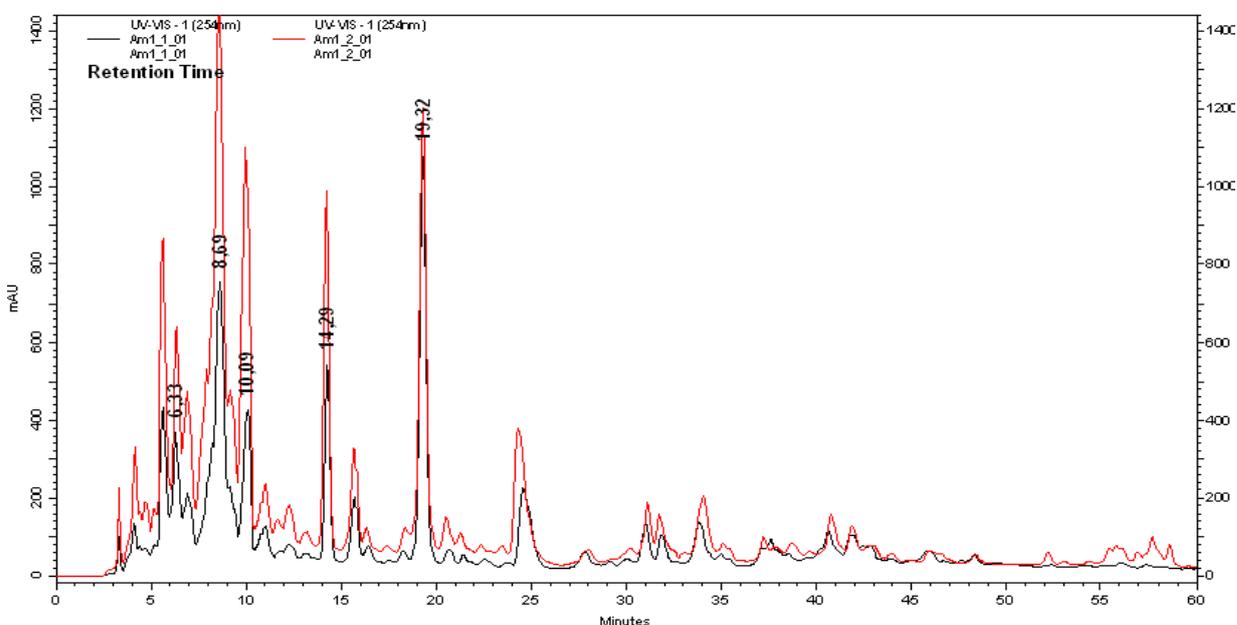


FIGURA 58 - Comparação de cromatogramas (CLAE) de mel de *A. mellifera* do município de Canarana-BA, 1.º período (preto) e 2.º período (vermelho).

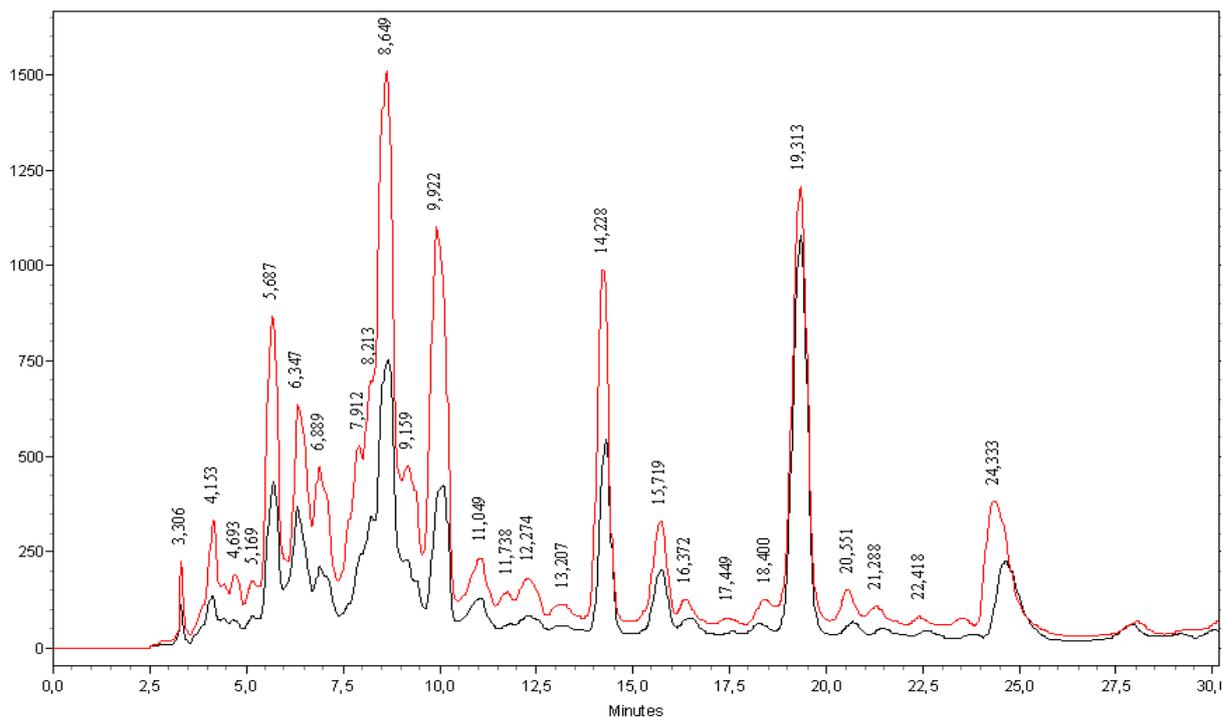


FIGURA 59- Comparação de comatogramas (CLAE) de mel de *A. mellifera* do município de Canarana-BA, 1.º período (preto) e 2.º período (vermelho)-Zoom.

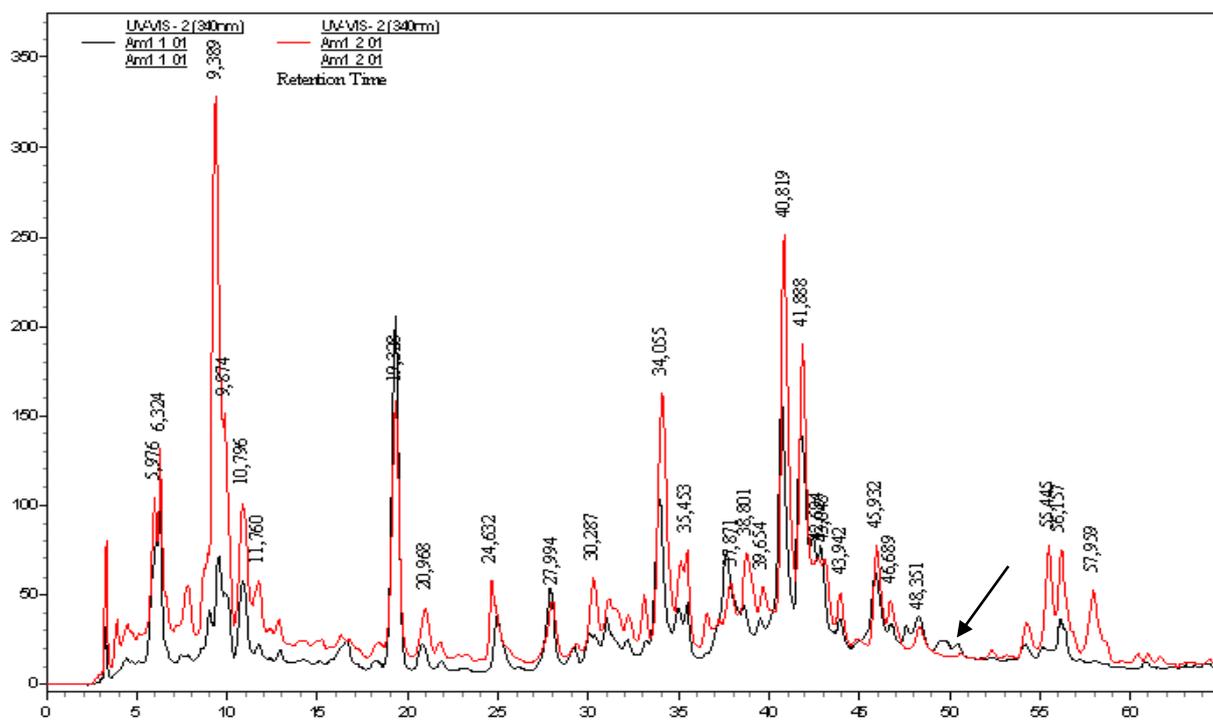


FIGURA 60 - Comparação de cromatogramas (CLAE) de mel de *A. mellifera* do município de Canarana-BA, 1.º período (preto) e 2.º período (vermelho); detalhe de pico presente no 1.º período e com pouca expressão no 2.º período.

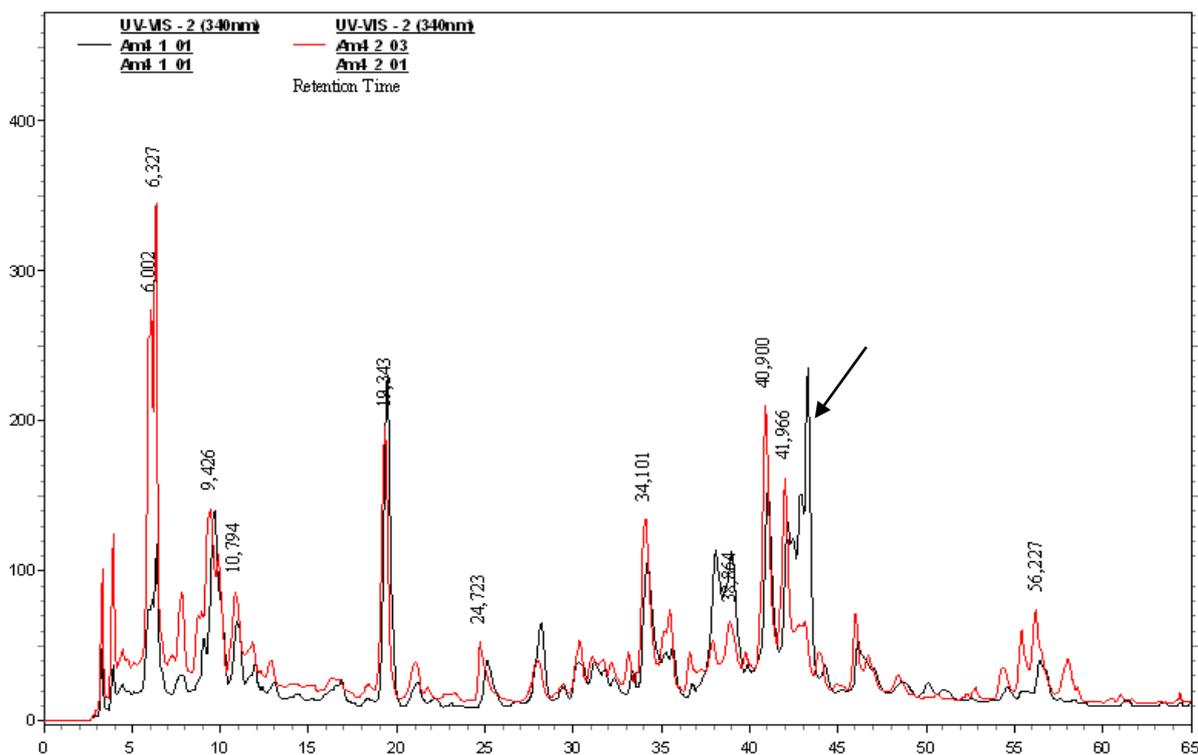


FIGURA 61 - Comparação de cromatogramas (CLAE) de mel de *A. mellifera* do município de Canarana-BA, 1.º período (preto) e 2.º período (vermelho); detalhe de pico presente no 1.º período e com pouca expressão no 2.º período.

Dos picos analisados por CLAE-DAD, foram encontrados espectros com bandas características (absorção) que sugerem a presença de compostos fenólicos tais como: o ácido elágico (260-364), o ácido vanílico (259-291), e ácido gálico (282).

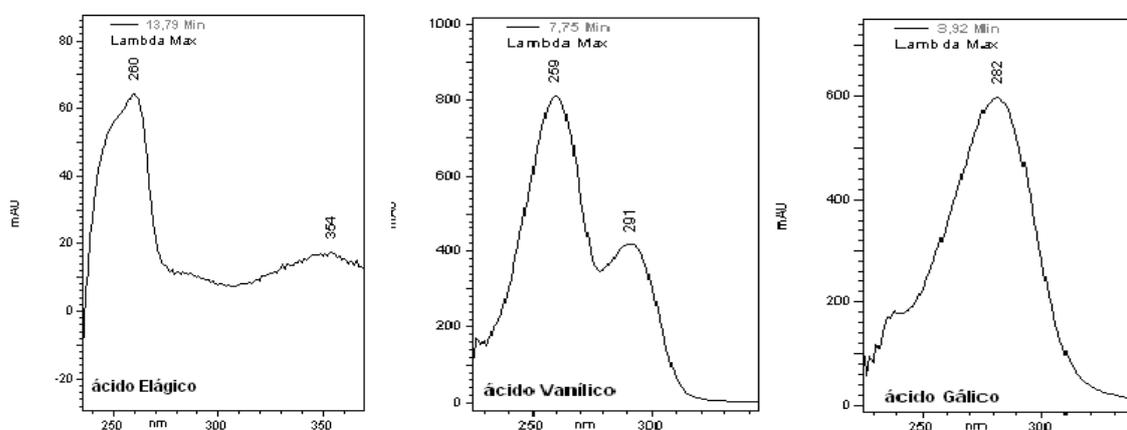


FIGURA 62 - Espectros UV de compostos fenólicos analisados por CLAE-DAD, em méis de *Apis mellifera* do município de Canarana-Bahia.

4.9 ANÁLISE POLÍNICA

A análise melissopalínológica revelou que o espectro polínico do mel de Canarana foi composto por 12 tipos polínicos distribuídos em sete famílias, sete gêneros e quatro espécies. Os dados estão sumarizados na TABELA 35 e referem-se a ambos os períodos considerados.

TABELA 35 - Espectro polínico do mel de *Apis mellifera* de Canarana-BA, coletado em fevereiro (1.º período) e setembro de 2008 (2.º período de produção): tipos polínicos, percentuais e classes de frequência

Tipos polínicos	Frequencia (%)	Classe de frecuencia
Caesalpiniaceae		
<i>Chamaecrista</i>	0.1	PI**
Fabaceae		
Tipo Fabaceae	0.2	PI
<i>Zornia</i>	0.3	PI
Melastomataceae		
<i>Clidemia</i>	0.3	PI
Mimosaceae		
<i>Mimosa arenosa</i>	0.5	PI
<i>Mimosa</i> sp.	2.9	PI
<i>Mimosa tenuiflora</i>	88.1	PD*
<i>Mimosa xiquexiquense</i>	6.3	PI
Rhamnaceae		
<i>Ziziphus joazeiro</i>	0.5	PI
Solanaceae		
<i>Solanum</i>	0.8	PI
Ulmaceae		
<i>Celtis</i>	0.1	PI
Total	100	-

*PD – pólen dominante; **PI – pólen isolado.

Como pode ser visto na TABELA 35, os valores e as classes de frequência apresentaram valores iguais em ambos os períodos. A família Mimosaceae foi a que teve a maior participação no espectro polínico das amostras, tanto em diversidade como em quantidade de tipos polínicos, sendo representada por quatro espécies: *Mimosa arenosa*, *Mimosa* sp., *Mimosa tenuiflora* e *Mimosa xiquexiquense*.

O tipo polínico *Mimosa tenuiflora* predominou nas amostras de mel analisadas como pólen dominante (>45%), tendo participado no espectro polínico com 88% em ambos os períodos considerados. Os demais tipos polínicos identificados foram enquadrados como pólen isolado (≤15%).

A ocorrência do mesmo tipo polínico dominante em ambos os períodos

considerados (fevereiro e setembro) pode estar relacionado a fatores climáticos.

Segundo Silva et al. (2008) e Silva et al. (2006), a *Mimosa tenuiflora* floresce durante todo o ano, menos nos períodos com alta precipitação de chuvas. Em Canarana a estiagem prolongada em 2008 pode ter favorecido o domínio desta planta de tipo polínico encontrado como majoritário. Conforme Drumond et al. (2000), as juremas (Mimosaceae) estão entre as três plantas mais abundantes, citadas na maioria dos trabalhos de levantamento realizados em área de caatinga. Por outro lado, de acordo com Barth (1989), o aparecimento de plantas superrepresentadas nos espectros polínicos pode ser devido à característica de grande produção de pólen e pouca contribuição de néctar. Segundo a autora, no entanto, deve-se considerar mel puro de plantas poliníferas, quando nos espectros polínicos estas aparecem com mais de 98% do total de pólen da amostra. Entre algumas espécies e gêneros superrepresentados, as espécies do gênero *Mimosa* são citados (BARTH, 1989).

Segundo Barth (1989) no estado da Bahia, o tipo polínico Mimosaceae aparece como pólen dominante ou acessório em associações com outros tipos como Caesalpiniaceae, corroborando o resultado encontrado para este estudo. A jurema preta está enraizada na cultura dos índios (Souza et al., 2008) e dos habitantes atuais da região do Nordeste, onde oferece forragem verde durante muito tempo na estação seca, madeira, lenha e carvão, alimento apícola, sendo usada como planta medicinal, principalmente como cicatrizante e anti-inflamatória (BEZERRA, 2008).

Importante no semiárido brasileiro para fornecimento de néctar e pólen para as abelhas, especialmente durante o período seco, a jurema preta é popularmente utilizada também na medicina caseira em tratamentos de queimaduras, acne e problemas de pele, pelo seu potencial antimicrobiano, analgésico, regenerador celular, antitérmico e ainda como adstringente peitoral (MAIA, 2004).

Nos EUA, Itália e Alemanha, a *Mimosa tenuiflora* é usada no preparo de loções para o couro cabeludo, sabonete, xampus e condicionadores. A casca é empregada em curtume de couros (AUGUSTO, 2009).

No México, popularmente conhecida por “tepezcohuite”, a *Mimosa tenuiflora* tem sido estudada quanto ao seu potencial terapêutico onde foram encontradas propriedades antimicrobianas do caule com ação inibitória contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos dermatófitos (BEZERRA, 2008).

Em estudo sobre a atividade antimicrobiana de algumas árvores nativas do Brasil, Gonçalves et al. (2005) observou uma excepcional atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de jurema preta sobre *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, e *Staphylococcus* spp. coagulase negativa. Pereira et al. (2006), analisando extratos de plantas do semiárido brasileiro (Paraíba), encontrou atividade sobre os *S. aureus*, *E. coli* e *Enterobacter gergoviae*. Pereira et al. (2009) estudando a ação antimicrobiana do extrato de jurema preta, na Paraíba, sobre cepas de *Staphylococcus* sp. isolados de leite de búfalas com mastite subclínica, encontrou atividade que variou de 9 a 100% segundo diluições que variaram de 50 a 6,25%. O perfil fenólico de amostras de mel de várias áreas geográficas (Europa, América do Norte, regiões equatoriais, América do Sul, China e Austrália) já foi analisado por HPLC (TOMÁS-BARBERÁN, 2001). Muñoz et al. (2007) analisando méis da América do Sul por esta técnica, concluíram que as amostras de méis da Argentina e do Chile apresentaram como componentes principais, flavonóides derivados da própolis, do néctar, e também do pólen.

Bezerra (2008) afirma que plantas do gênero *Mimosa* (Leguminosae-Mimosoideae), apresentam flavonóides, geralmente flavonas e flavanonas como principais compostos fenólicos.

A análise do perfil polínico e de compostos fenólicos das amostras, confrontadas com citações da literatura relatando a atividade biológica de *Mimosa tenuiflora*, pode indicar que a atividade antimicrobiana registradas nas amostras de mel analisado pode ser em parte advinda de compostos fenólicos originários desta espécie botânica.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da análise de variância (ANOVA) para os diferentes parâmetros entre os dois períodos considerados, e as diferenças entre as médias (Teste de Tukey a 1%) estão expostos na TABELA 36.

TABELA 36 - Análise de variância ANOVA (Tukey a 1%) de parâmetros analisados em mês de *Apis mellifera* (n=7) do estado da Bahia em fevereiro (1.º período) e setembro (2.º período) de 2008

Parâmetro	Média (\pm DP) 1.º Período	Média (\pm DP) 2.º Período	CV (%)	(Pr)	Dif. entre períodos
pH	4,50 (0,07) a	4,60 (0,01) a	1,61 – 0,28	0,0893	ND
Acidez	19,88 (0,43) a	19,28 (0,20) b	2,14 – 1,06	0,0052	D
aW	0,570 (0,03) a	0,550 (0,00) a	4,55 – 0,70	0,0700	ND
C. Fenólicos	16,51 (0,13) a	18,99 (0,22) b	2,48 – 3,89	0,0088	D
Flavonóides	7,19 (0,09) a	7,79 (0,31) b	0,59 – 3,83	0,0096	D
CIM- <i>E. coli</i>	288 (1,56) a	285 (0,18) b	0,54 – 0,06	0,0003	D
CIM- <i>S. aureus</i>	302 (5,59) a	142 (0,09) b	1,85 – 0,06	0,0000	D
CIM- <i>P. aeruginosa</i>	302 (5,59) a	142 (0,09) b	1,85 – 0,06	0,0000	D
CIM- <i>C. albicans</i>	0 (0,00) a	285 (0,18) b	0 – 0,06	0,0000	D

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 0,01% de probabilidade; n= nº de amostras; D=Detectada; ND=Não detectada; Dif.= diferença.

O resultado da análise de variância ANOVA com o teste de Tukey a 1% de significância ($p \leq 0.01$) apresentou diferenças nos parâmetros Acidez, teor de compostos fenólicos totais e de flavonóides totais, CIM contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *C. albicans* entre os dois períodos considerados (TABELA 36). Para 78% das variáveis estudadas, o $Pr < 0,01$ do teste F a 1% de significância mostrou que houve diferença significativa entre os períodos existindo 99% de probabilidade estatística de existir pelo menos um contraste entre médias dos “tratamentos” diferente de zero. Os dados foram também tratados pelo teste t (ANEXO 1, TABELA 3) que corroborando o teste de Tukey, apontou diferença entre os períodos quanto aos parâmetros citados, mantendo como exceção os parâmetros pH e a aW que não mostraram variação significativa ao nível estabelecido do teste ($p > 0,01$).

Quanto ao resultado do teor de compostos fenólicos totais *versus* atividade antimicrobiana (CIM) contra os micro-organismos teste, a análise de correlação de Pearson apresentou $r(\text{Pearson}) = -0.8158$ (*E. coli*), e -0.8411 (*S. aureus* e *P. aeruginosa*). Esses valores, de correlação negativa significativa, reforçados pelos valores de $(p) < 0.05$ ($= 0.0004$ *E.coli* e 0.0002 *S. aureus* e *P. aeruginosa*) sugerem a participação do teor de compostos fenólicos na atividade biológica registrada nos dois períodos.

Quanto à correlação entre teor de Flavonóides e CIM contra os micro-organismos teste, a baixa correlação negativa e os valores de $(p) > 0.05$ (0.1465 e 0.1343) não indicam a incidência clara do parâmetro, na diferença de atividade do 1.º para o 2.º período.

Os resultados de atividade antimicrobiana e os teores de compostos fenólicos totais apontam a interferência do período de produção pelas abelhas, onde as condições climáticas vão determinar a oferta de pasto apícola imprimindo particularidades no mel, modificando por sua vez a sua ação biológica.

REFERÊNCIAS

AIRA, M. J; HORN, H.; SEIJO, M. C., Palynological analysis of honeys from Portugal. **J. Apic. Res.**, Cardiff, v. 37, n. 4, p. 247-254, 1998.

AL, M.L.; DANIEL, D.; MOISE, A.; BOBIS, O.; LASLO, L.; BOGDANOV, S., Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania, **Food Chemistry**, Cluj-Napoca, Romania, n.112, p. 863-867, 2009.

ALI, A.T.M. M.; SWAYEH, O. A. Honey potentiates the gastric protection effects of sucralfate against ammonia-induced gastric lesions in rats, **The Saudi Journal of Gastroenterology**, Riyadh, Arabia Saudita, , ed. 3, v.9, pp.117-123, 2003.

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

ALVAREZ, M.A., DEBATTISTA, N. B., PAPPANO, N. B., Antimicrobial activity and synergism of some substituted flavonoids, *Folia Microbiol.*, San Luis, Argentina, n. 53, v. 1, p. 23-28, 1998.

ALVES, R.M.O.; CARVALHO, C.A.L.; SOUZA, B.A. Espectro polínico de amostras de mel de *Melipona mandacaia* Smith, 1863 (Hymenoptera: Apidae), **Acta Sci. Biol. Sci.**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 65-70, 2006.

AMIOT, M. J.; AUBERT, S.; GONNET, M.; TACCHINI, M. The phenolic compounds in honeys: preliminary study upon identification and family quantification, **Apidologie**, Montfavet, France, v.20, n.2, p.115-125, 1989.

ANKLAM, E., A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey, **Food Chemistry**, Ispra, Italy, v. 63, n.4, p. 549–562, 1998.

A.O.A.C.-16th Edition, Rev. 4th - 969.38 B / 962.19, 1999.

AUGUSTO, F., Jurema preta, árvore sagrada, Disponível em: <http://pistasdocaminho.blogspot.com/2008/11/jurema-preta-rvore-sagrada.html>, Acesso: nov./ 2009.

BATH, P. K., SINGH, N., A comparison between *Helianthus annuus* and *Eucalyptus lanceolatus* honey, **Food Chemistry**, Amritsar, Índia, v.67, 1999 389-397, 1999.

BARTH, O.M. O pólen no mel brasileiro, Rio de Janeiro: Gráfica **Luxor**, 150pp. , 1989.

BERTONCELJ, J.; DOBERŠEK, U.; JAMNIK, M.; GOLOB, T. , Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey, **Food Chemistry**, Eslovenia, n.105, p. 822-828, 2007.

BEZERRA, D. A. C., Estudo fitoquímico, bromatológico e microbiológico de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret e *Piptadenia stipulacea* (Benth) Ducke. Patos, PB: UFCG, **Dissertação** (Mestrado em Zootecnia), Sistemas Agrossilvipastoris no Semiárido, 62 ff., 2008.

BIANCHI, E. M. La miel, características y composición – Análisis y Adulteraciones. Santiago del Estero, Argentina: **UNSE – CEDIA**, 1981.

BIOESTAT 5.0- APLICAÇÕES ESTATÍSTICAS NAS ÁREAS DAS CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, Belém, Pará, 2007.

BLACK, J. G., **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**, 4.^aed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 829 pp., 2002.

BOGDANOV, S. LULLMANN, C.; MARTIN, P.; VON DER OHE, W.; RUSSMANN, H.; VORWOHL, G.; ODDO, L.P.; SABATINI, A.G.; MARCAZZAN, G.L.; PIRO, R.; FLAMINI, C; MORLOT, M.; LHÉRITIER, J.; BORNECK, R.; MARIOLEAS, P.; TSIGURI, A.; KERKVLIT, J.; ORTIZ, A.; IVANOV, T.; DARCY, B.; MOSSEL, B.; VIT, P., Honey quality and international regulatory standards: review by the International honey commission, **Bee Word**, Cardiff, England, v.80, n.2, p.61-69, 1999.

BOGNADOV, S., Nature and origin of the antibacterial substances in honey, **Lebensmittel-Wissenschaft-und-Tchnologie**, Bern, Switzerland, v. 30, n. 7, p. 748-753, 1997.

BOGDANOV, S., Characterisation of antibacterial substances in honey, *Lebensm Wiss, Technology*, n. 17, p. 74-76, 1983.

BOLETÍN APÍCOLA, n. 16, 2001, Disponível em:
http://www.alimentosargentinos.gov.ar/03/apicola/01_info/b_boletin/016/Bol_Ap_i_16.htm, Acesso: dez. /2009.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance, **Nutrition Reviews**, Madrid, Spain, n. 56, p. 317–333, 1998.

CAMPOS, G., Melato no mel e sua determinação através de diferentes metodologias Tese (Doutorado), **Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 178 ff., 1998.

CAMPOS, M., MARKHAM, K. R., MITCHELL, K. A., DA CUNHA, A. P., An approach to the characterization of bee pollens via their flavonoid phenolic profiles, **Phytochemical Analysis**, Coimbra, Portugal, n. 8, p. 181-185, 1997.

CHANCHAO, C., Antimicrobial activity by *Trigona laeviceps* (Stingless Bee) honey from Thailand, **Pak J. Med Sci.**, Bangkok, Thailand, v.25, n. 3, p. 364-369, 2009.

CLSI, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; **Approved standard- six edition. CLSI document M7-A6** (ISBN 1-56238-486-4, CLSI, 940 West Valley Road, suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA), 2003.

COOPER, R. A.; HALAS, E.; MOLAN, P.C.; The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns, **J. Burn Care Rehabil.**, Cardiff, United Kingdom, n. 23, pp. 366-370, 2002.

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

CORNEJO, L.G. Tecnologia de miel. In: SEEMANN, P.; NEIRA, M. (ed). **Tecnología de la producción apícola**, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Valdivia, p.145-171, 1988.

CPTEC/INPE Disponível em: <http://www.cptec.inpe.br/> Acesso: set. /2009.

CORTOPASSI-LAURINO, M.; GELLI D. S., Pollen Analysis: physicochemical properties and antibacterial action of brazilian honeys from africanized honeybees (*Apis-mellifera* L) and stingless bees, **Apidologie**, USA, v. 22, n. 1, p. 61-73, 1991.

D'ARCY, B. R. Antioxidants in Australian Floral Honeys—Identification of health-enhancing nutrient components. **Rural Industries Research and Development Corporation, RIRDC** Publication n. 05/040, Project n. UQ-102A, Australia, 94 p., 2005.

DRUMOND, M. A.; KIILL, L. H. P.; LIMA, P. C. F.; OLIVEIRA, V. R.; OLIVEIRA, M. C., ALBUQUERQUE, S. G.; NASCIMENTO, C. E. S.; CAVALCANTI, J. Avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma Caatinga. **Estratégias para o Uso Sustentável da Biodiversidade da Caatinga**, Petrolina, PE, 23pp., 2000.

EFEM, S. E. E. Clinical observations on the wound healing properties of honey. **British Journal of Surgery**, Oxford, v.75, n.7, p. 679-681, 1988.

ERDTMAN, G., The acetolysis method. A revised description, **Svensk Botanisk Tidskrift**, [S.l.], v.54, n.4, p. 561-564, 1960.

ESTEVINHO, L.; PEREIRA, A.P.; MOREIRA, L.; G. DIAS, G.; PEREIRA, E., Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey, **Food and Chemical Toxicology**, Bragança, Portugal, v. 46, n. 12, p. 3774-3779, 2008.

FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; TOMÁS-LORENTE, F.; TOMÁS-BARBERAN, F. A. Hesperetin: a marker of the floral origin of citrus honey, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Washington, v.61, n.1, p.121-123, 1993.

FERRERES, F.; ORTIZ, A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; TOMAS-LORENTE, F., Flavonoids of la Alcarria-honey - A study of their botanical origin. **Zeitschrift fur Lebensmittel**, v.194, n.2, p.139-143, 1992.

FERRERES, F.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; GIL, M. I.; TOMAS-LORENTE, F. An HPLC technique for flavonoid analysis in honey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Washington, v.56, n.1, p.49-56, 1991.

GALVANI, E. Estudo comparativo dos elementos do Balanço Hídrico Climatológico para duas cidades do Estado de São Paulo e para Paris, **Revista Franco-Brasileira de Geografia**, v. 4, n. 4, 2008, Disponível em: <http://confins.revues.org/index5819.html>. Acesso: nov./ 2009.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas, **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3, p.353-358, 2005.

HAVSTEEN, H. B., The biochemistry and medical significance of flavonoids, **Pharmacology & Therapeutics**, Kiel, Germany, v. 96, p. 67– 202, 2002.

HOFFMANN, F. L., Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos, **Brasil Alimentos, Unesp**, São José do Rio Preto, SP, v. 9, n. 1, p. 23-30, 2001.

IBGE, disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?codmun=290620>. Acesso: ago./2010.

KIM, D., JEONG, S. W.; LEE, C. Y., Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums, **Food Chemistry**, South Korea, v. 81, p. 321–326, 2003.

LIMA, L. C. L.; SILVA, F. H. M.; SANTOS, F. A. R., Palinologia de espécies de Mimosa L. (Leguminosae - Mimosoideae) do Semi-Árido brasileiro. **Acta Botanica Brasilica**, SP, v.22, n.3, p. 794-805, 2008.

LOUVEAUX, J.; MAURIZIO, A.; VORWOHL, G. Methods of melissopalynology, **Bee World**, Gerrards Cross, v.59, n.4, p.139-157, 1978.

MAIA, G.N., Caatinga - árvores e arbustos e suas utilidades, São Paulo: **D&Z**, p. 237-246, 2004.

MARTOS, I. ; FERRERES, F.; YAO, L. H.; D'ARCY, B.; CAFFIN, N.; TOMÁS-BARBERÁN, F .A., Flavonoids in monospecific Eucalyptus honeys from Australia, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.48, n.10, p. 4744-4748, 2000.

MELO FILHO, J. F. de; SOUZA, André L. V., O manejo e a conservação do solo no Semi-árido baiano: desafios para a sustentabilidade, **Bahia Agrícola**, v.7, n.3, p. 50-60, 2006.

MELHEM, T. S.; CRUZ-BARROS, M. A. V.; CORRÊA, A. M. S.; MAKINO-WATANABI H.; SILVESTRE-CAPELATO, M. S. F.; GONÇALVES-ESTEVEVES, V. L. Variabilidade polínica em plantas de Campos do Jordão (SP, Brasil). **Boletim do Inst. de Botânica**, v.16, n. 1, p.104, 2003.

MODRO, A.F.H.; SOUZA, S. de; ABURAYA, F.H.;MAIA, E., Conhecimento dos moradores do médio Araguaia, Estado do Mato Grosso, sobre a utilidade de produtos de abelhas (Hymenoptera, Apidae), **Acta Sci Biol Sci.**, v. 31, n. 4, 2009. Disponível em: <http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/4518/4518>. Acesso: nov. /2009.

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

MOLAN, P. C., Potential of honey in the treatment of wounds and burns, **Am. J. Clin.**

Dermatol, Wales, v.1, p. 13-19, 2001.

MUNDO, M.A.; PADILLA-ZAKOUR, O.I.; WOROBO, R.W., Growth and inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys, **International Journal of Food Microbiology**; in press (Partially funded by the National Honey Board) , 2004.

MUÑOZ, O. e COPAJA, S., Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante, **Química Nova**, Santiago, Chile, v. 30, n.4, p 848-851, 2007.

NOVAIS, J.S. de; LIMA, L.C.L e; DOS SANTOS, F.A.R. Aspectos polínicos de méis de *Tetragonisca angustula* LATREILLE, 1811 coletados na caatinga de Canudos, Bahia, Brasil, **Magistra**, Cruz das Almas-BA, v. 18, n. 4, p. 257-264, 2006.

NAMIAS, M.D.N., Honey in the management of infections: evidence for the antimicrobial properties of honey; Disponível em: <https://profreg.medscape.com/px/getlogin.do;meddomainjsession>. Acesso: nov./2009.

OLIVEIRA, P. P., Análise palinológica de amostras de mel de *Apis mellifera* L. produzidas no estado da Bahia, Tese (Doutorado - Botânica), Universidade Estadual de Feira de Santana, BA, 192 ff. 2009.

PARK, K. Y.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINI, A.R. P.; AGUIAR, C.L., Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal, **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 32, n.6, p. 997-1003, 2002.

PEREIRA, M. S. V.; RODRIGUES, O. G.; F. M. C. FEIJÓ; A. C. R. ATHAYDE; E. Q. LIMA; M. R. Q. SOUSA, Atividade antimicrobiana de extratos de plantas no Semi-Árido Paraibano, **Agropecuária Científica no Semi-árido**, Patos, v.2, n.1, p. 37-43, 2006.

PEREIRA. A.V.; RODRIGUES, O.G.; DE LIMA, E.Q.; OLIVEIRA, A.O.; MOTA, R.A.; MEDEIROS, E.S. Perfil de sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de jurema preta e neem sobre amostras de *staphylococcus* sp. isoladas de mastite em búfalas, **Arq.**

Inst. Biol., São Paulo, v.76, n.3, p.341-346, 2009.

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

PLANO safra territorial 2006-2011: território Irecê-Bahia. Disponível em: [HTTP://serv-sdt-1.mda.gov.br/sit/biblioteca_virtual/pst/pst-territorio050.pdf](http://serv-sdt-1.mda.gov.br/sit/biblioteca_virtual/pst/pst-territorio050.pdf). Acesso: abr./ 2009.

SABATIER, S.; AMIOT, M.-J.; AUBERT, S.; TACCHINI, M.; GONNET, M. Importance of flavonoids in sunflower honeys, [Importance des flavonoides dans les miels de tournesol.]. **Bulletin Technique Apicole**, Bures-sur-Yvette, France, v. 15, n.3, p. 171-178, 1988.

SABATIER, S.; AMIOT, M.-J. ; TACCHINI, M.; AUBERT, S. Identification of flavonoids in sunflower honey, **Journal of Food Science**, Bures-sur-Yvette, France, v. 57, n. 3 , p. 773 – 774, 1992.

SANT'ANA, A.; CONCEIÇÃO, C.; AZEREDO, D. R. P., Comparação entre os métodos rápidos simplate R TPC- CI e petrifilm R AC e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes, **Brazilian Journal of Food Technology**, Vassouras, RJ, v. 6, n. 1, p.85-89, 2003.

SILVA, T. R. S.; GIULIETTE, A. M.; HARLEY, R. M., 2005, Flora da Bahia: História e Organização. Disponível em: <http://www.uefs.br/floradabahia/apresent.html> Acesso: Nov. 2006.

SILVA, R. A. da; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; AQUINO, I. de S.; FELIX , L.P., MATA, M. F.; PERONICO, A. S. Caracterização da flora apícola do semi-árido da Paraíba, **Arch. Zootec.**, Areia-PB, v.57 n. 220, p. 427-438, 2008.

SIVAM, G., Analysis of Flavonoids, In: **Analysis of Functional Foods**, ed. Hurst W, **CRC Press**, 2002, Disponível em: www.bastyr.edu Research, Acesso: dez./2009.

SOUZA, R.S.O.; ALBUQUERQUE, P.U.; MONTEIRO, J. M.; AMORIM, E.L.C., Jurema-preta, (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): a review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology, **Braz. Arch. Biol. Technol.**, Recife-PE, v.51, n. 5, p. 937-947, 2008.

SUBRAHMANYAM, M., Topical application of honey in treatment of burns, **British Journal of Surgery**, Oxford, n. 78, p. 479-478, 1991.

TAORMINA, P. J.; NIEMIRA, B. A.; BEUCHAT, L. R. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. **International Journal of Food Microbiology**, Griffin, n. 69, p. 217-225, 2001.

TERRITORIO_SOCIEDADE_ESTADO_BAHIA, Disponível em:

http://tdcat.cesca.es/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX0203105122457//6.TERRITORIO_SOCIEDADE_ESTADO_BAHIA.pdf. Acesso em: mar./2010.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela, **Phytochemistry**, Mérida, Venezuela, v.34, n.1, p.191-196, 1993.

TOMAS-BARBERAN, F. A.; MARTOS, I.; FERRERES, F.; RADOVIC, B. S.; ANKLAM, E., HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Washington, v.81, n.5, p.485-496, 2001.

TRONCOSO, A. A. El estudio del pólen atmosférico, una posibilidad educativa, Santiago: **Museo Nacional de Historia Natural**, Noticiario Mensual, n. 278, 12pp., 1979.

TRUCHADO, P.; LÓPEZ-GÁLVEZ, F.; GIL, M.I.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; ALLENDE, A. Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics, CEBAS-CSIC, Murcia- Spain, **Food Chemistry**, n. 115, p. 1337-1344, 2009.

VIT, P.; MEDINA, M.; ENRÍQUEZ, E. Quality standards for medicinal uses of

Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela, **Bee World**, Mérida, Venezuela , v. 85, n. 1, p. 2-5, 2004.

WAHDAN, H.A. L., Causes of the antimicrobial activity of honey, **Infection**, Cairo, Egypt, v.26, (1) p. 26-31, 1998.

WAIKATO, Disponível em: http://bio.waikato.ac.nz/honey/honey_intro.shtml, Acesso: mar./2010.

WESTON, R. J.; MITCHELL, K. R.; ALLEN, K. L. Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey. **Food Chemistry**, Oxon, v.64, n.3, p.295-301 1999.

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

WILLIX, D.J.; MOLAN, P.C.; HARFOOT, C.G., A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and other honey, **Journal of Applied Bacteriology**, Hamilton, New Zealand, n.73, p. 388-394, 1992.

YAO, L.; JIANG, Y; SINGANUSONG , R.; DATTA, D.; RAYMONT , K.; Phenolic acids and abscisic acid in Australian *Eucalyptus* honeys and their potential for floral authentication, **Food Chemistry**, Republic of China, v. 86, n. 2, p. 169-177, 2004.

YAO, L.H., DATTA, N., TOMÁS-BARBERÁN, F.A., FERRERES, F., MARTOS, I. and SINGANUSONG, R., Flavonoids and other phenolic compounds in Australian and New Zealand *Leptospermum* honeys, **Food Chemistry**, Gatton, Australia, n.81, p. 159–168, 2003.

ZUMLA, A.; LULAT, A.; Honey – a remedy rediscovered, **Journal of Royal Society of Medicine**, London, v. 82, n.7, p.384–385, 1989.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os méis de *A. mellifera* e de abelha sem ferrão coletados no estado da Bahia apresentaram atividade antimicrobiana contra uma bactéria Gram-positiva (*S. aureus*), duas Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) e uma levedura (*C. albicans*), com variações de resultados entre as amostras e entre os métodos utilizados para a determinação do potencial antimicrobiano. De modo geral, *Staphylococcus aureus* foi o micro-organismo mais sensível aos méis estudados.

Os méis de *A. mellifera* em comparação aos de abelha sem ferrão foram capazes de inibir um número maior de micro-organismos pelos métodos de difusão em ágar e de determinação da concentração inibitória mínima. O método da concentração inibitória mínima se mostrou mais sensível do que o de difusão em ágar para avaliação do potencial antimicrobiano de méis, pois somente pelo primeiro método todas as amostras foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus* e *E.coli*.

O mel manteve o seu potencial antimicrobiano mesmo quando diluído, superando a inibição promovida pela solução de açúcares. Este fato sugere que outros fatores além da atividade osmótica contribuíram para a ação biológica registrada. Apoiando-se nos dados encontrados, pode-se inferir que a capacidade osmótica dos méis, embora não seja determinante absoluta da atividade contra micro-organismos, participa da ação antimicrobiana quando a concentração ainda é suficiente alta para manter o fluxo de solvente no sentido do micro-organismo para a amostra.

Apesar da possível contribuição apresentada pelo pH e a acidez na atividade antimicrobiana, na amostragem trabalhada não ficou evidente a relação com as variações observadas entre as amostras. Neste estudo também não foi possível estabelecer relação direta entre a cor do mel e atividade antimicrobiana.

Outros fatores que podem interferir na ação antimicrobiana como o peróxido de hidrogênio e substâncias do metabolismo secundário, como compostos fenólicos,

foram avaliados. Os resultados encontrados com a queda da atividade antimicrobiana após a inibição do peróxido de hidrogênio por catalase indicam a participação deste parâmetro na atividade biológica estudada. No que se refere aos compostos fenólicos, de uma maneira geral, os méis produzidos no estado da Bahia são mais ricos em ácidos fenólicos e a sua atividade biológica poderia ser advinda desses compostos. Entretanto não foi possível estabelecer uma correlação direta entre o teor de compostos fenólicos ou de flavonóides na atividade antimicrobiana observada, quando a amostragem não restringiu o período e o local de produção.

A análise dos compostos fenólicos das amostras avaliadas por CLAE demonstrou que os méis de *A. mellifera* produzidos no estado possuem um perfil de compostos fenólicos mais diversificado do que aqueles produzidos pelas abelhas sem ferrão tratadas neste estudo. Foi verificada a presença do ácido gálico, ácido elágico, ácido vanílico e da crisina (DAD), além de compostos com tempo de retenção comuns a padrões autênticos dos ácidos p-cumárico e ferúlico e dos flavonóides rutina, pinocembrina, 3,6-dihidroxi-flavona e quercetina. Através da análise multivariada foi possível agrupar algumas amostras com relação ao perfil fenólico por CLAE, entretanto neste agrupamento, as amostras apresentaram uma faixa ampla de valores de concentração inibitória mínima, indicando assim que os compostos fenólicos não são os únicos responsáveis pela atividade observada.

A impossibilidade de estabelecer uma correlação significativa entre cada um dos parâmetros isoladamente e a respectiva ação antimicrobiana, pode estar ligada à aleatoriedade da amostragem, e ao fato de ser o mel uma matriz complexa, e assim todos os fatores podem de forma conjunta contribuir para o aumento ou diminuição da ação biológica.

No que se refere à distribuição geográfica das amostras coletadas, a variação desta atividade biológica não pode ser atribuída primariamente a regiões geográficas de produção de mel, mas, acreditamos que em se tratando de amostragens restritas seja possível correlacionar esses dois aspectos.

Com relação à avaliação de amostras oriundas de uma mesma colméia observou-se que os méis de *A. mellifera* do município de Canarana apresentaram atividade antimicrobiana contra as bactérias *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e a

levedura *C. albicans*. Aqueles méis coletados em setembro, quando a seca foi mais acentuada (2.º Período) foram mais eficientes como agentes antimicrobianos que os do 1.º (fevereiro/2008), assinalando a interferência do clima na produção e na ação biológica do mel. Entretanto sugere-se que este estudo seja ampliado para um maior período de tempo e um número maior de amostras para uma análise mais acurada.

O conhecimento do perfil polínico e o estabelecimento da origem botânica do mel apontam os compostos fenólicos como partícipes da atividade biológica, e prováveis responsáveis pelo incremento da atividade no 2.º período de produção dos méis de Canarana, sendo que Mimosaceae foi o tipo polínico encontrado com maior participação nesta pesquisa.

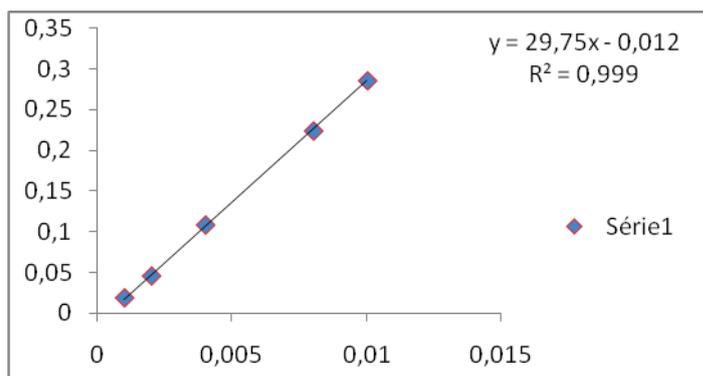
Este trabalho, pioneiro no estado da Bahia, demonstra a atividade antimicrobiana e amplia o conhecimento sobre méis produzidos no estado, evidenciando seu promissor potencial para o uso terapêutico regulamentado. Oferece uma base bastante abrangente a respeito dos méis produzidos no estado da Bahia, mas ressalta, no entanto, a necessidade de refinamento através de amostragens setorizadas, análise palinológica, de identificação e quantificação de compostos fenólicos com vistas à elucidação da origem botânico-geográfica, e de sazonalidade. Do mesmo modo, aponta a importância de serem realizadas análises de experimentação clínica *in vitro* para ampliação do seu espectro de ação contra micro-organismos e *in vivo* para uma adequada orientação de uso do mel como produto terapêutico e biotecnológico. Isto certamente poderá contribuir para o desenvolvimento de pesquisas voltadas à padronização de produtos de uso medicinal, o que poderia incidir diretamente na produção através da agregação de valor. O aproveitamento biotecnológico desta matéria-prima poderá resultar na melhoria de renda de produtores locais, no aumento do interesse na produção e consequente influência na proteção dos biomas envolvidos.

ANEXO 1

TABELA 1- Compostos fenólicos totais (mg AG.100g⁻¹ mel) *Apis mellifera* do estado da Bahia mg AG.100g⁻¹ mel; equação da curva: $y = 29.754x - 0.0127$; padrão: ácido gálico

Amostra	Massa (mg)			Abs. 750 nm		Média	± DP	CV%	
1	2.6021	2.5946	2.5785	0.058	0.058	0.066	9.52	0.64	6.75
2	2.6027	2.5496	2.5215	0.094	0.079	0.086	13.01	0.85	6.57
3	2.5950	2.5395	2.5356	0.078	0.079	0.081	12.10	0.34	2.79
4	2.6249	2.5962	2.5769	0.092	0.079	0.081	12.50	0.80	6.44
5	2.5887	2.5965	2.5861	0.068	0.069	0.072	10.69	0.28	2.64
6	2.6690	2.5682	2.5793	0.052	0.045	0.045	7.74	0.35	4.57
7	2.5432	2.5532	2.5212	0.099	0.102	0.100	14.96	0.18	1.18
8	2.5329	2.5129	2.5875	0.060	0.051	0.062	9.29	0.67	7.18
9	2.5956	2.8184	2.5604	0.111	0.128	0.111	16.34	0.39	2.40
10	2.5399	2.5708	2.7683	0.058	0.063	0.068	9.68	0.29	2.98
11	2.6616	2.7083	2.5892	0.133	0.144	0.140	19.22	0.74	3.84
12	2.5772	2.7635	2.6891	0.084	0.088	0.083	12.27	0.33	2.65
13	2.7095	2.6591	2.6107	0.086	0.081	0.079	11.96	0.24	2.03
14	2.7280	2.7357	2.6453	0.056	0.051	0.049	8.04	0.36	4.53
15	2.9242	2.6727	2.7506	0.131	0.127	0.129	17.13	0.55	3.20
16	2.6579	2.8226	2.8729	0.090	0.084	0.088	12.09	0.78	6.49
17	2.8336	2.8037	2.7082	0.055	0.056	0.054	8.18	0.13	1.62
18	2.5613	2.6860	2.5094	0.052	0.058	0.052	8.67	0.18	2.06
19	2.5646	2.7270	2.6221	0.230	0.251	0.237	32.10	0.36	1.11
20	0.6330	0.5366	0.5583	0.034	0.028	0.028	24.93	0.51	2.04
21	2.8524	3.3090	3.0769	0.080	0.101	0.087	11.12	0.37	3.34
22	2.6219	2.5232	2.8133	0.097	0.095	0.115	14.55	0.62	4.28
23	2.7091	2.6320	2.6381	0.068	0.065	0.061	9.77	0.34	3.44
24	2.6950	2.6797	2.9596	0.059	0.065	0.072	9.44	0.43	4.58
25	2.9870	2.5715	2.9133	0.067	0.064	0.075	9.70	0.64	6.58
26	2.8594	2.5567	2.7527	0.056	0.048	0.051	7.94	0.15	1.91
27	2.5410	2.4977	2.9759	0.078	0.074	0.091	11.79	0.18	1.52
28	2.4108	2.6197	2.4191	0.088	0.095	0.086	13.86	0.17	1.20
29	2.5660	2.5767	2.4615	0.064	0.064	0.056	9.81	0.37	3.80
30	2.8255	2.6616	2.5355	0.127	0.115	0.108	16.25	0.33	2.01
31	3.0079	2.6850	2.5087	0.090	0.088	0.075	11.94	0.59	4.93
32	2.6494	2.5609	2.6316	0.048	0.049	0.050	7.94	0.21	2.63
33	2.7228	2.7149	2.8226	0.210	0.202	0.212	26.94	0.48	1.79
34	2.7870	2.9633	2.6124	0.034	0.037	0.028	5.50	0.23	4.18
35	2.8046	2.8605	2.9579	0.112	0.112	0.114	14.66	0.27	1.87
36	2.8454	2.6882	2.6981	0.101	0.095	0.093	13.35	0.16	1.22
37	2.6404	3.0966	2.5993	0.100	0.115	0.092	13.91	0.41	2.92

Abs. = absorvância; DP= Desvio padrão; CV= Coeficiente de variação.



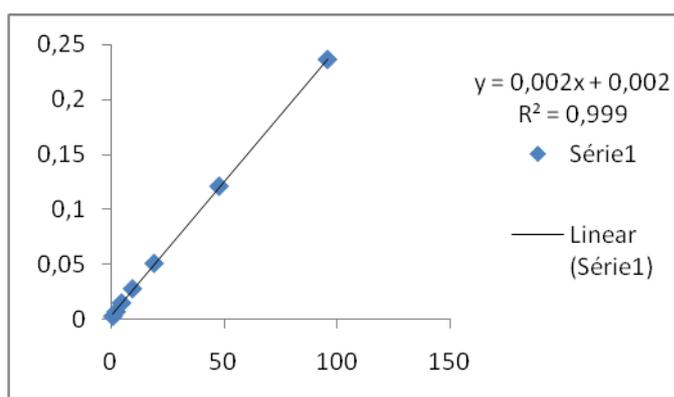
X (mg.0,1mL ⁻¹)	Y (Abs. 750 nm)
0.001001	0.018
0.002002	0.045
0.004004	0.108
0.008008	0.224
0.01001	0.286

Figura 1- Curva analítica de ácido gálico

TABELA 2 - Flavonóides totais em mel (mg QE.100g⁻¹ mel) - *Apis mellifera* do estado da Bahia; equação da curva: $y = 0.0024x + 0.0028$; padrão: quercetina

Amostra	Massa (g)			Abs. 510 nm			Média	± DP	CV%
1	2.7170	2.5946	2.5785	0.009	0.009	0.009	3.75	0.05	1.34
2	2.5356	2.5496	2.5215	0.005	0.005	0.005	1.45	0.01	0.71
3	2.5376	2.5395	2.5356	0.011	0.011	0.011	5.39	0.00	0.08
4	2.6325	2.5962	2.6921	0.009	0.009	0.009	3.93	0.03	0.82
5	2.7155	2.5965	2.5861	0.007	0.007	0.007	2.52	0.05	1.89
6	2.6194	2.5682	2.5793	0.004	0.004	0.004	0.74	0.02	2.51
7	2.7261	2.5532	2.7855	0.020	0.019	0.021	10.60	0.26	2.42
8	2.5502	2.5129	2.5875	0.011	0.011	0.011	5.36	0.08	1.46
9	2.5456	2.6177	2.5604	0.014	0.014	0.014	7.18	0.13	1.80
10	2.5309	2.5708	2.7683	0.005	0.005	0.005	1.51	0.08	5.58
11	2.6021	2.7083	2.5892	0.015	0.016	0.015	7.83	0.04	0.55
12	2.7263	2.7635	2.6891	0.011	0.012	0.011	5.21	0.29	5.59
13	2.6369	2.6591	2.6107	0.013	0.013	0.013	6.45	0.02	0.25
14	2.5915	2.7357	2.6453	0.006	0.006	0.006	2.10	0.05	2.28
15	2.7117	2.6727	2.7506	0.016	0.016	0.017	8.32	0.26	3.08
16	2.6527	2.8226	2.8729	0.005	0.005	0.005	1.46	0.07	4.85
17	2.6038	2.8037	2.7082	0.011	0.012	0.011	5.25	0.21	4.02
18	2.6055	2.6860	2.5094	0.007	0.007	0.007	2.68	0.06	2.29
19	1.3830	2.7270	2.6221	0.015	0.030	0.028	15.79	0.94	5.96
20	0.5474	0.5366	0.9650	0.010	0.010	0.016	22.36	0.44	1.96
21	3.1930	3.3090	3.0769	0.013	0.013	0.013	5.33	0.19	3.64
22	2.3442	1.8750	2.8133	0.015	0.013	0.017	8.72	0.33	3.78
23	2.5404	2.6320	2.6381	0.010	0.010	0.010	4.61	0.10	2.13
24	2.5473	2.6797	2.9596	0.011	0.012	0.013	5.61	0.21	3.79
25	2.9870	2.5715	2.9133	0.010	0.009	0.010	4.05	0.06	1.44
26	2.8594	2.5567	2.7527	0.005	0.005	0.005	1.35	0.08	5.74
27	2.5410	2.4977	2.9759	0.011	0.010	0.012	5.11	0.29	5.66
28	2.4108	2.6197	2.4191	0.014	0.015	0.014	7.80	0.09	1.12
29	2.5660	2.5767	2.4615	0.009	0.009	0.009	4.00	0.05	1.17
30	2.8255	2.6616	2.5355	0.010	0.009	0.009	4.15	0.09	2.28
31	3.0079	2.6850	2.5087	0.011	0.01	0.009	4.38	0.16	3.55
32	2.6494	2.5609	2.6316	0.005	0.005	0.005	1.36	0.03	2.37
33	2.7228	2.7149	2.8226	0.032	0.032	0.033	17.89	0.04	0.20
34	2.7870	2.9633	2.6124	0.012	0.012	0.011	5.30	0.17	3.30
35	2.8046	2.8605	2.9579	0.012	0.013	0.013	5.72	0.24	4.18
36	2.8454	2.6882	2.6981	0.014	0.013	0.013	6.50	0.05	0.83
37	2.6404	3.0966	2.5993	0.009	0.011	0.009	3.99	0.16	3.98

Abs. = absorvância; DP= Desvio padrão; CV= Coeficiente de variação.



X (µg.m ⁻¹)	Y (Abs. 510 nm)
0.96	0.003
2.4	0.007
4.8	0.015
9.6	0.028
19.2	0.051
48	0.121
96	0.236

Figura 2- Curva analítica de Quercetina

TABELA 3 - Compostos fenólicos totais em mel (mg AG.100g⁻¹ mel)- Abelhas sem ferrão do estado da Bahia; equação da curva: $y = 29.754x - 0.0127$; padrão: ácido gálico

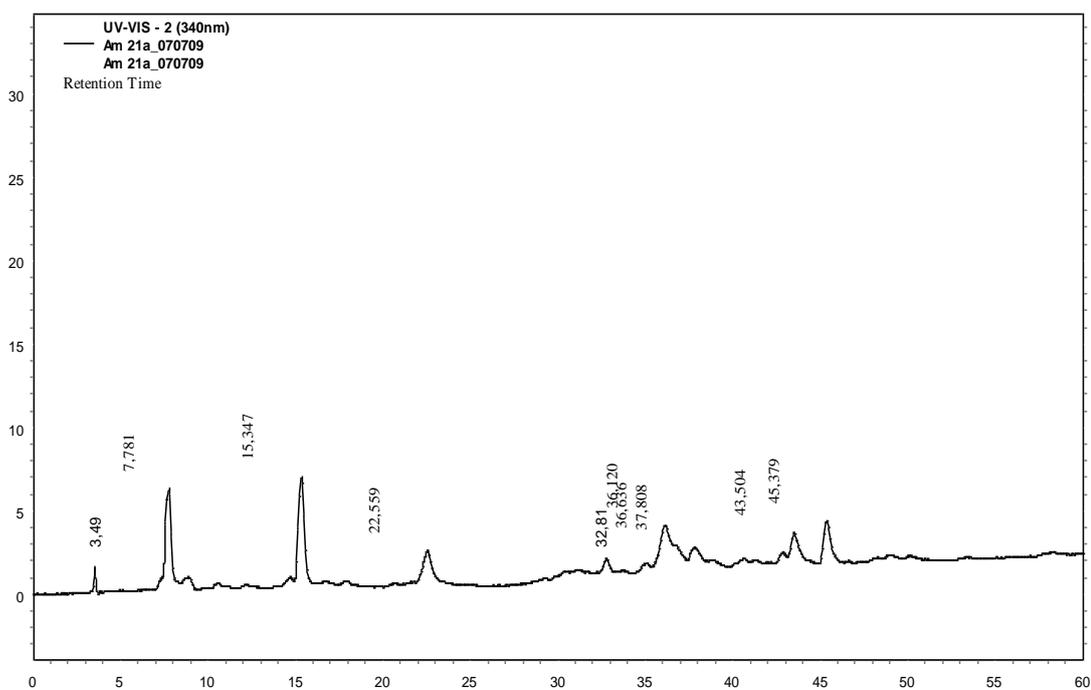
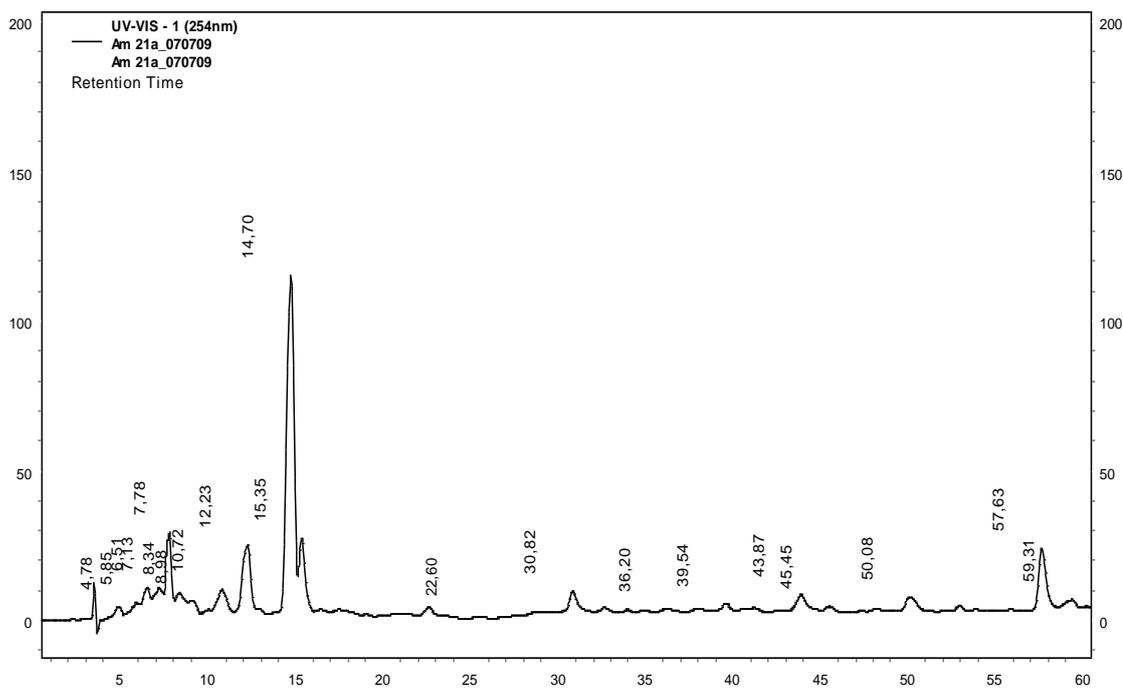
Amostra	Massa (g)			Abs. 750 nm			Média	± DP	CV%
VI	2.5434	2.8058	2.6725	0.062	0.067	0.068	9.86	0.30	3.06
VII	2.8217	2.5436	2.5903	0.149	0.127	0.128	18.66	0.53	2.85
VIII	2.8696	2.8444	2.5268	0.044	0.045	0.035	6.60	0.24	3.62
IX	2.6374	2.5347	2.5397	0.04	0.033	0.033	6.27	0.38	6.09
X	2.559	2.6756	2.7664	0.037	0.036	0.039	6.31	0.21	3.27
XI	2.5718	2.5315	2.8252	0.087	0.082	0.095	12.80	0.23	1.78
XII	2.5135	2.5761	2.6057	0.039	0.049	0.047	7.55	0.58	7.71
XIII	1.8138	1.4997	1.6643	0.032	0.026	0.027	8.32	0.33	3.96
XIV	2.5828	2.8114	2.9404	0.033	0.044	0.045	6.44	0.44	6.78
XV	2.6676	2.6102	2.9515	0.019	0.017	0.023	3.96	0.12	3.13
XVI	2.7228	2.5437	2.7598	0.057	0.055	0.060	8.80	0.18	2.01

TABELA 4 - Flavonóides totais em mel (mg QE.100g⁻¹ mel) – Abelhas sem ferrão do estado da Bahia; equação da curva: $y = 0.0024x + 0.0028$; padrão: quercetina

Amostra	Massa (g)			Abs. a 510 nm			Média	± DP	CV%
VI	2.6552	2.8058	2.6725	0.009	0.010	0.009	4.01	0.23	5.73
VII	2.3730	2.5436	2.5903	0.019	0.019	0.020	11.02	0.38	3.48
VIII	2.8115	2.8444	2.5268	0.012	0.012	0.010	5.20	0.39	7.50
IX	2.2940	2.5347	2.5397	0.011	0.011	0.011	5.58	0.33	5.91
X	3.2908	2.6756	2.7664	0.014	0.012	0.013	5.85	0.26	4.41
XI	2.6347	2.5315	2.8252	0.010	0.010	0.011	4.71	0.14	3.05
XII	2.7612	2.5761	2.6057	0.003	0.003	0.003	0.13	0.00	3.68
XIII	2.9811	1.4997	1.6643	0.010	0.006	0.007	3.93	0.34	8.53
XIV	2.7441	2.8114	2.9404	0.006	0.006	0.006	1.88	0.07	3.49
XV	2.8220	2.6102	2.9515	0.006	0.006	0.006	1.91	0.12	6.27
XVI	2.6696	2.5437	2.7598	0.011	0.010	0.011	4.93	0.20	4.09

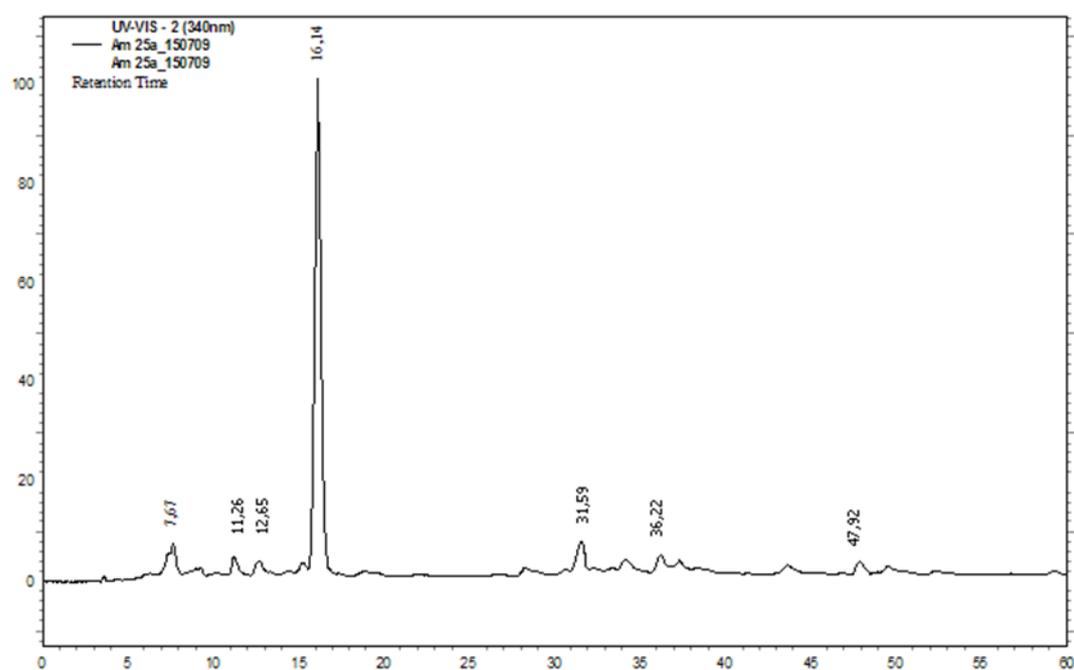
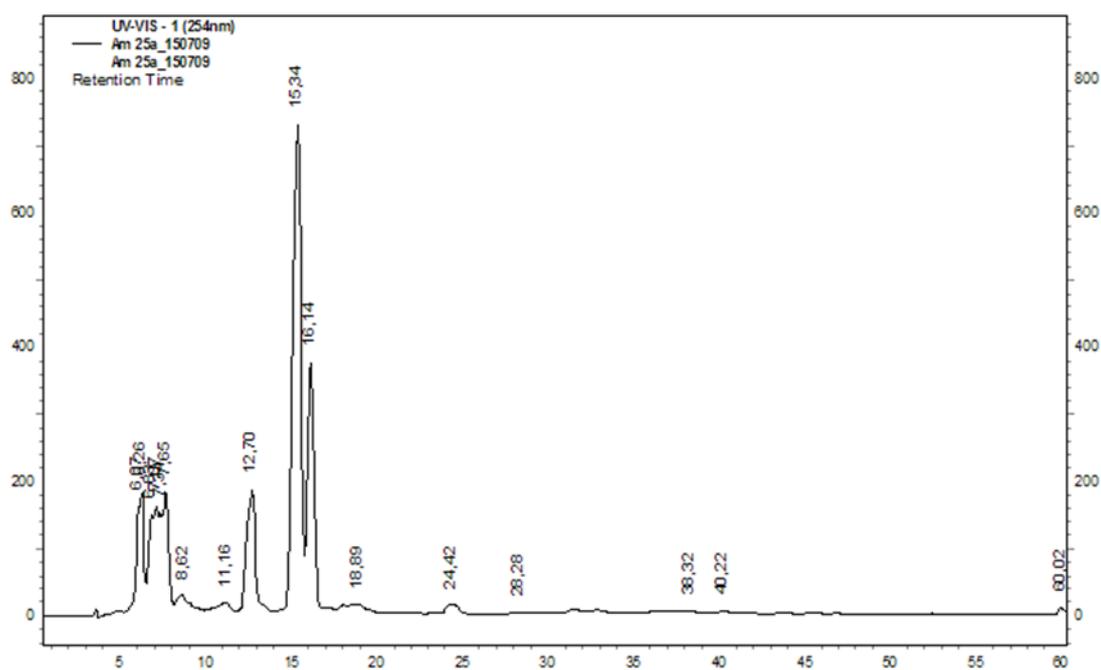
Abs. = absorbância; DP= Desvio padrão; CV= Coeficiente de variação.

FIGURA A1.1- Amostra 21 de mel de *Apis mellifera* do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340 nm.



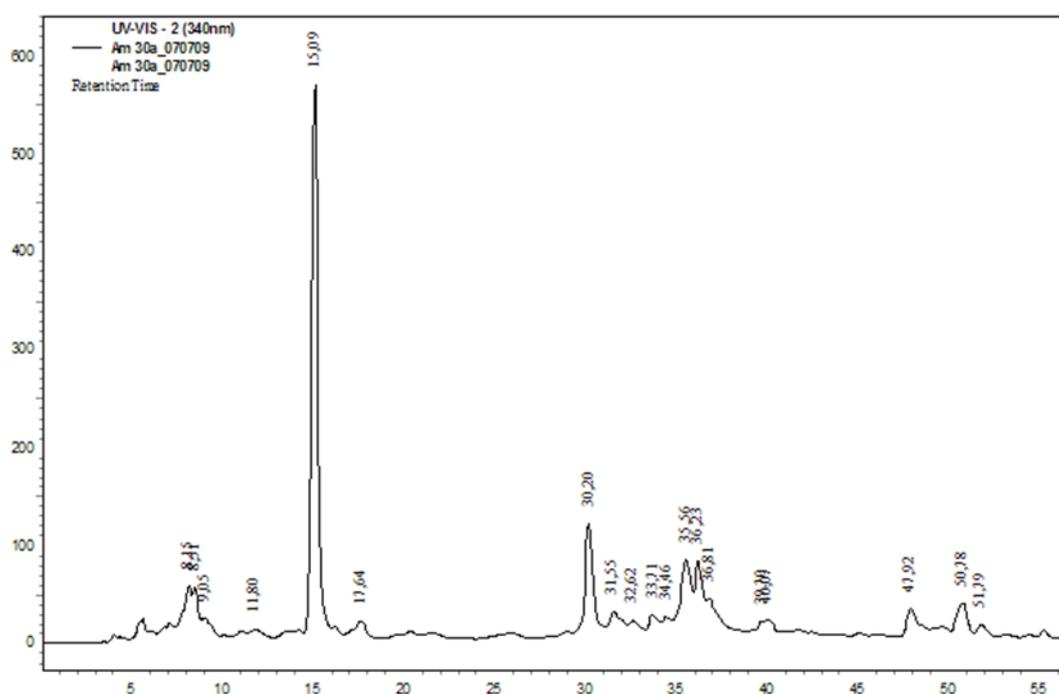
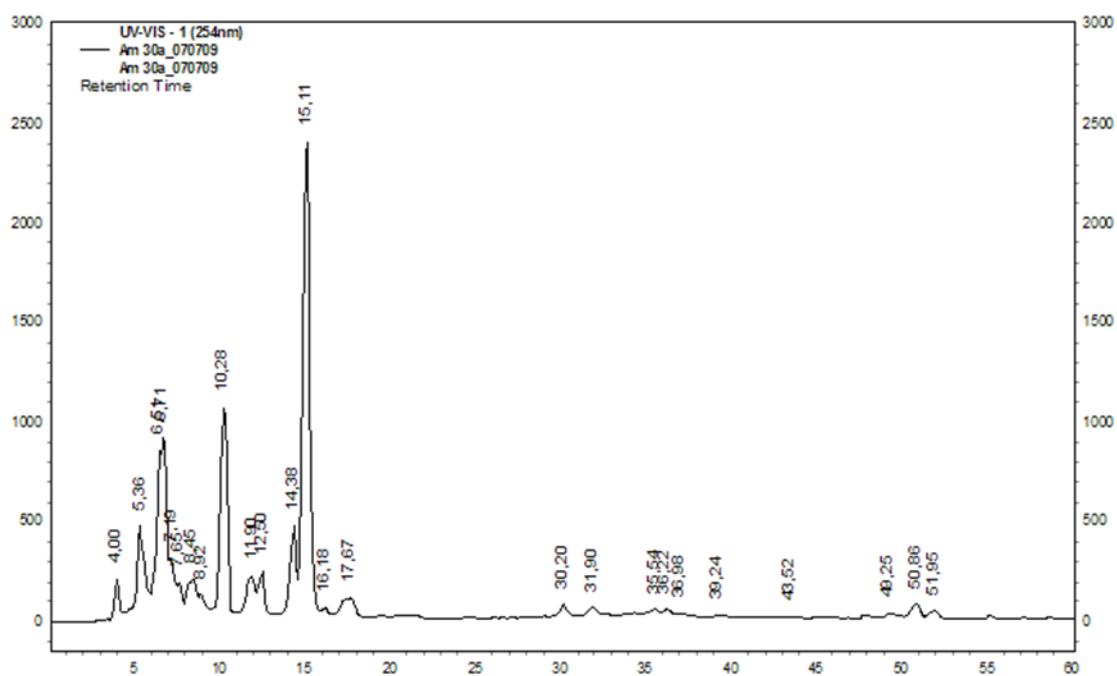
Ácido Gálico (3,49); ác.p-Cumárico (10,72); ác. Ferúlico (12,23); ác. Elágico (14,70); Luteolina (30,82); Pinocembrina (45,45); 3,6-Dihidroxiflavona (50,08).

FIGURA A1.2- Amostra 25 de mel de *Apis mellifera* do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340 nm.



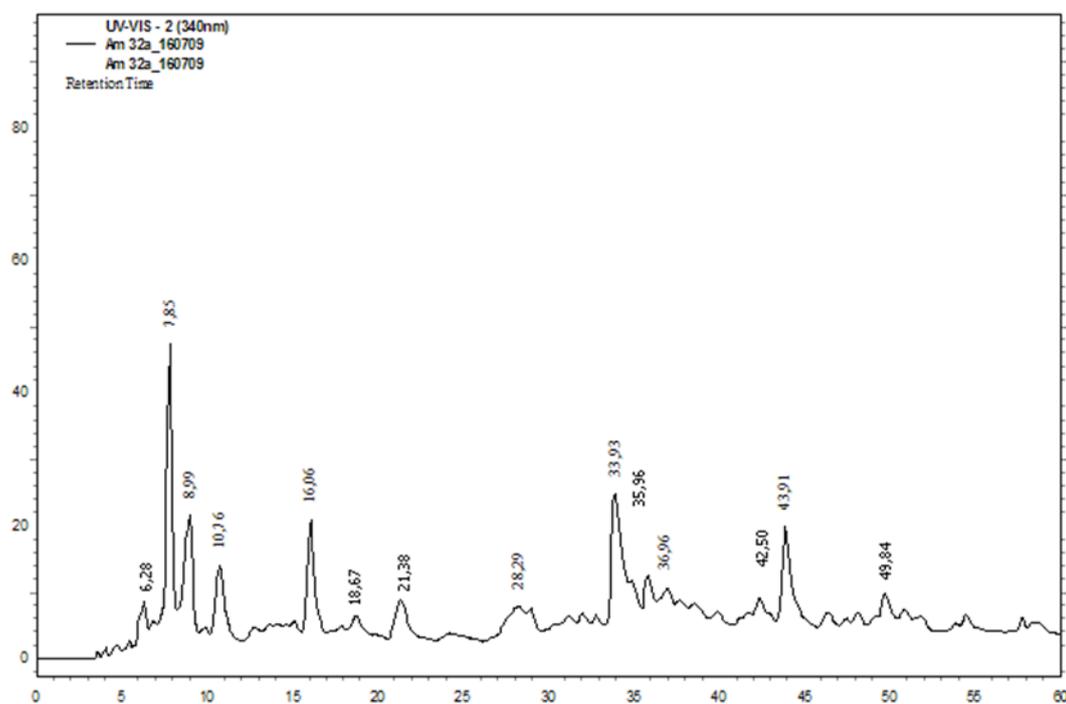
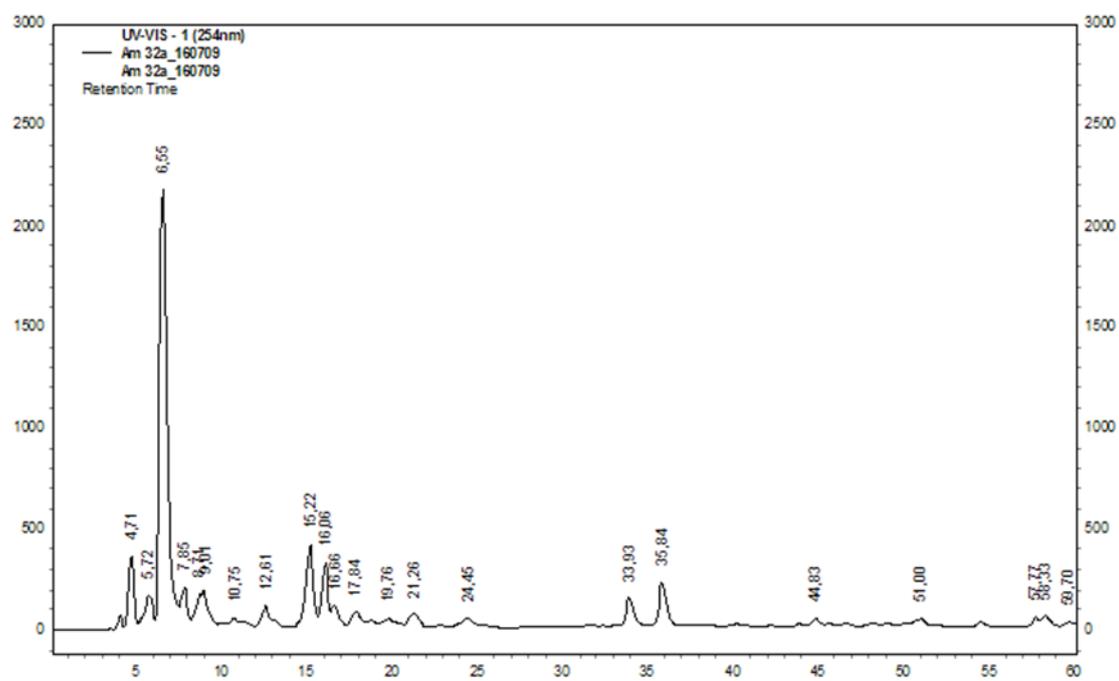
Ácido p-Cumárico (11,16); ác. Ferúlico (12,70); ác. Elágico (15,34); Rutina (16,14); Luteolina (31,59); 3,6-Dihidroxiflavona (47,92).

FIGURA A1.3- Amostra 30 de mel de *Apis mellifera* do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340 nm.



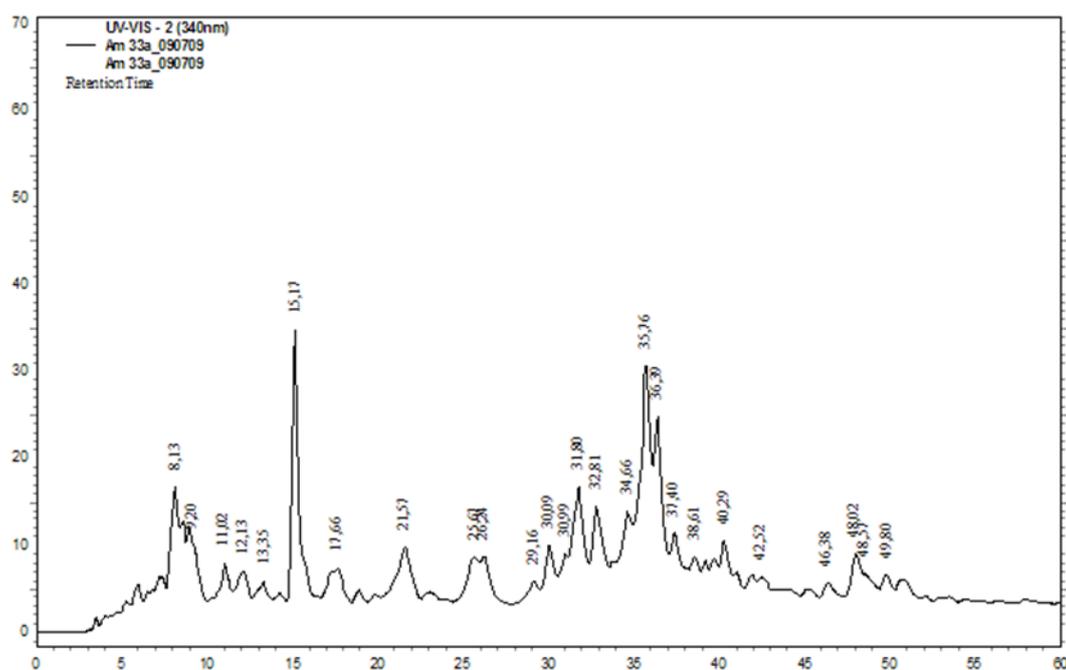
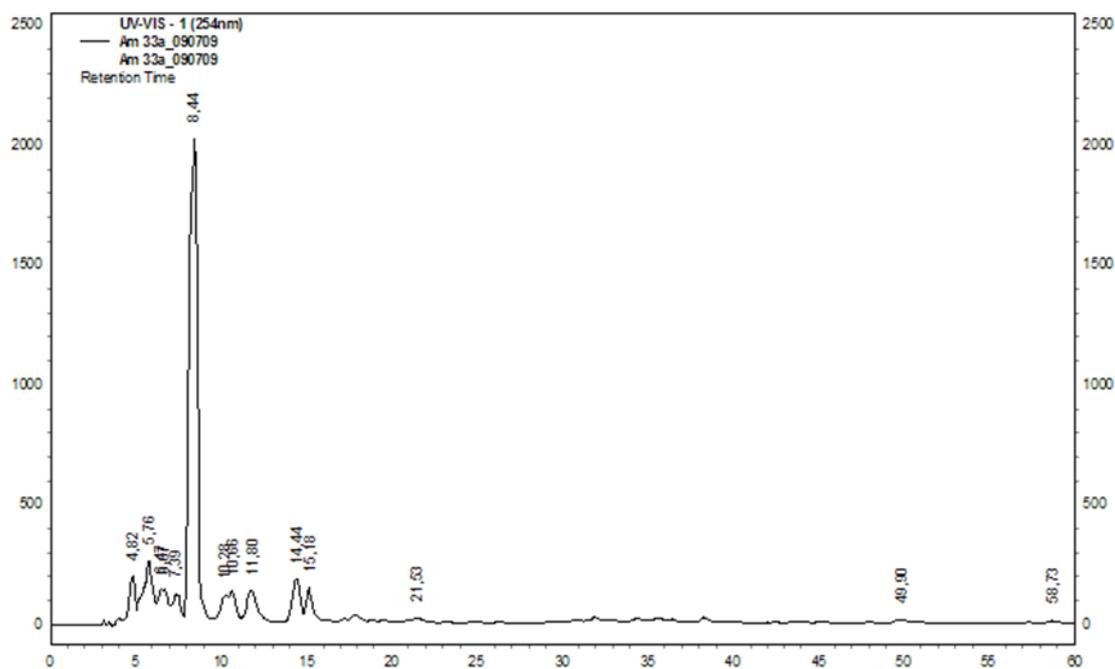
Ácido Gálico (4,00); ác.p-Cumárico (10,28);ác. Ferúlico (11,90); ác. Elágico (14,39); Rutina (15,09); Luteolina (30,20); Quercetina (31,55); 3,6-Dihidroxiflavona (47,92).

FIGURA A1.4- Amostra 32 de mel de *Apis mellifera* do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340 nm.



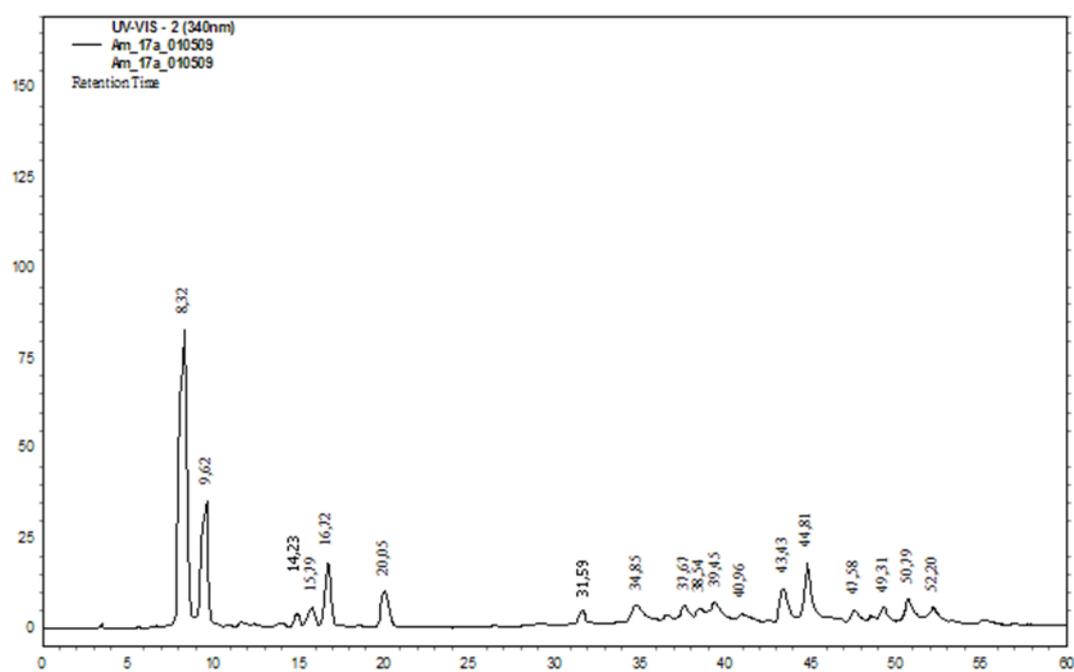
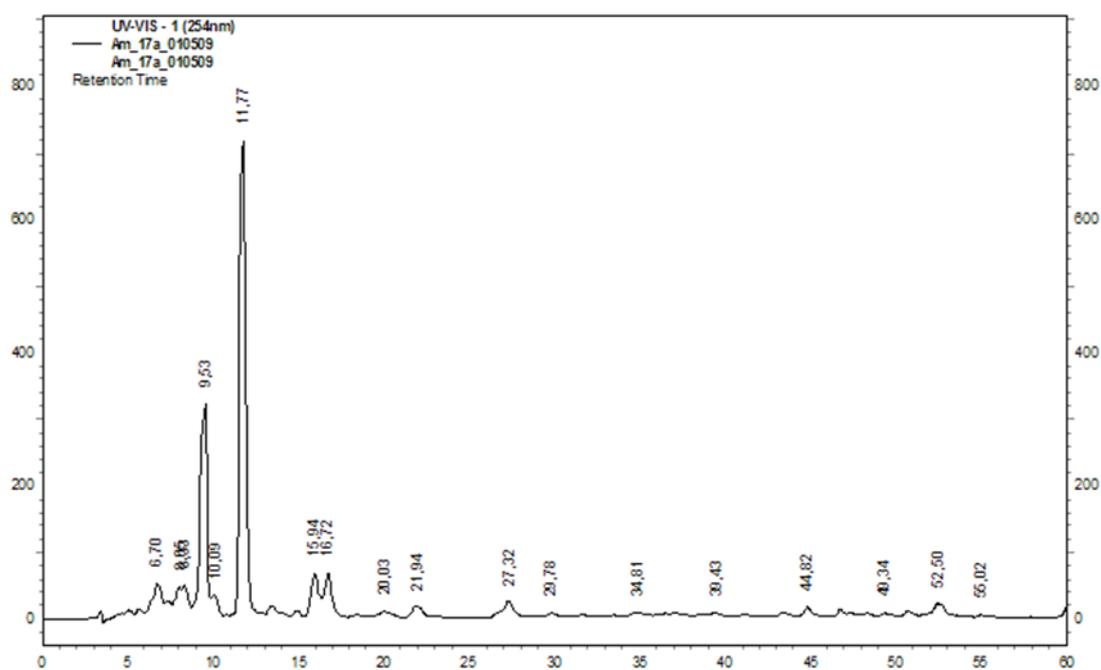
Ácido p-Cumárico (9,61); ác. Ferúlico (10,75), Rutina (16,06); Pinocembrina (42,50); crisina (43,91); 3,6-Dihidroxiflavona (49,84).

FIGURA A1.5 - Amostra 33 de mel de *Apis mellifera* do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340 nm.

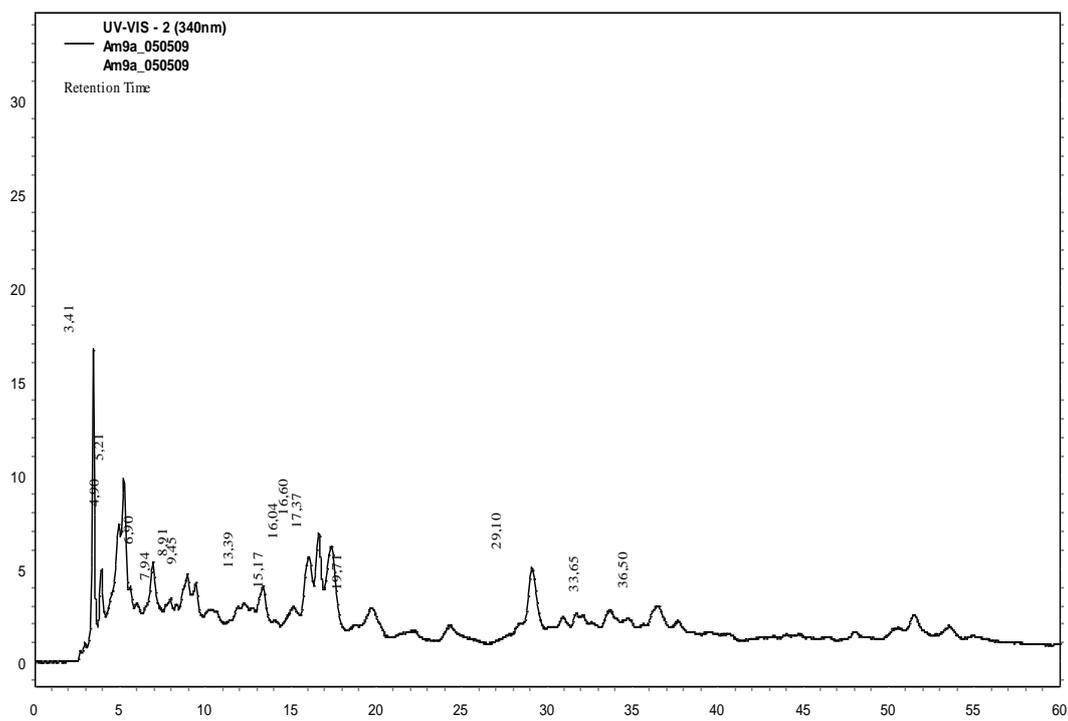
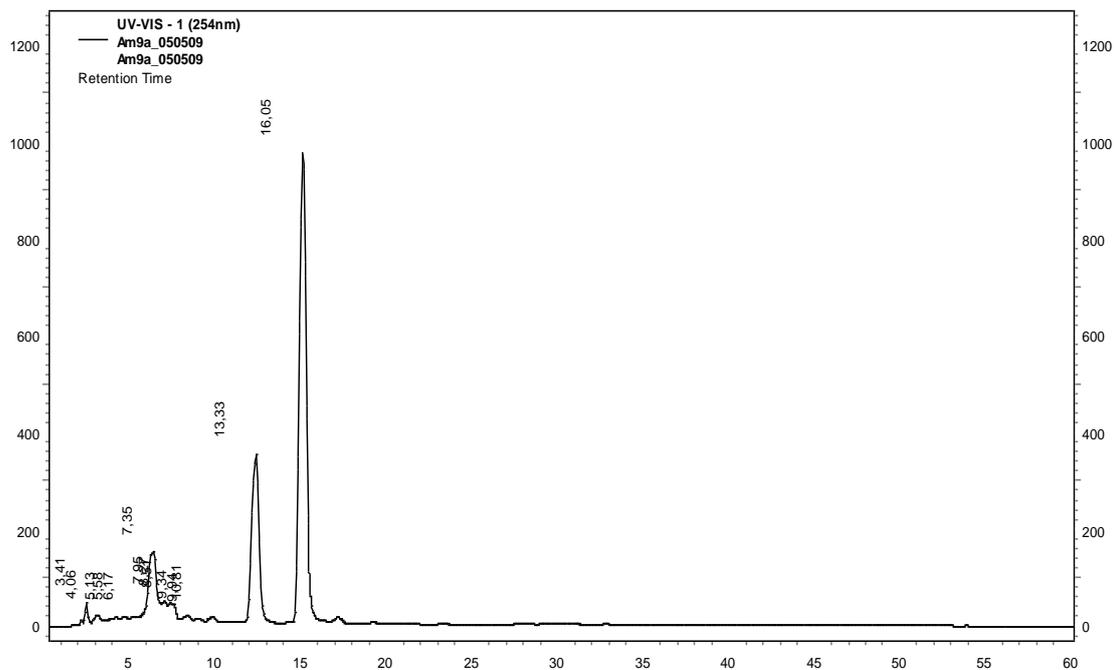


Ácido p-Hidroxibenzoico (4.82); ác. Vanílico (8.44); ác. p-Cumárico (11.02); Ác. Ferúlico (12.13; Rutina (15.17); Pinocembrina (42.52); 3,6-Dihidroxiflavona (49.80).

FIGURA A1.6- Amostra 17 de mel de *Apis mellifera* do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340 nm.

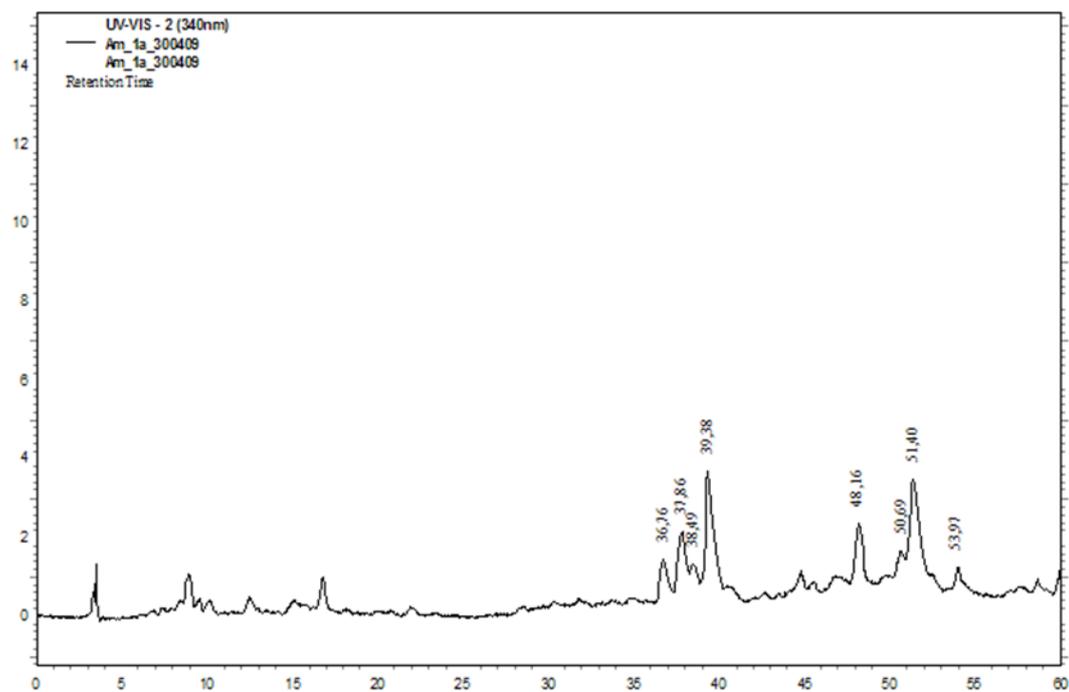
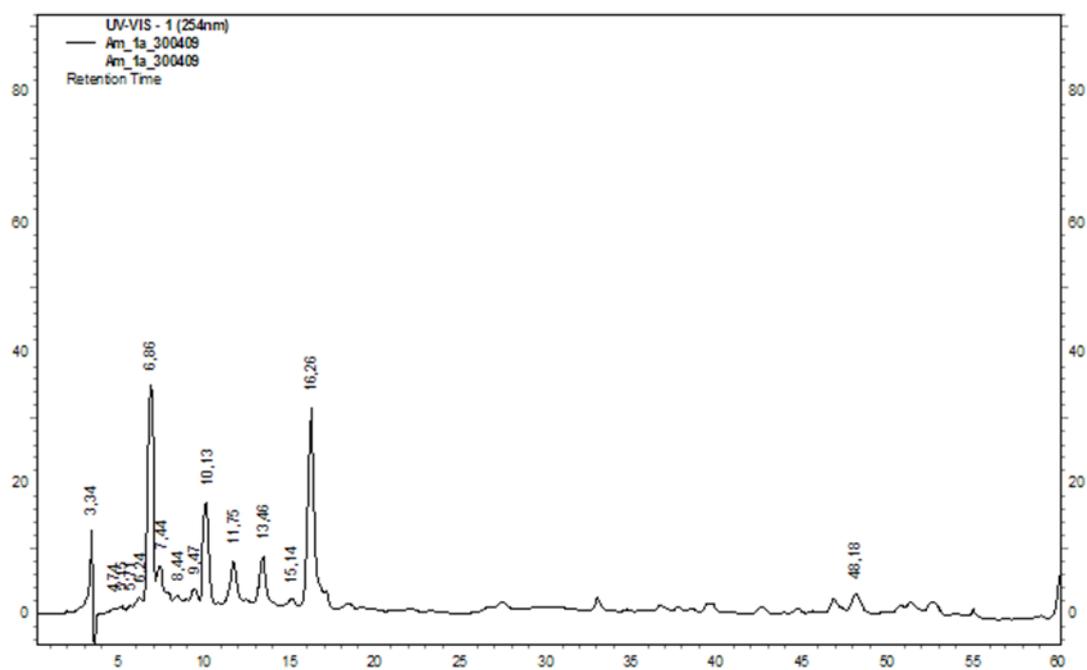


Ácido p-Cumárico (9,53); ác. Ferúlico (11,77); Rutina (16,72); Quercetina (31,59); Pinocembrina (44,82).

FIGURA A 1.7- Amostra 9 de mel de *Apis mellifera* do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados

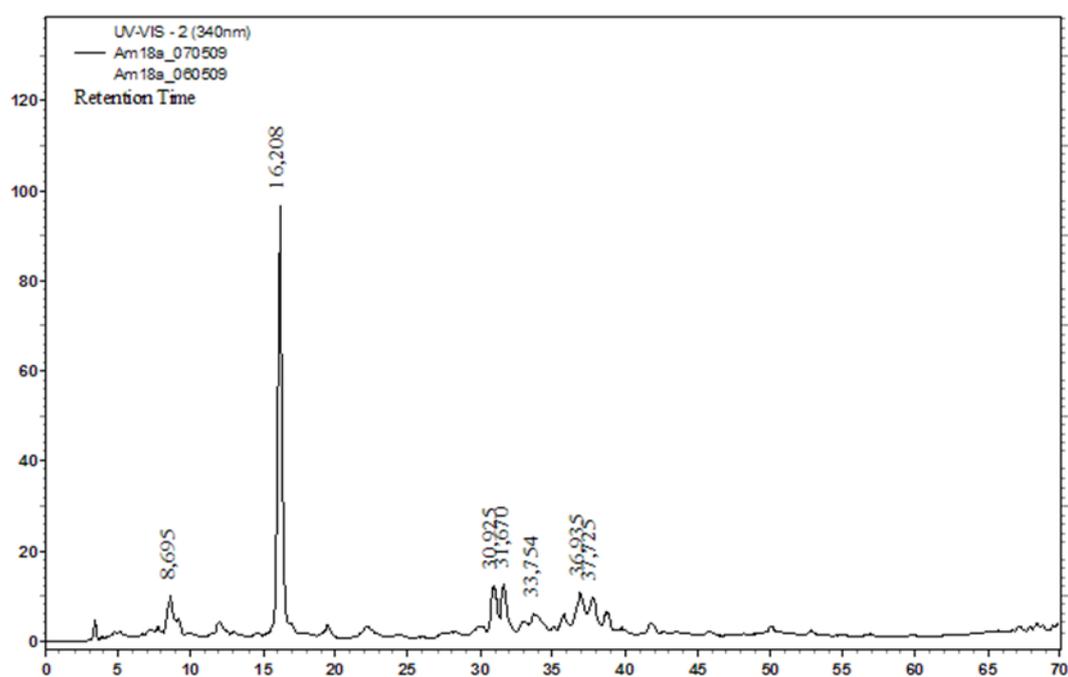
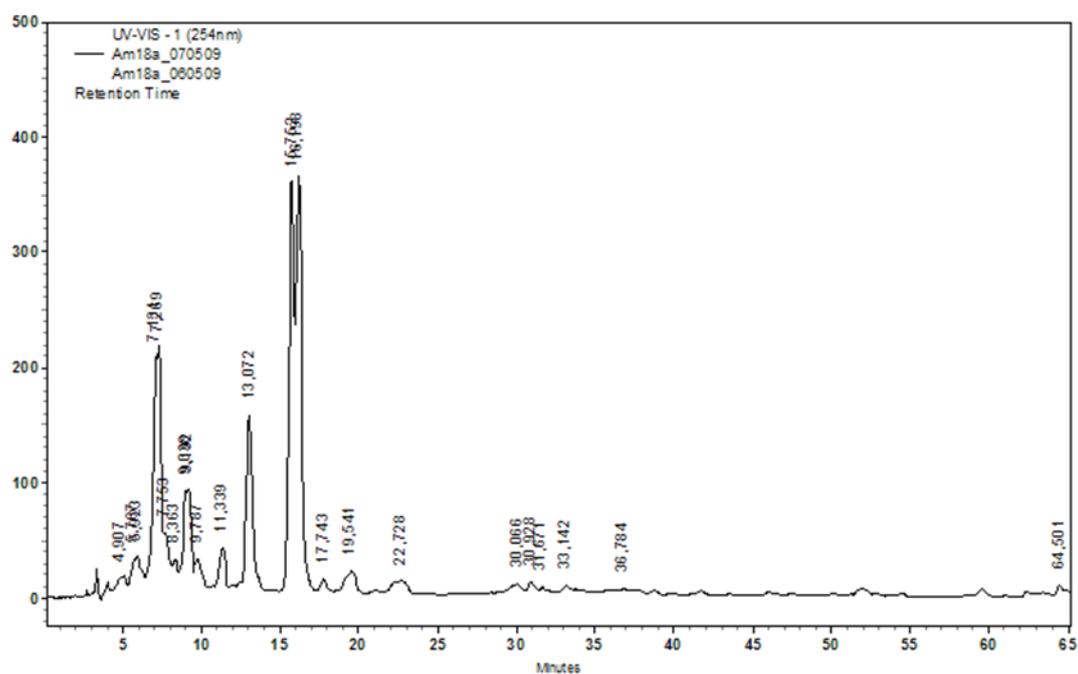
Ácido Gálico (3,41); ác. p-Cumárico (8,91); ác. Ferúlico (9,45); Luteolina (31,45).

FIGURA A1.9- Amostra 1 de mel de *Apis mellifera* do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340 nm.



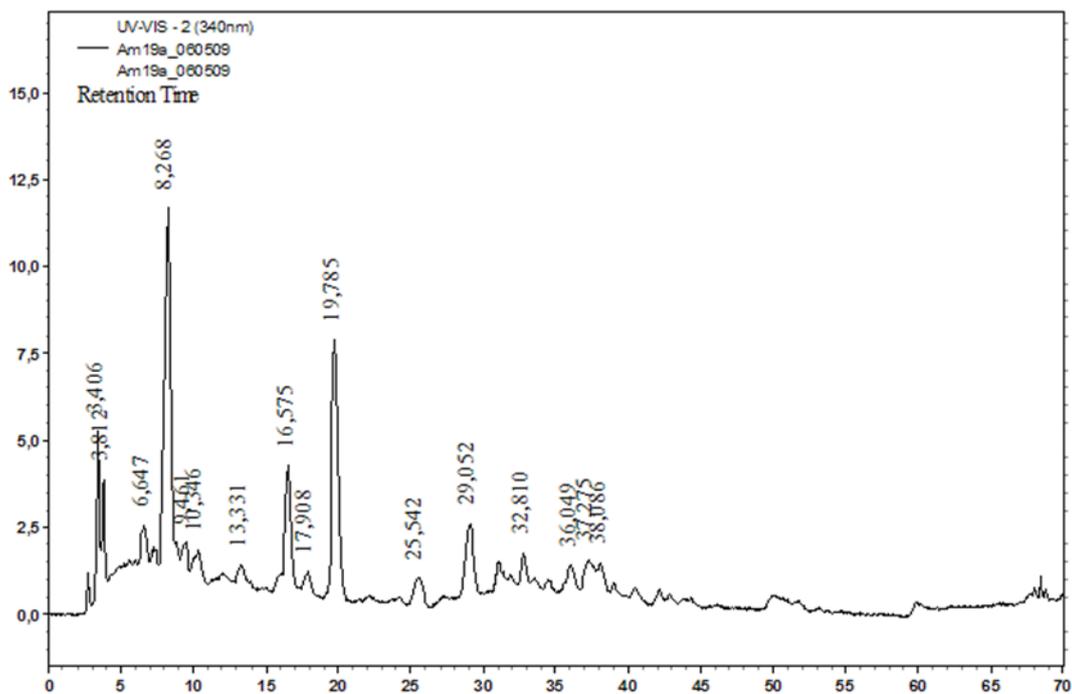
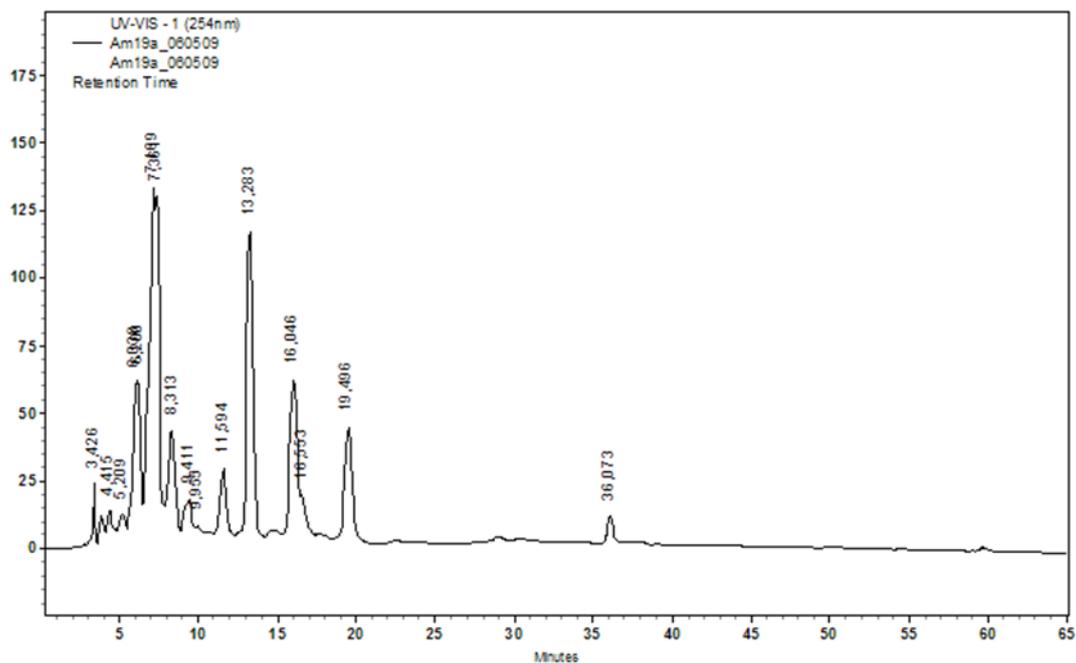
Ácido p-Cumárico (10,13); ácido Ferúlico (11,75); Rutina (16,26) 3,6-Dihidroxiflavona (48,16).

FIGURA A1.10- Amostra 18 de mel de *Apis mellifera* do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340 nm.



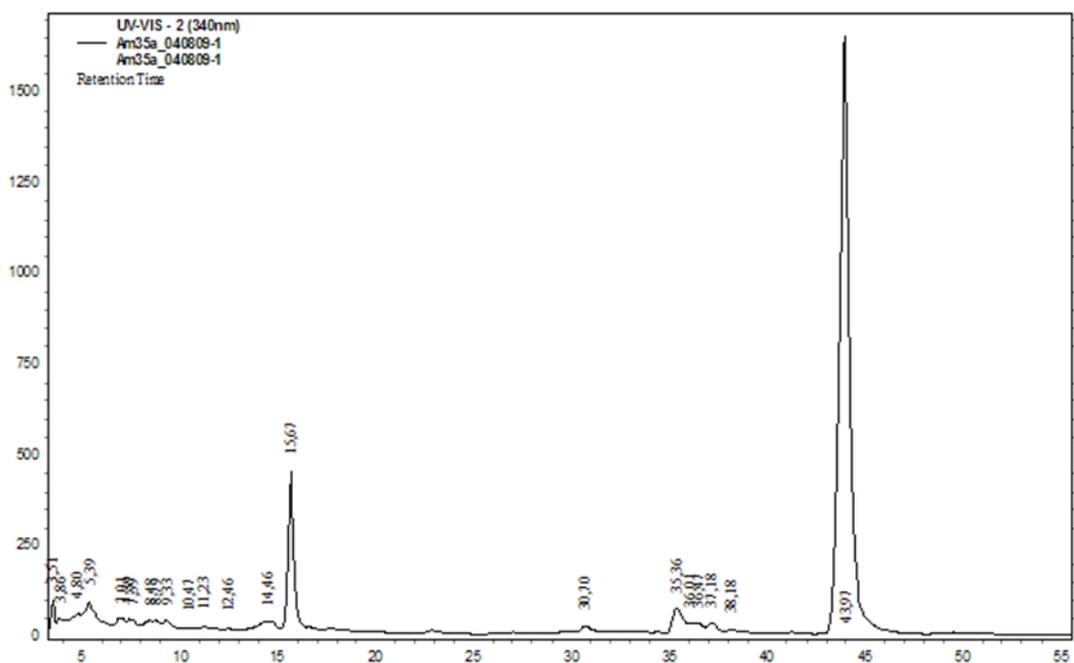
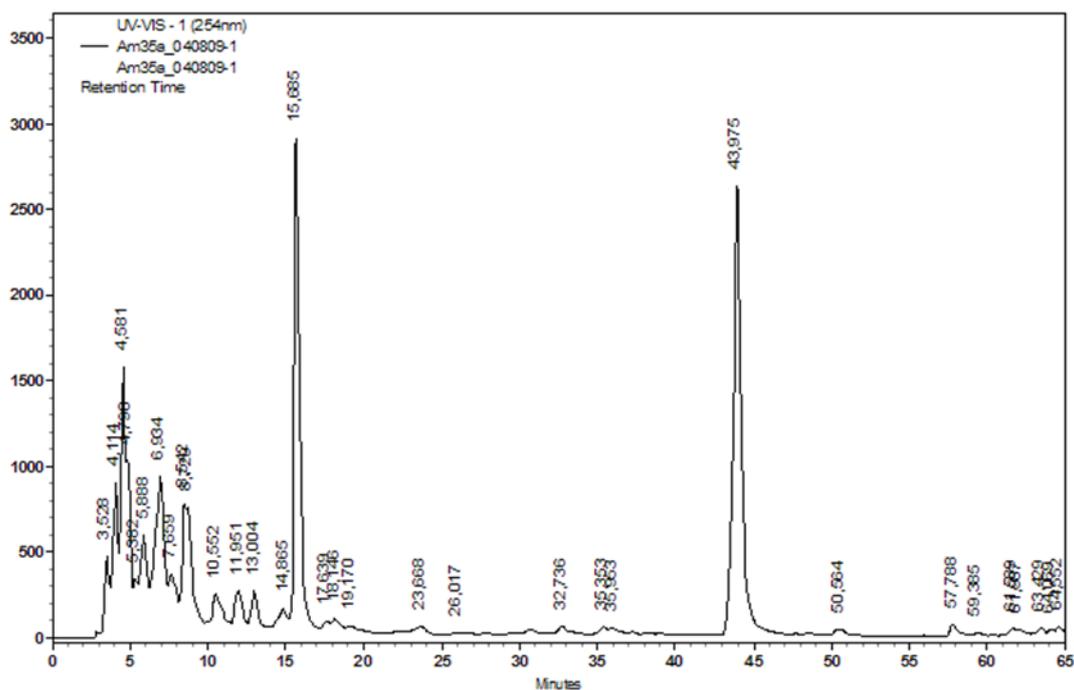
Ácido p-Cumárico (9,79); ác. Ferúlico (11,34); Rutina (16,21); Luteolina (31,67).

FIGURA A1.11- Amostra 19 de mel de *Apis mellifera* do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340 nm.



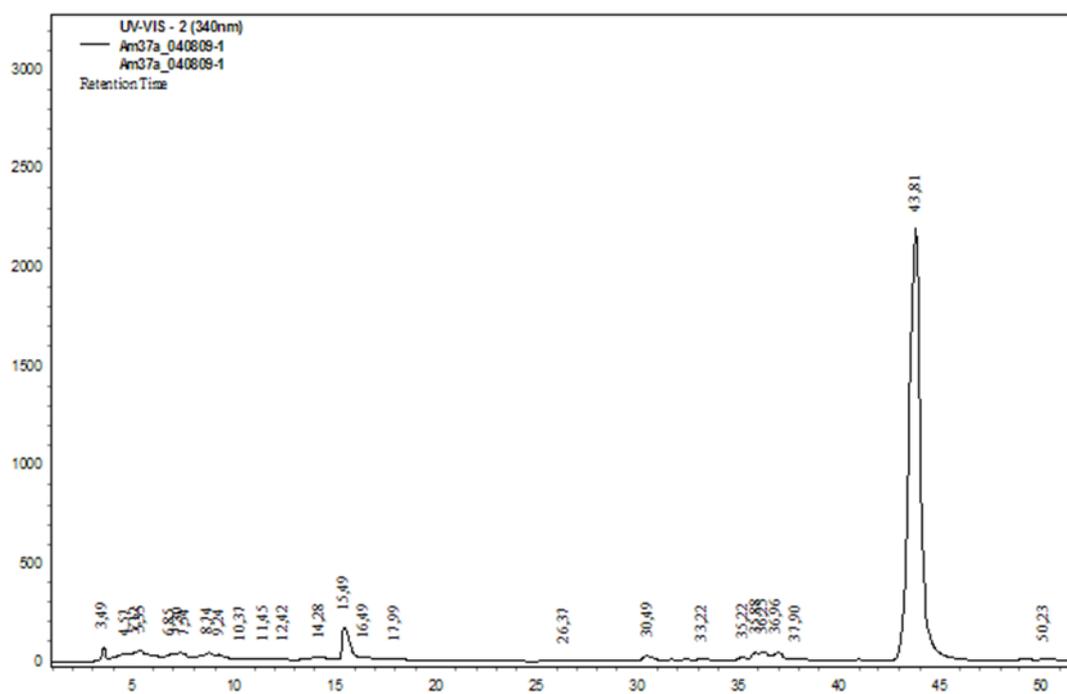
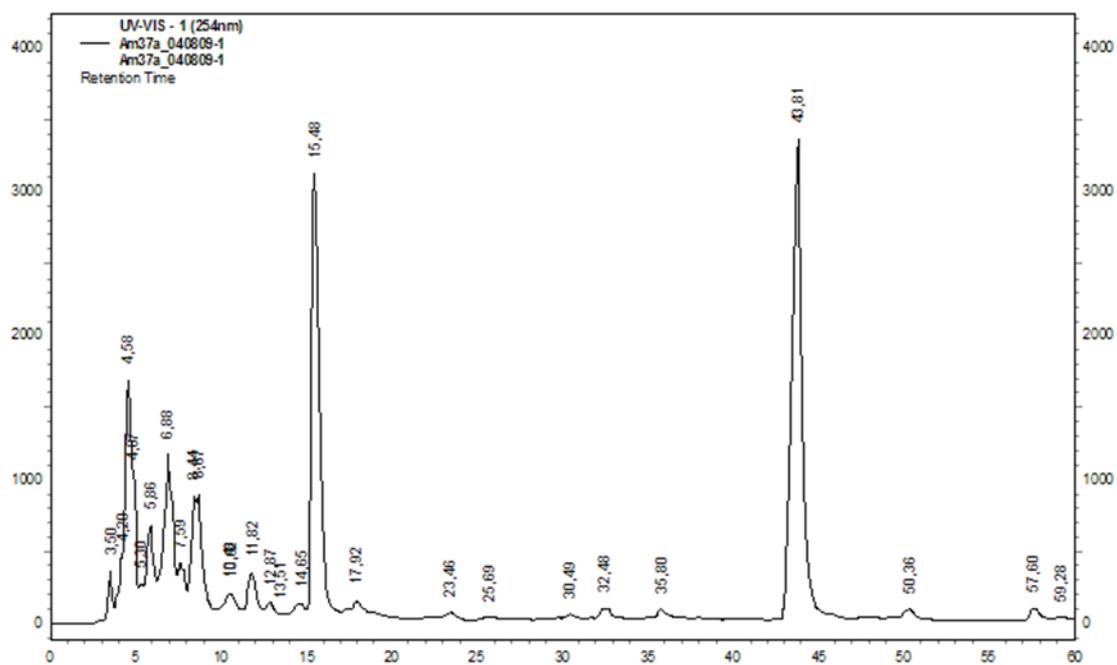
Ácido Gálico (3,43); ác. P-Cumárico (9,41); ác. Ferúlico (11,59).

FIGURA A1.12- Amostra 35 de mel de *Apis mellifera* do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340 nm.



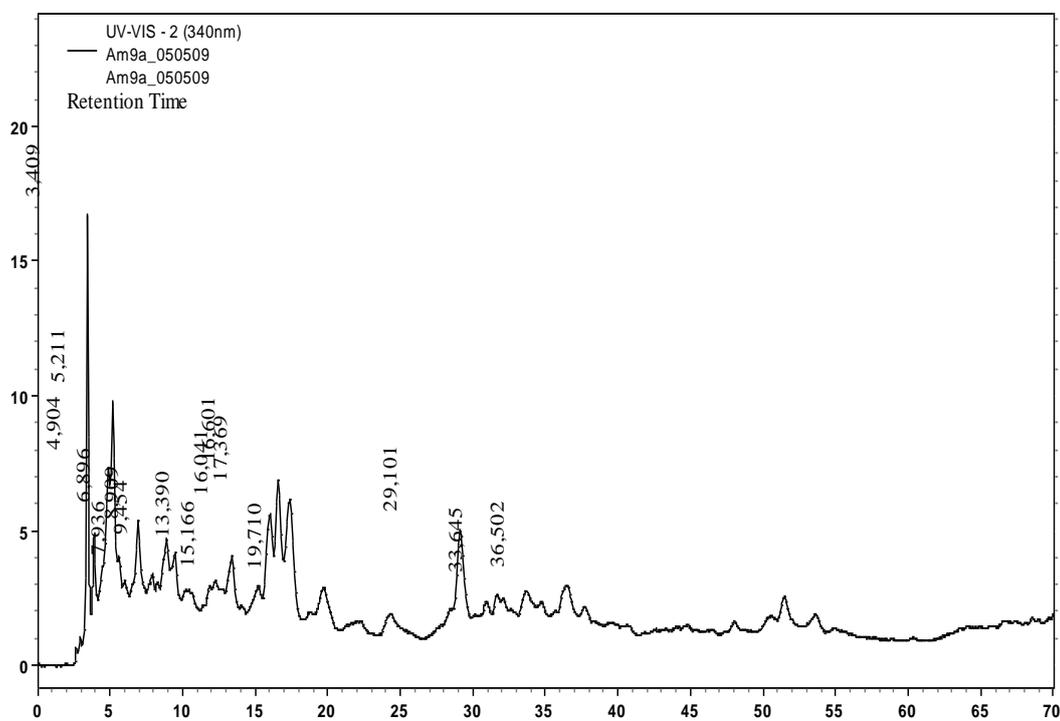
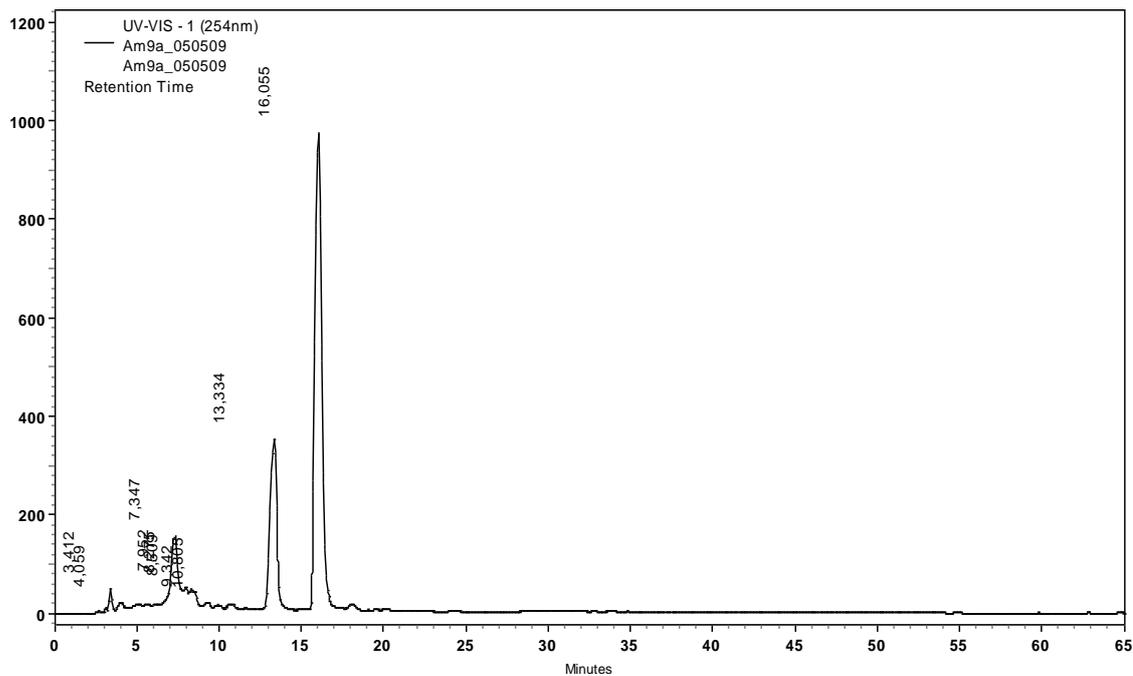
Ácido Gálico (3,52); ác. P-Cumárico (10,55); ác. Ferúlico (11,95); ác. Elágico (14,46); Quercetina (30,70); Crisina (43,97).

FIGURA A1.13- Amostra 37 de mel de *Apis mellifera* do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340 nm.



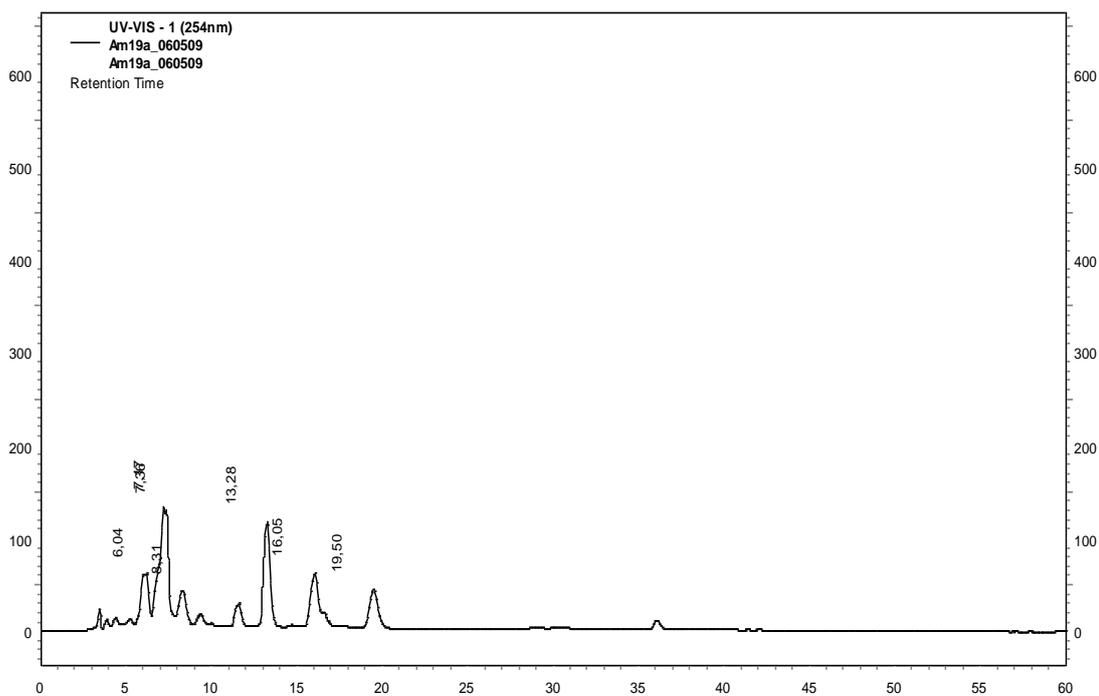
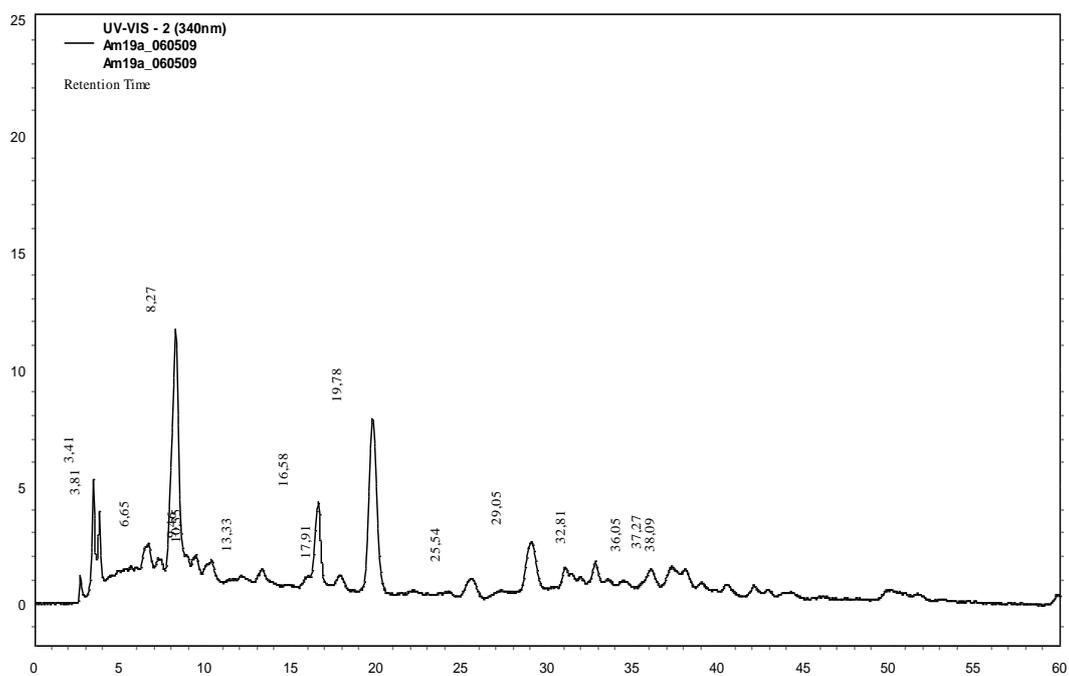
Ácido Gálico (3,49); ác. P-Cumárico (10,37); ác. Férúlico (11,45); Pinocembrina(43,81).

FIGURA A1.14- Amostra 9 de mel de *Apis mellifera* do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340 nm.



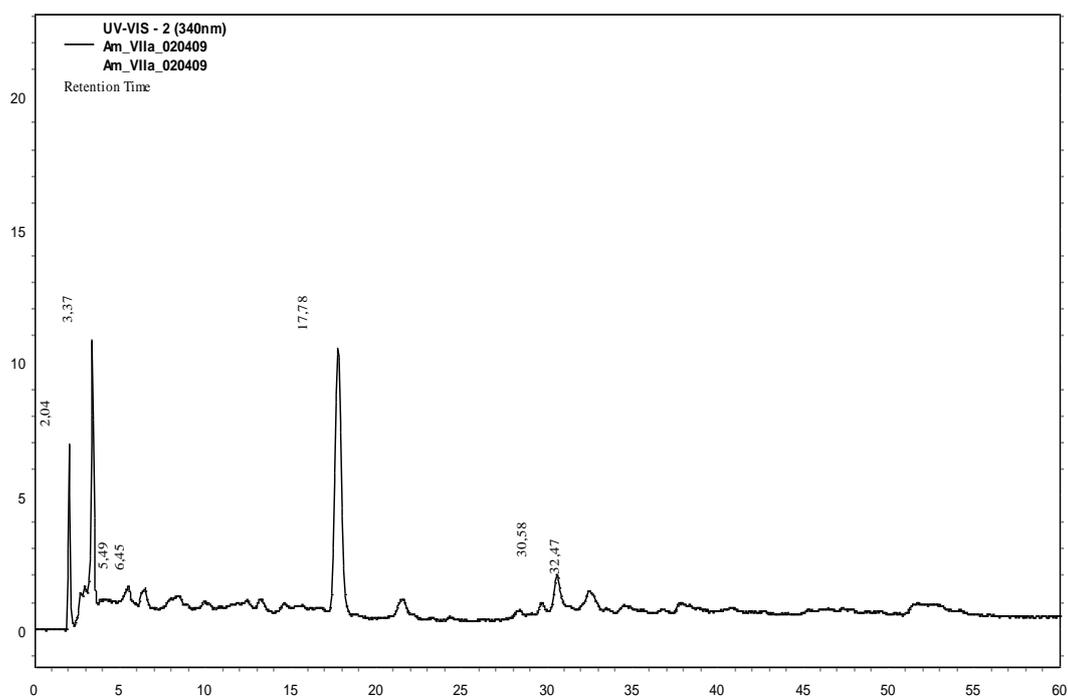
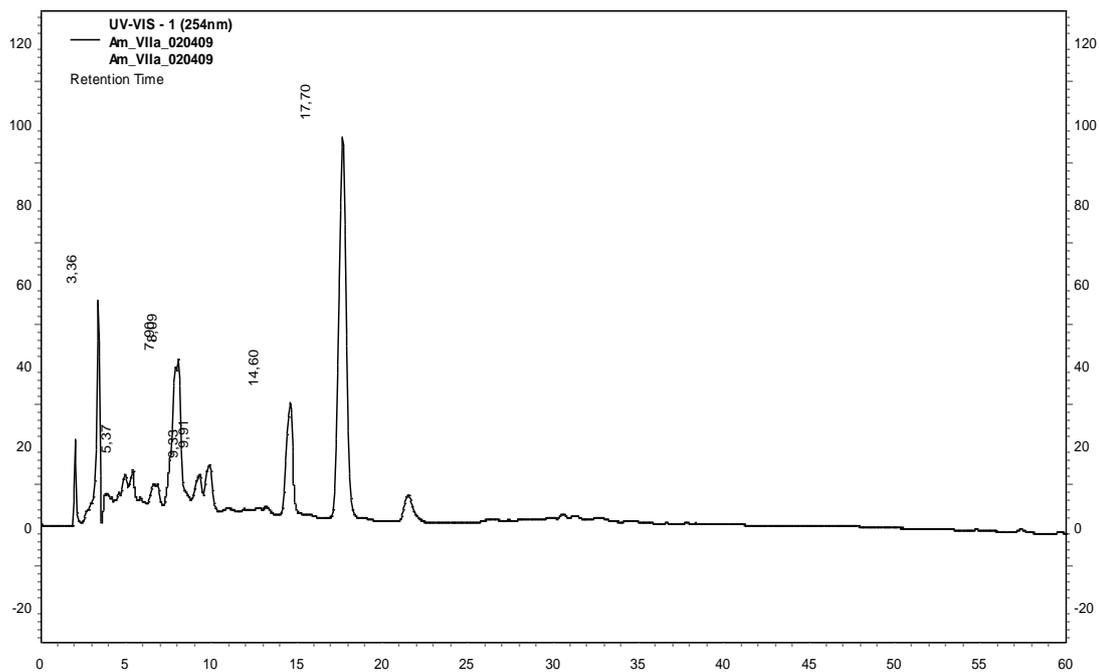
Ácido Gálico (3,41); ácido p-Cumárico (8,91); ácido Ferúlico (9,45).

FIGURA A1.15- Amostra 19 de mel de *Apis mellifera* do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340 nm.



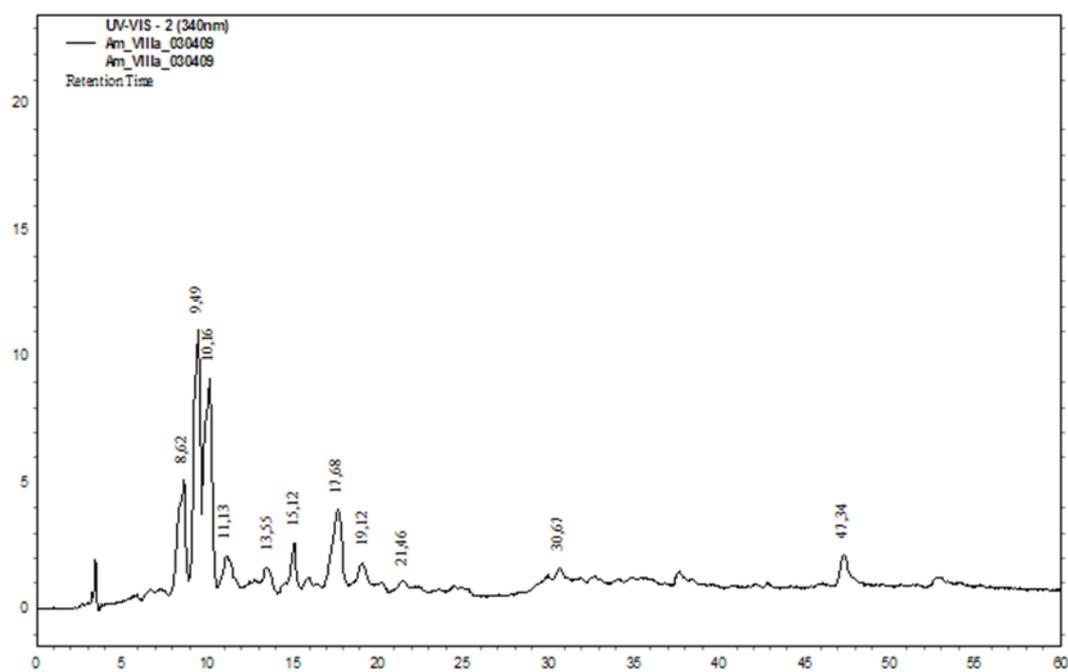
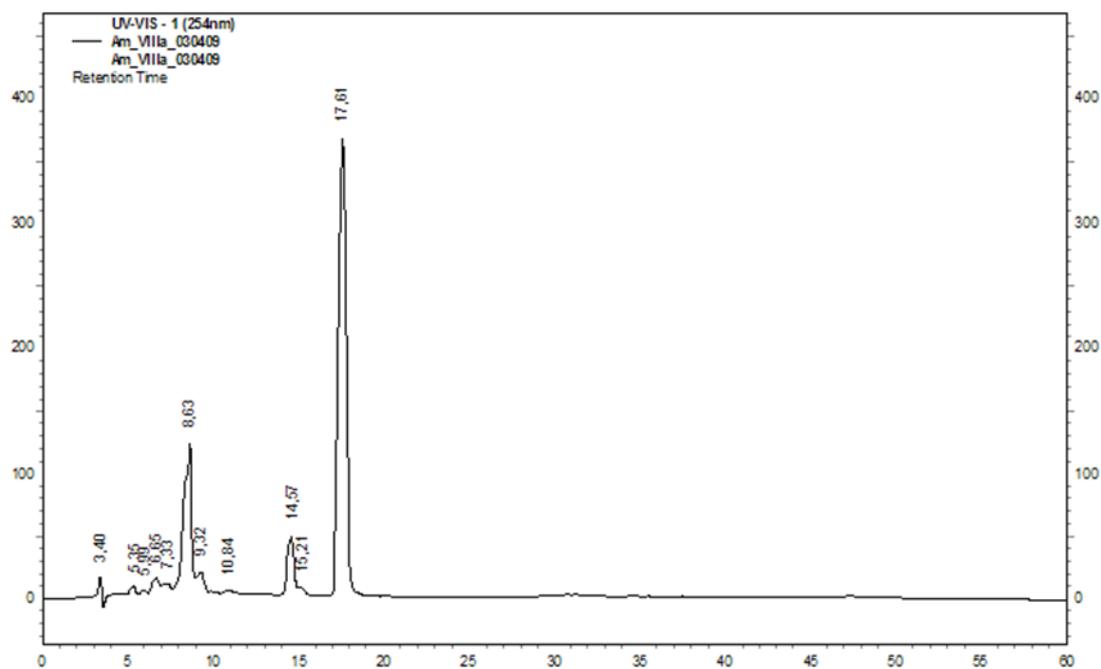
Ácido Gálico (3,41); ác. P-Cumárico (9,46); ác. Ferúlico (10,35).

FIGURA A1.16- Amostra VII de mel de abelhas sem ferrão do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340 nm.



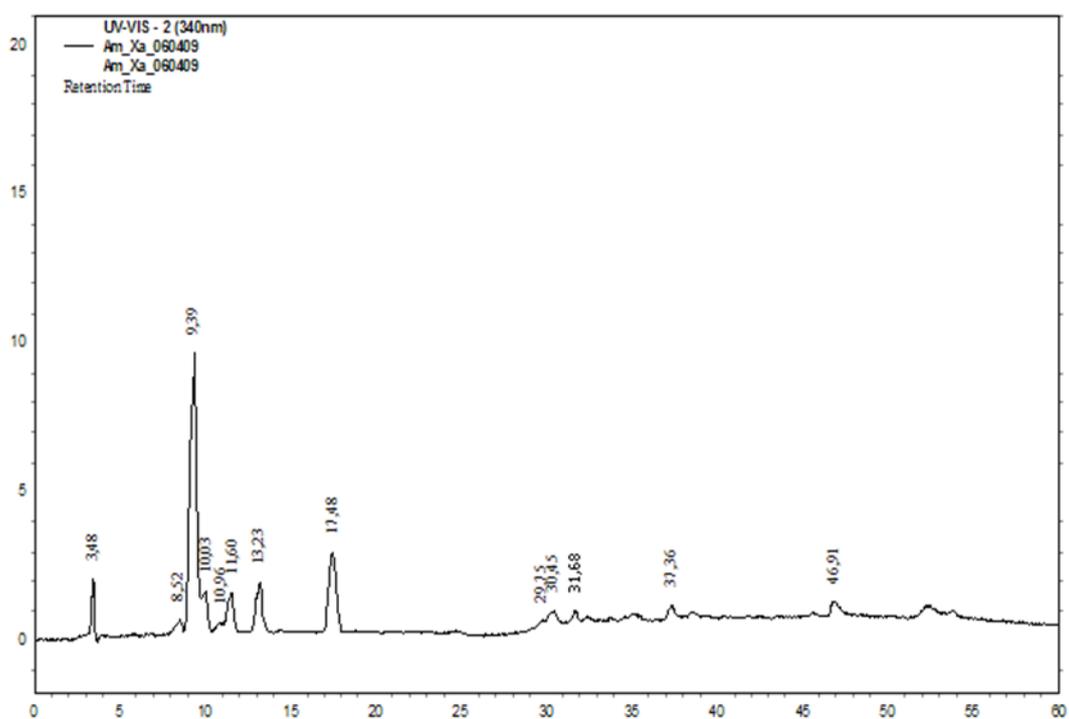
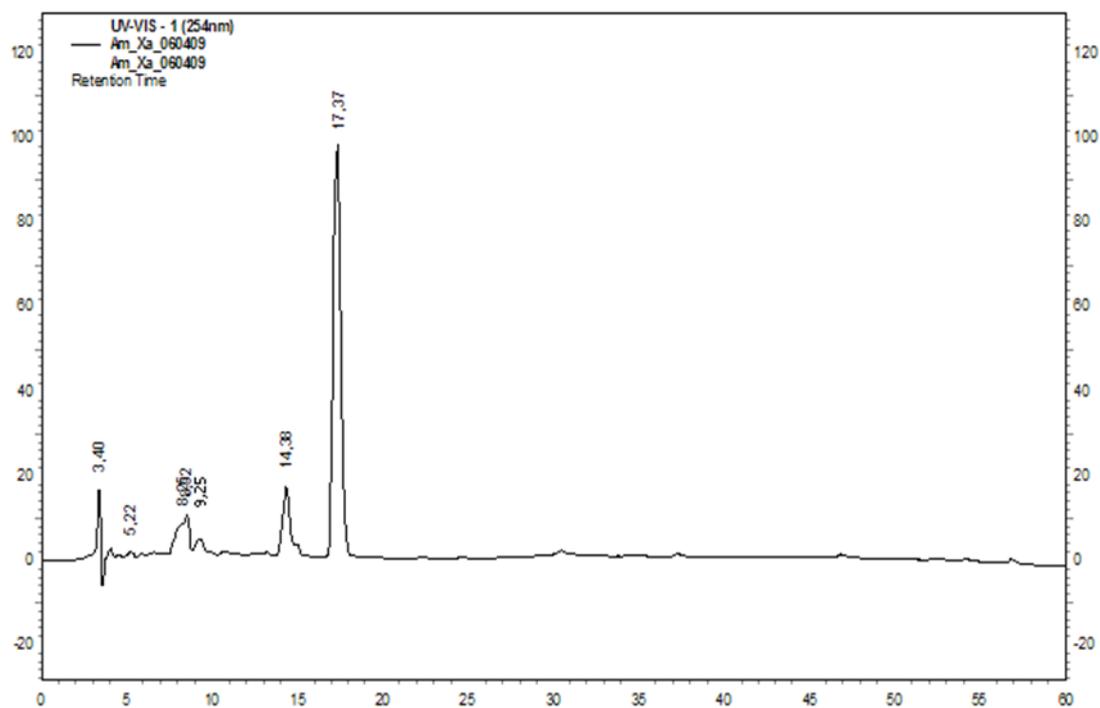
Ácido Gálico (3,37); ác. p-Cumárico (9,33); ác. Ferúlico (9,91); Luteolina (30,58).

FIGURA A1.17 - Amostra VIII de mel de abelhas sem ferrão do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340 nm.



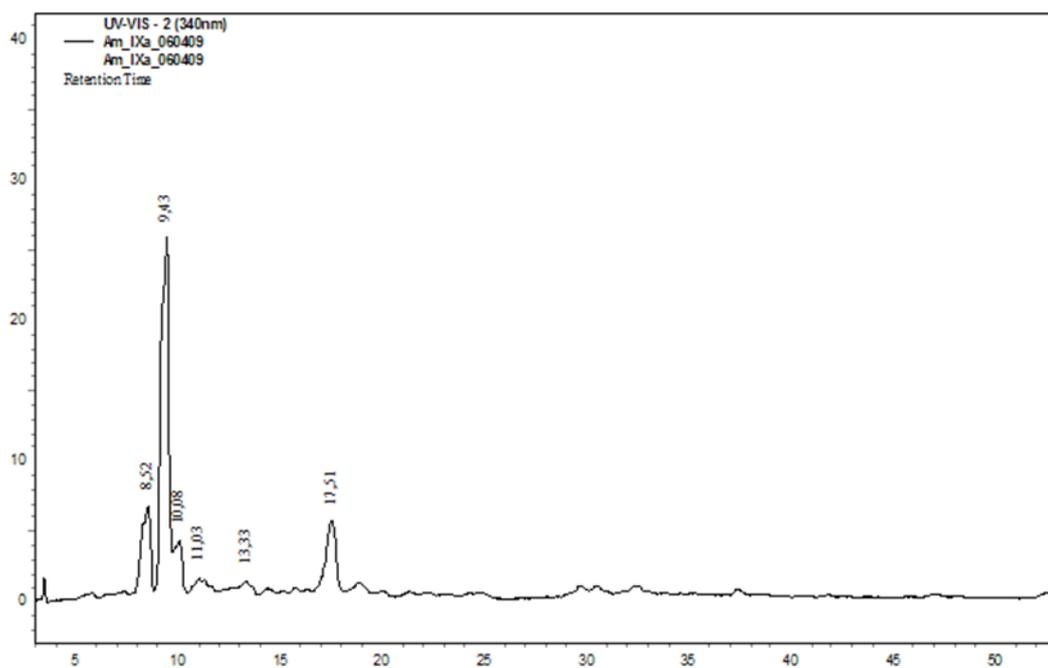
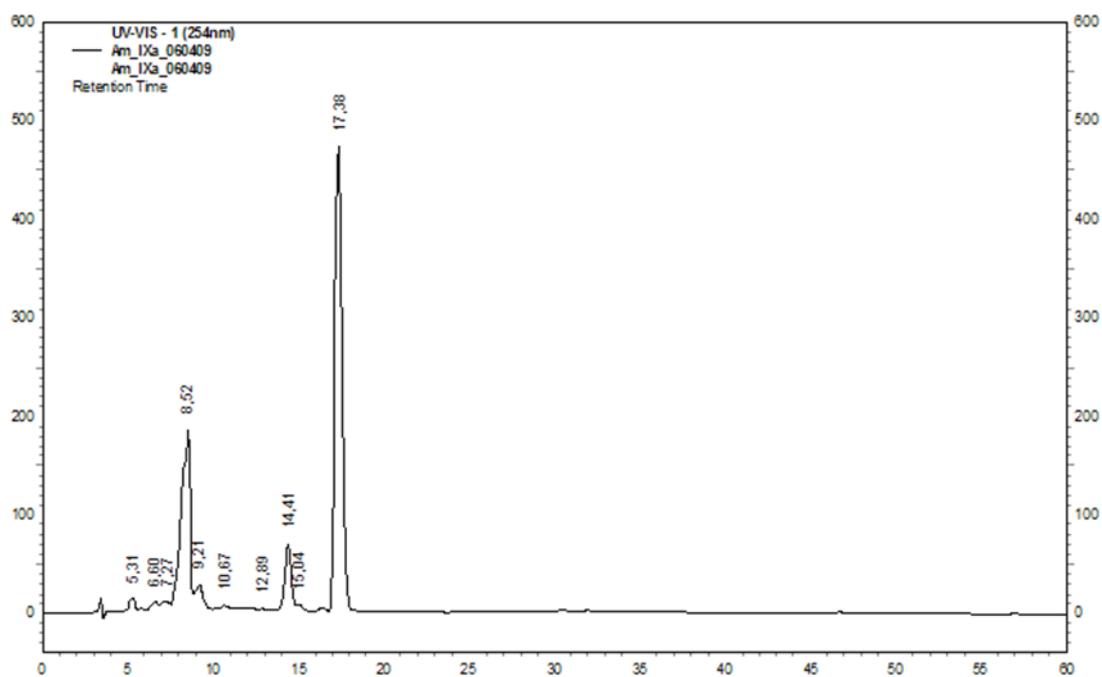
Ácido Gálico (3,40); ác. Vanílico (8,62); ác. P-Cumárico (9,49); ác. Ferúlico (10,16); Luteolina (30,57).

FIGURA A1.18- Amostra X de mel de abelhas sem ferrão do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340nm.



Ácido Gálico (3,48); ác. p-Cumárico (9,39); ác. Ferúlico (11,60); Luteolina (31,68).

FIGURA A1.19- Amostra IX de mel de abelhas sem ferrão do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340nm.



Ácido Vanílico (8.52); p-Cumárico (9.43); ác. Ferúlico (10.08).

FIGURA A1.20- Amostra XI de mel de abelhas sem ferrão do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340nm.

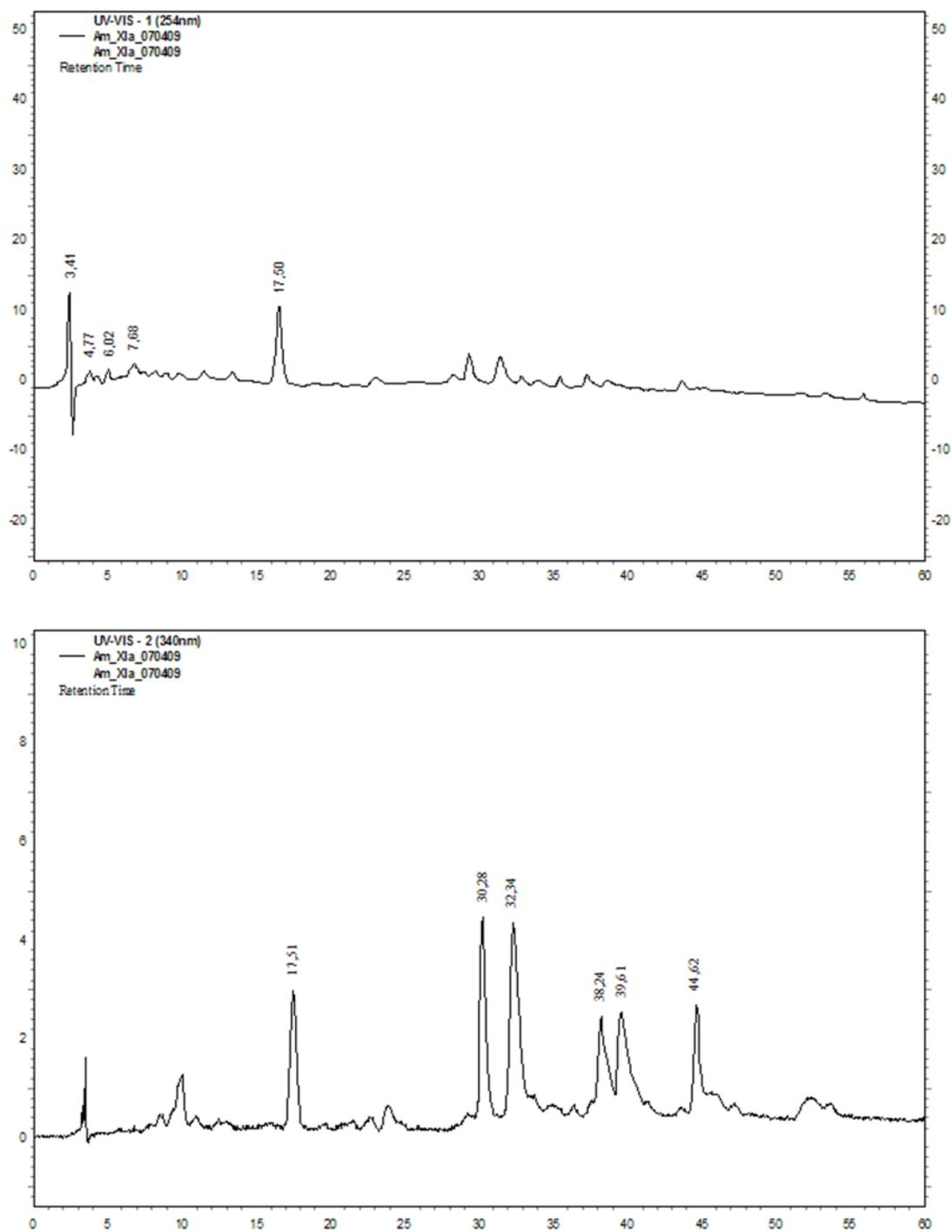
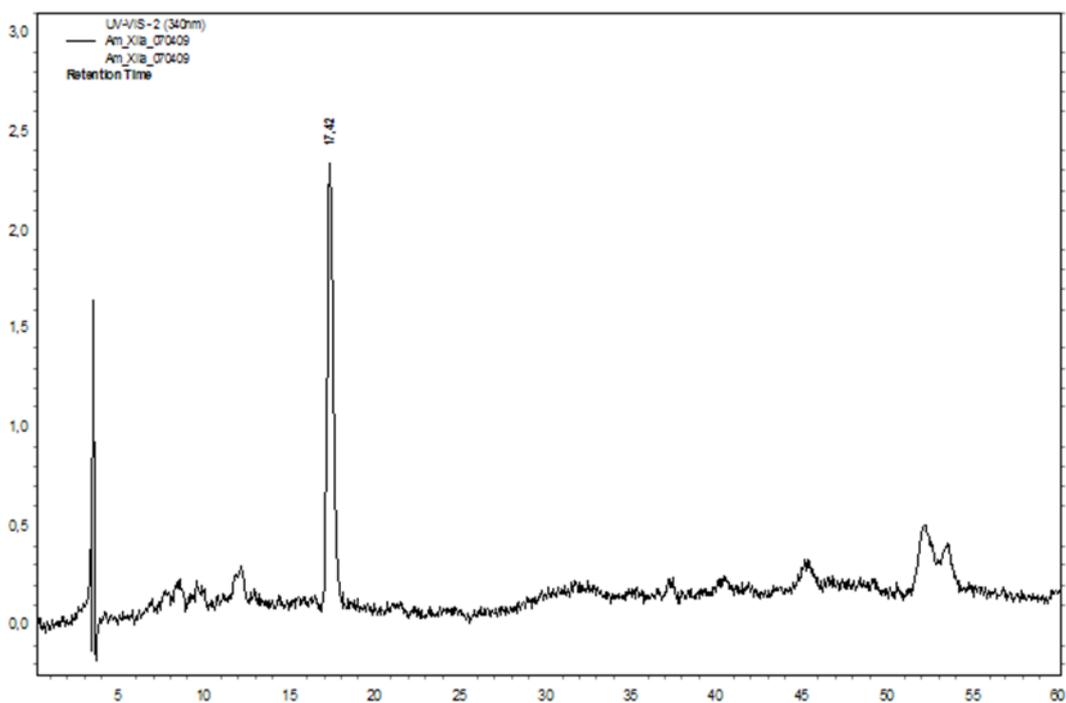
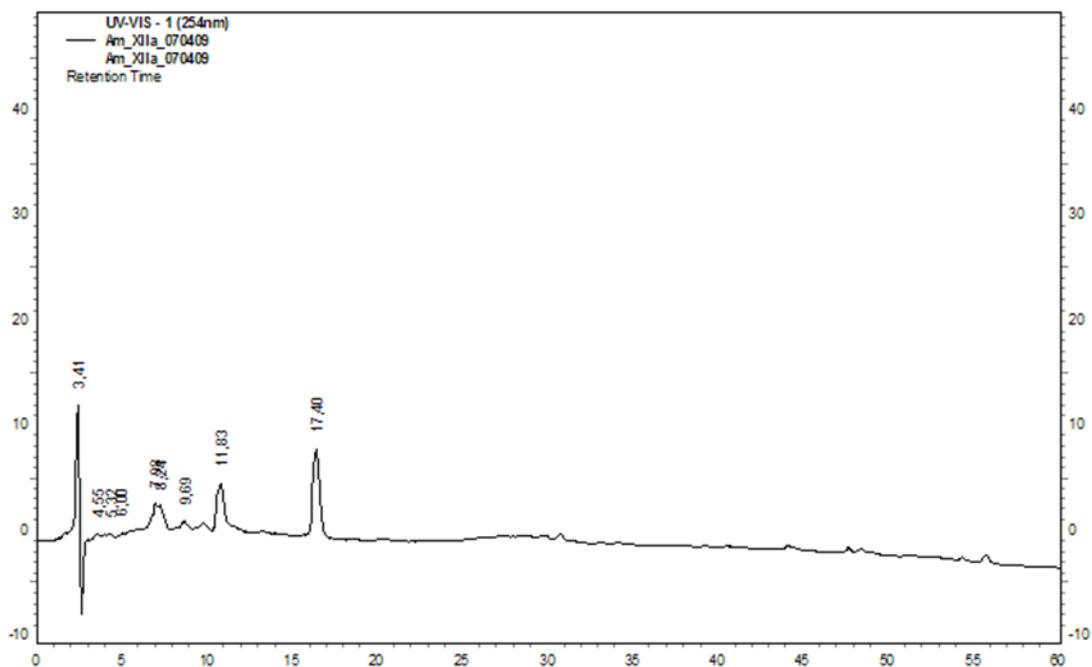
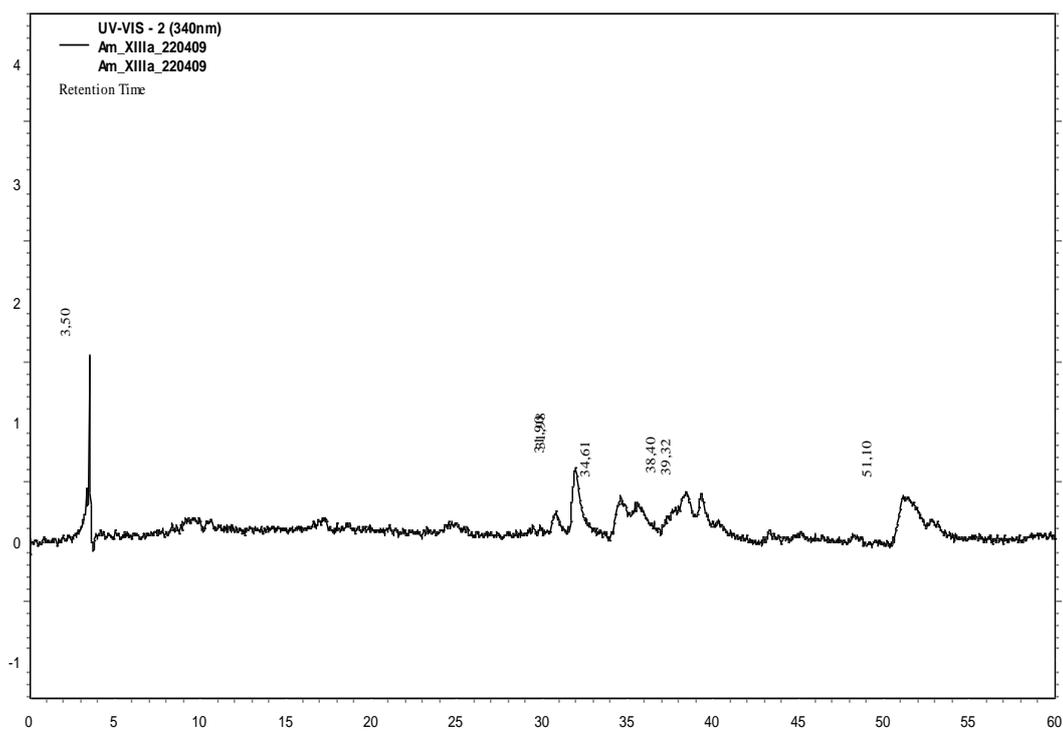
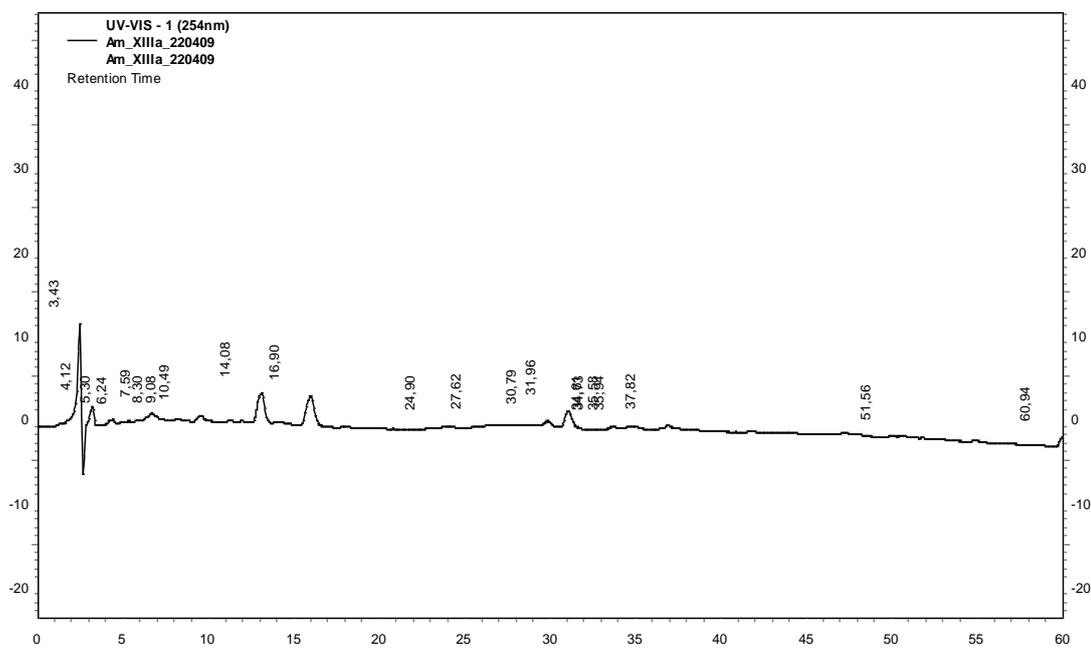


FIGURA A1.21- Amostra XII de mel de abelhas sem ferrão do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340 nm.



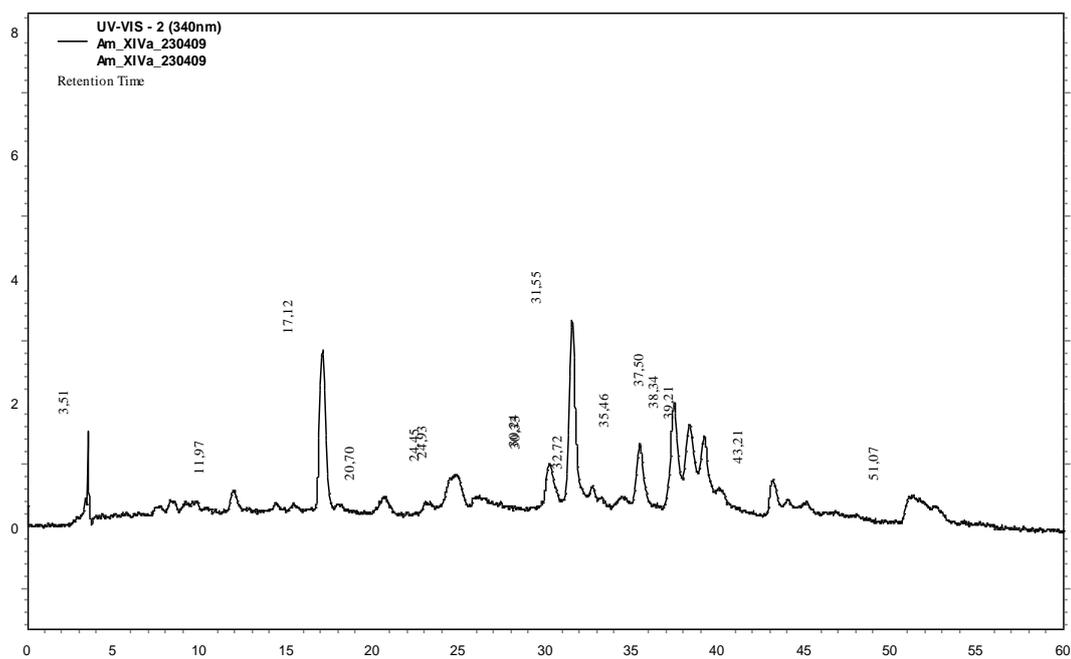
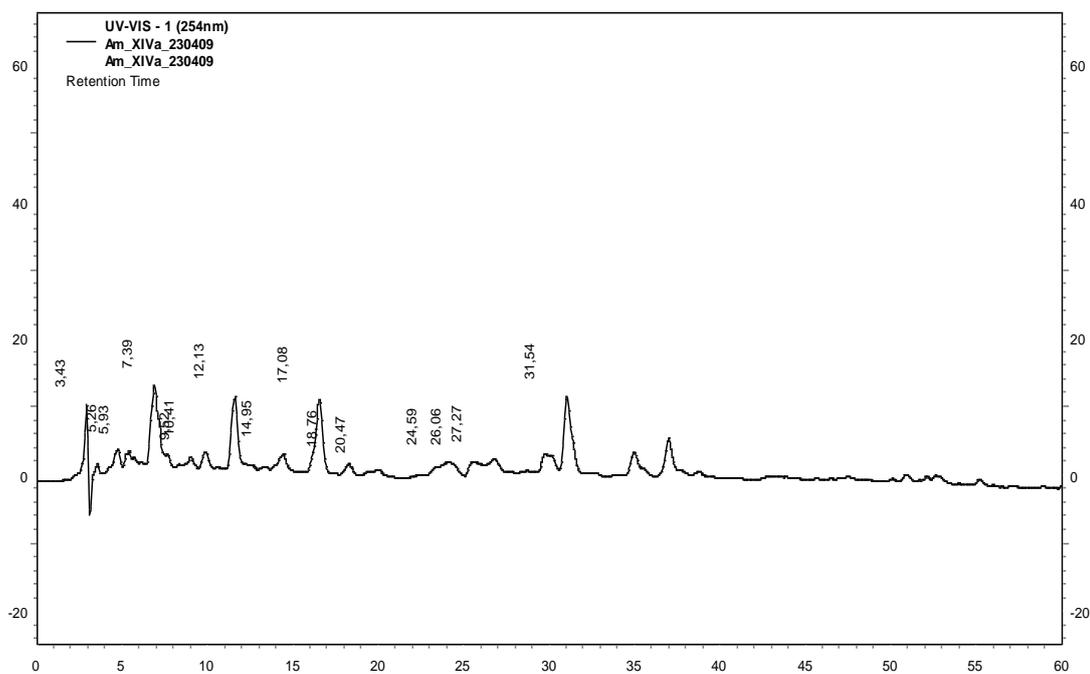
Ácido Gálico (3,41); ác. Ferúlico (11,83).

FIGURA A1.22 -Amostra XIII de mel de abelhas sem ferrão do estado da Bahia.
Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340 nm.



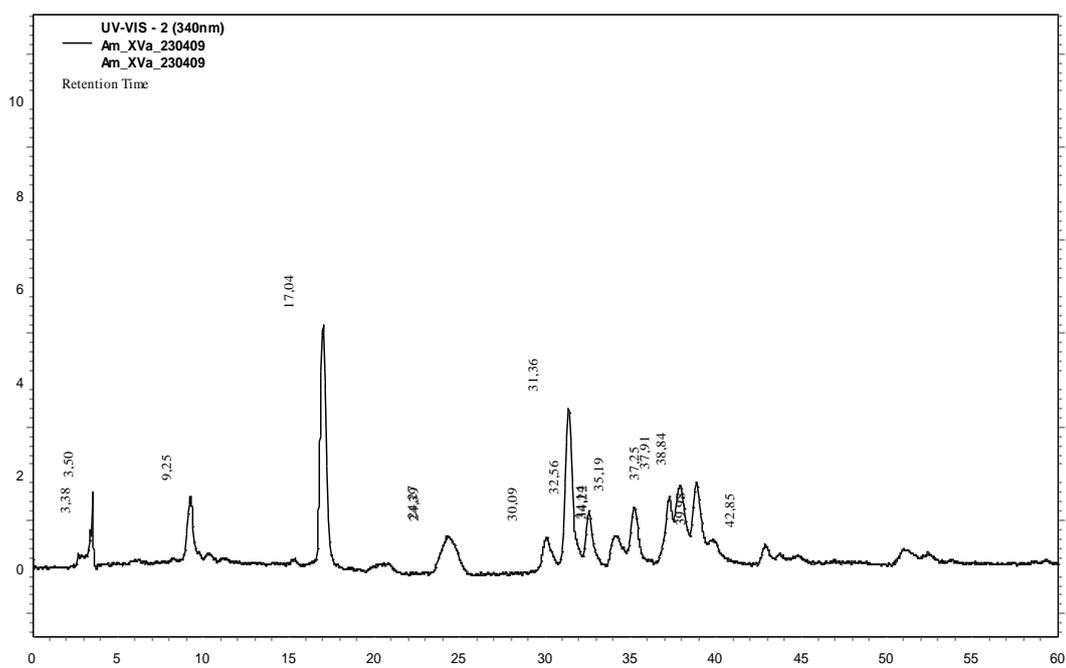
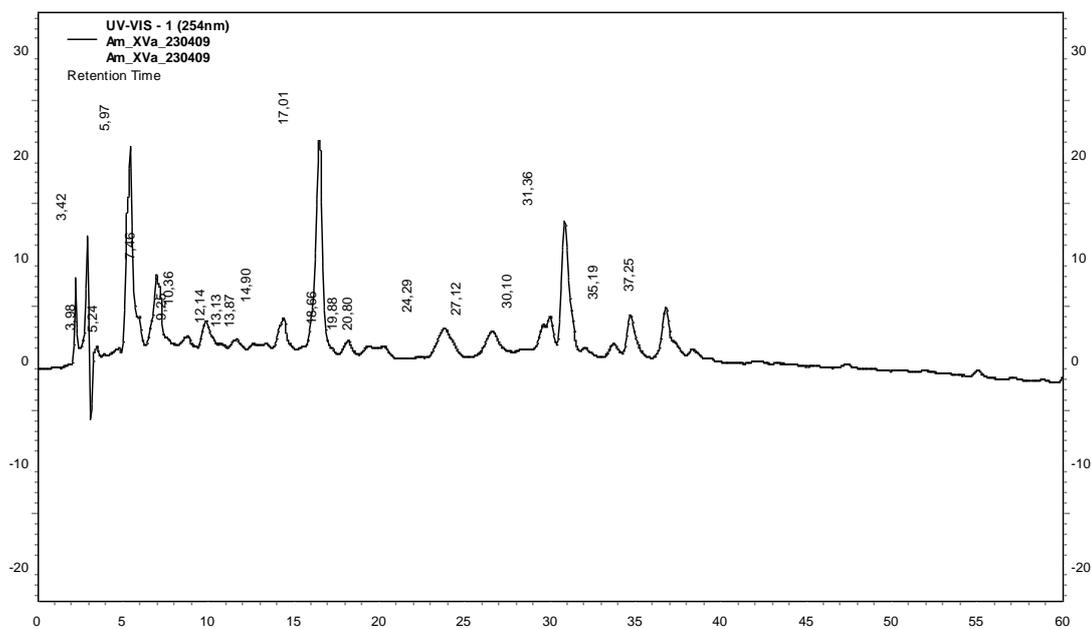
Ácido Gálico (3,50); Luteolina (31,96).

FIGURA A1.23 - Amostra XIV de mel de abelhas sem ferrão do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340 nm.



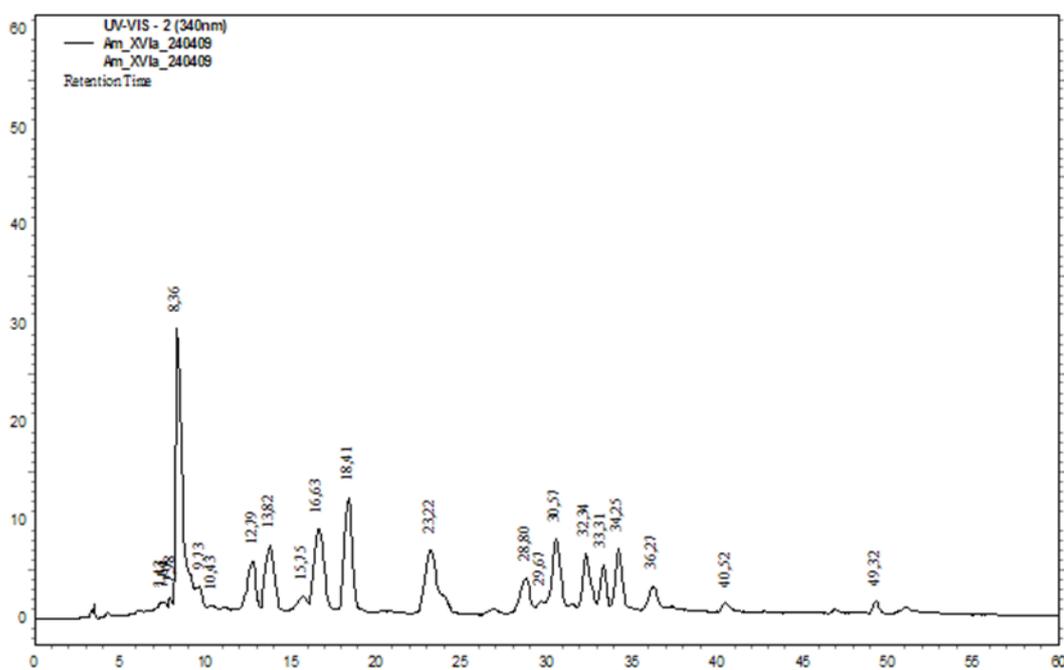
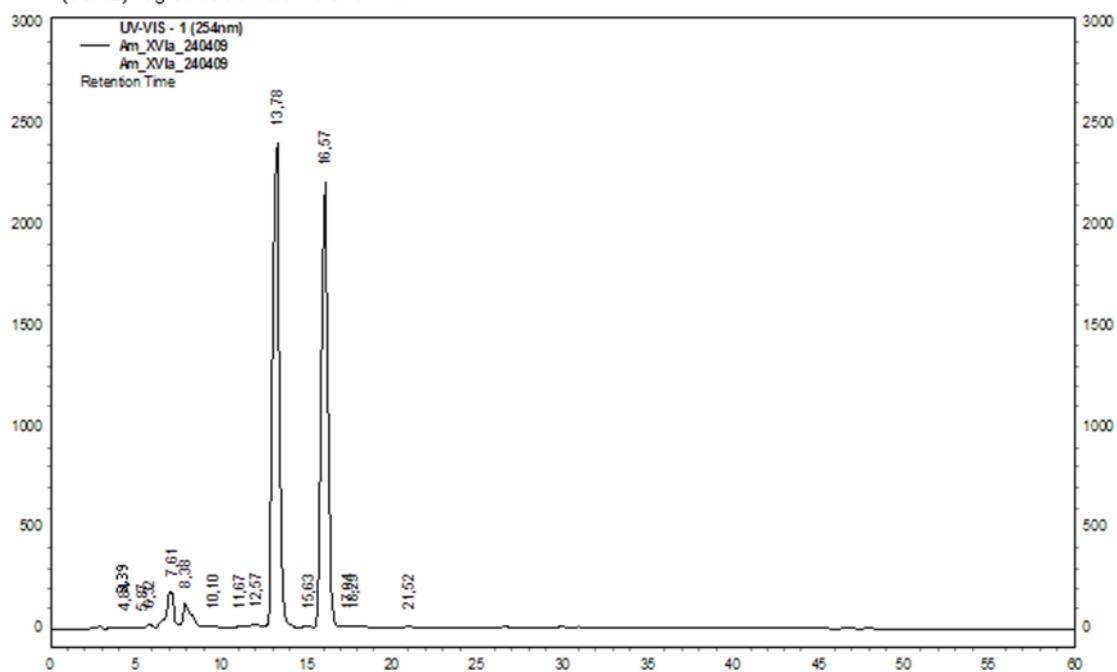
Ácido Gálico (3,51); ác. p-Cumárico (10,41); ác. Ferúlico (12,13); Luteolina (30,38); Quercetina (31,55), Pinocembrina (43,21)

FIGURA A1.24 - Amostra X V de mel de abelhas sem ferrão do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340 nm.



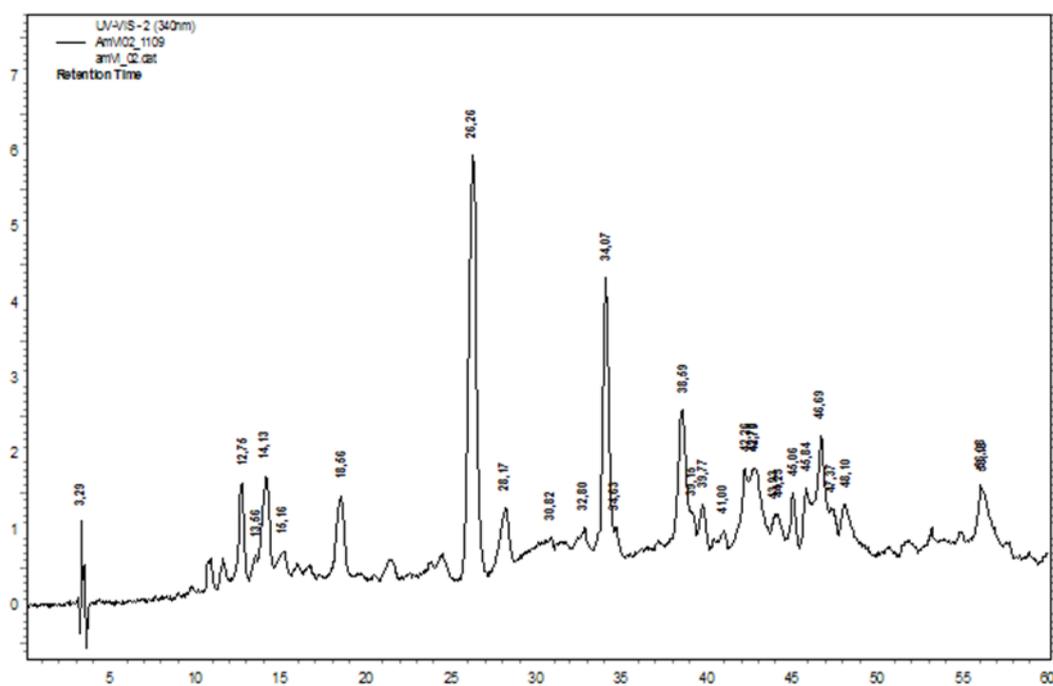
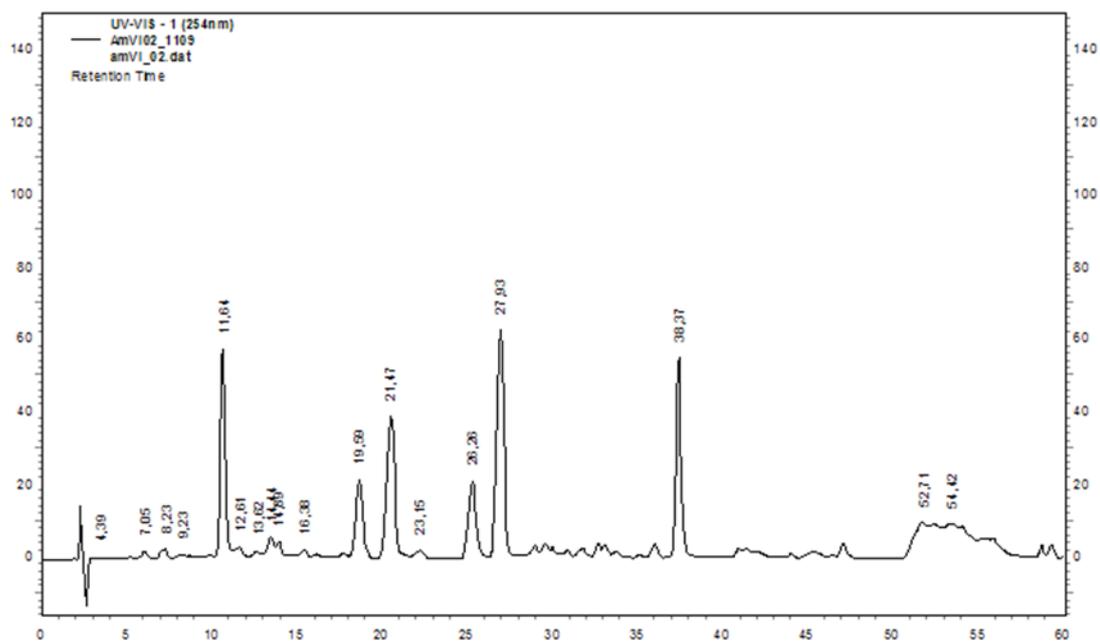
Ácido Gálico (3,50); ác. p-Cumárico (9,25); ác. Ferúlico (10,36); Luteolina (31,36); Pinocembrina (42,85).

FIGURA A1.25 - Amostra XVI de mel de abelhas sem ferrão do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340 nm.

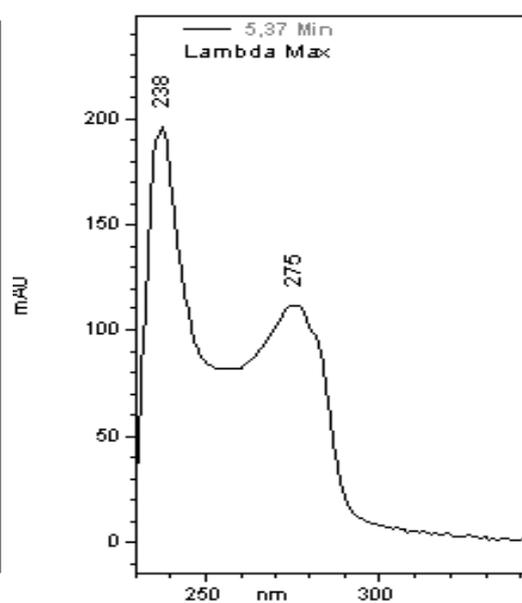
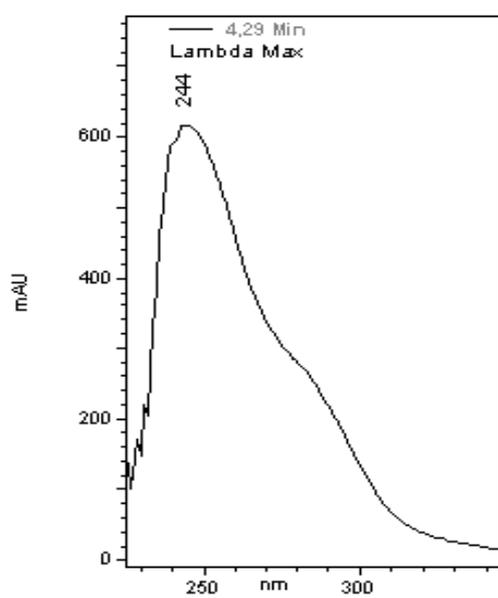
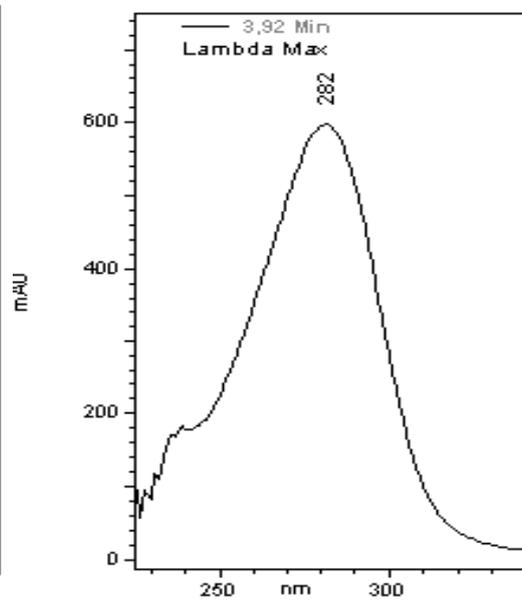
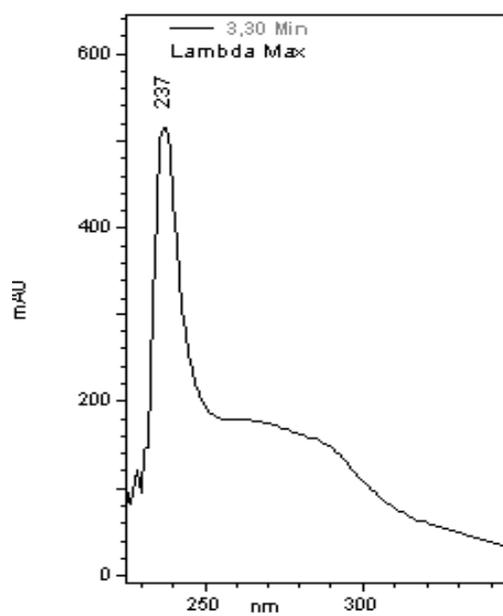


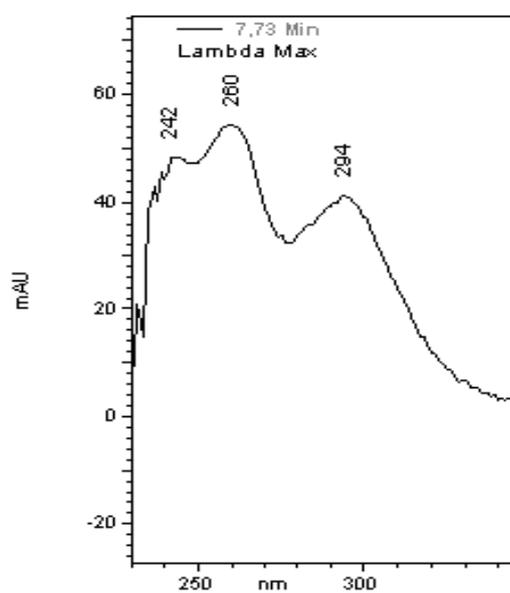
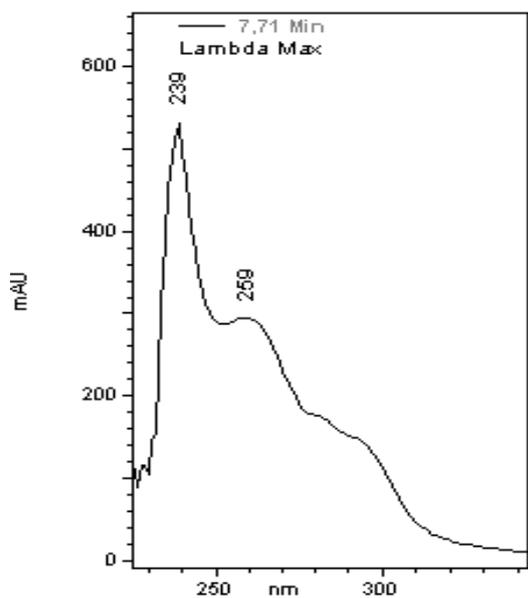
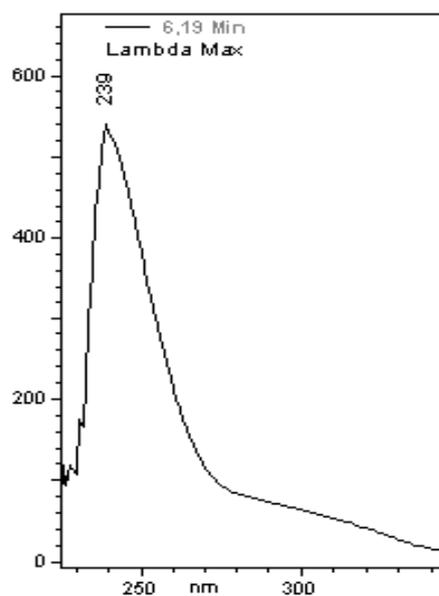
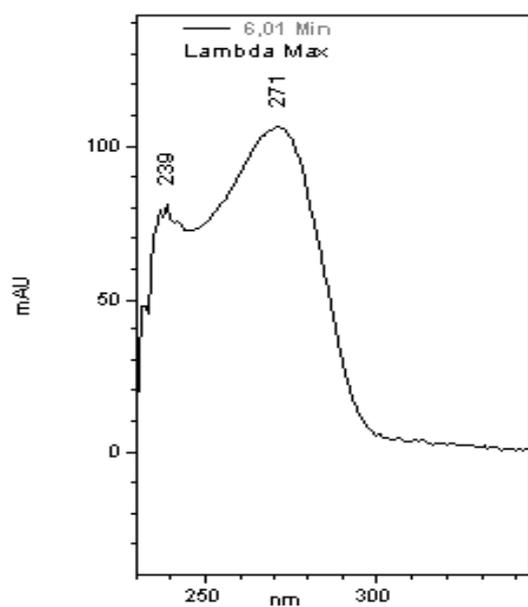
Ácido Gálico (3,39); ác. P-Cumárico (10,10); ác. Ferúlico (11,67).

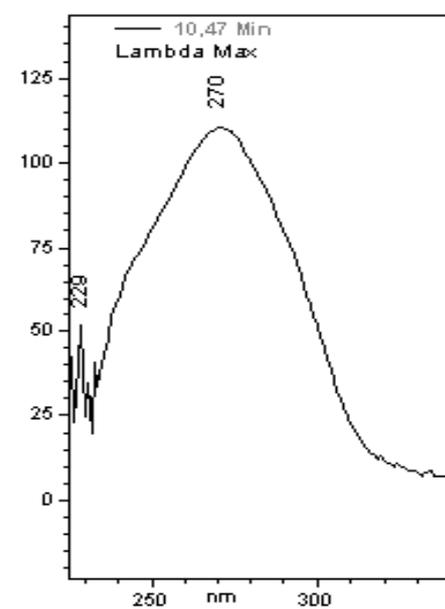
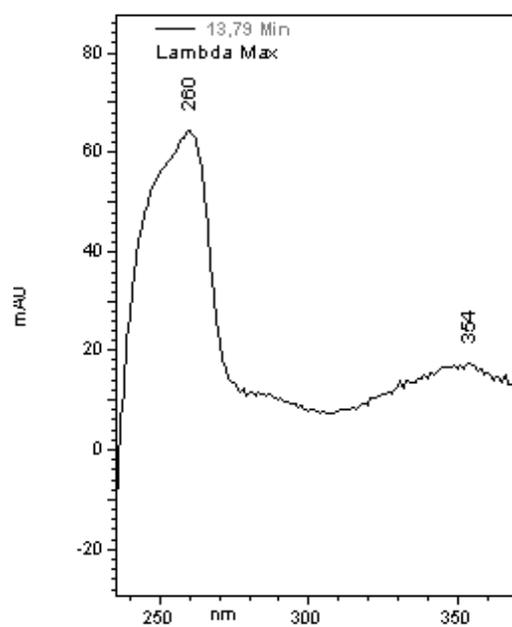
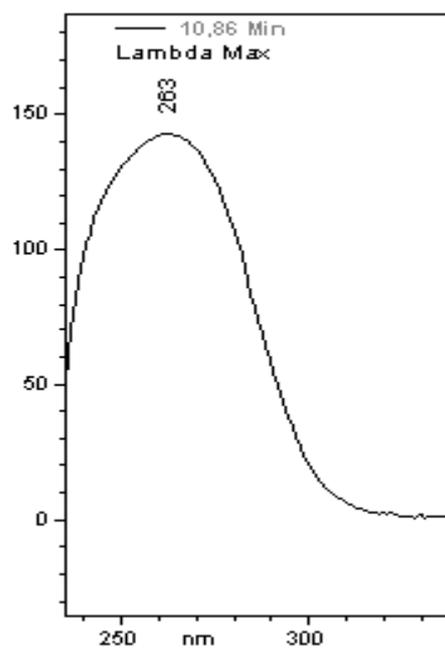
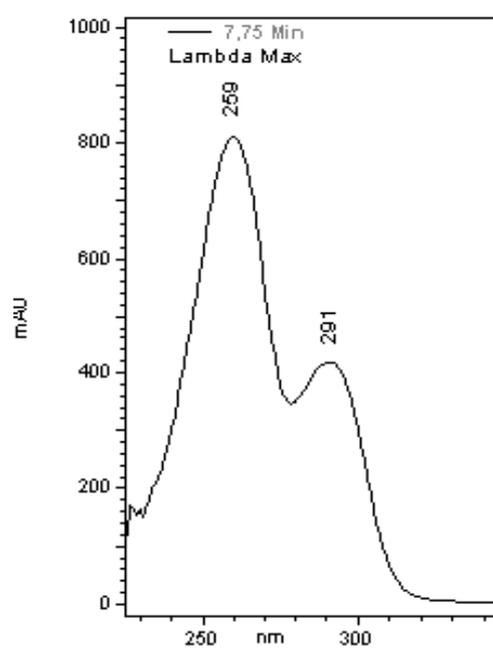
FIGURA A1.26 - Amostra VI de mel de abelhas sem ferrão do estado da Bahia. Cromatogramas (CLAE) registrados a 254 e 340 nm.

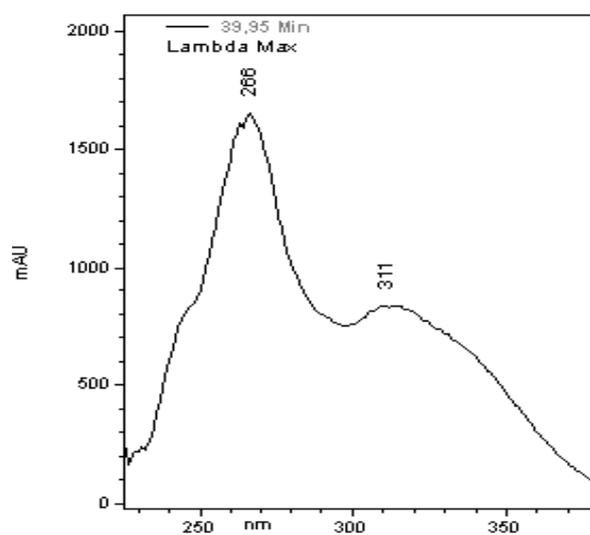
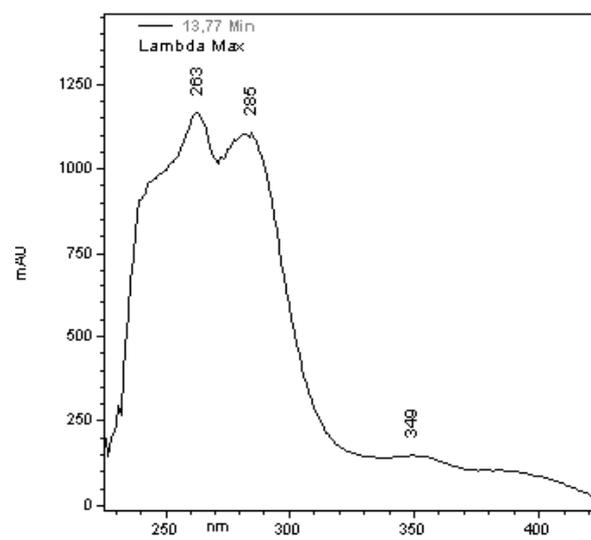
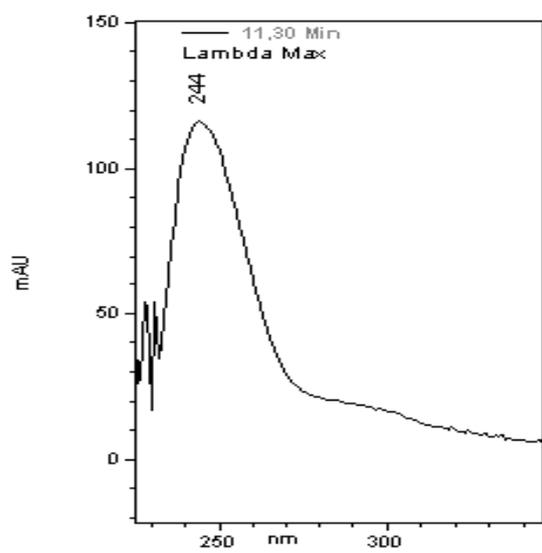


Ácido Ferúlico (11,67).









ANEXO 2

TABELA 1 - Compostos fenólicos totais em mel (mg AG.100g⁻¹ mel) - *Apis mellifera* do estado da Bahia - dois períodos ; Equação da Curva: $y = 29.754x - 0.0127$; padrão: ácido Gálico

Amostra	Massa(g)			Abs. 750 nm			Média	±DP	RSD%
1.1	2.5291	2.5194	2.5238	0.042	0.042	0.042	16.88	0.03	0.19
2.1	2.4974	2.5196	2.5036	0.038	0.038	0.040	15.88	0.41	2.59
3.1	2.5124	2.5249	2.5262	0.039	0.042	0.039	16.23	0.56	3.44
4.1	2.4981	2.5089	2.5128	0.042	0.040	0.040	16.55	0.44	2.64
5.1	2.5162	2.4504	2.4436	0.040	0.038	0.034	15.65	0.85	5.43
6.1	2.5200	2.4967	2.5137	0.044	0.044	0.042	17.42	0.42	2.39
7.1	2.5101	2.4968	2.5103	0.043	0.040	0.043	17.00	0.53	3.11
1.2	2.5374	2.4320	2.5063	0.133	0.123	0.136	18.79	0.60	3.20
2.2	2.4664	2.4682	2.4320	0.128	0.122	0.120	18.07	0.48	2.67
3.2	2.4845	2.4338	2.4519	0.127	0.124	0.124	18.29	0.09	0.49
4.2	2.5475	2.5102	2.4893	0.152	0.140	0.151	20.89	0.87	4.16
5.2	2.5381	2.4046	2.4667	0.150	0.135	0.138	20.36	0.57	2.78
6.2	2.4710	2.5415	2.4545	0.148	0.153	0.151	21.52	0.30	1.40
7.2	2.4052	2.5503	2.5055	0.151	0.146	0.152	21.42	0.97	4.54

DP= desvio padrão da média; RSD%= variância por cento.

TABELA 2 - Flavonóides totais em mel (mg QE.100g⁻¹ mel) - *Apis mellifera* do estado da Bahia - dois períodos; Equação da Curva: $y = 0.0024x + 0.0028$; padrão: Quercetina

Amostra	Massa (g)			Abs. 510nm			Média	±DP	RSD%
1.1	2.6394	2.8346	2.8073	0.014	0.015	0.015	7.16	0.09	1.20
2.1	2.6217	2.7430	2.7718	0.014	0.014	0.014	6.89	0.21	2.98
3.1	2.5688	2.6255	2.5493	0.012	0.013	0.012	6.15	0.28	4.55
4.1	2.5088	2.6805	2.6207	0.014	0.015	0.015	7.59	0.16	2.10
5.1	2.6703	2.7347	2.5278	0.016	0.016	0.015	8.11	0.11	1.38
6.1	2.5702	2.5774	2.2769	0.013	0.014	0.012	6.86	0.33	4.86
7.1	2.6766	2.7006	2.6570	0.015	0.015	0.015	7.59	0.06	0.81
1.2	2.5754	2.8195	2.3172	0.014	0.015	0.012	7.03	0.35	5.04
2.2	2.5671	2.6787	2.6308	0.015	0.016	0.015	7.95	0.24	3.06
3.2	2.6474	2.1875	1.8046	0.014	0.012	0.010	6.90	0.22	3.20
4.2	2.6339	2.1728	1.7237	0.017	0.014	0.012	8.82	0.21	2.34
5.2	2.6796	2.3213	1.9471	0.014	0.013	0.011	7.10	0.19	2.72
6.2	2.5531	2.5612	2.2816	0.015	0.015	0.014	8.03	0.13	1.66
7.2	2.6676	2.1134	1.2433	0.017	0.014	0.009	8.67	0.31	3.61

DP= desvio padrão da média; RSD%= variância por cento.

TABELA 3 – **Teste t** ($p \leq 0.01$) de parâmetros analisados em méis de *Apis mellifera* (n=7) do estado da Bahia em fevereiro (1.º período) e setembro (2.º período) de 2008

Parâmetro	Média (±DP) 1.º Período	Média (±DP) 2.º Período	(p)	Dif. períodos
pH	4,50 (0,07)	4,60 (0,01)	0,0636	ND
Acidez	19,88 (0,43)	19,28 (0,20)	0,0033	D
aW	0,570 (0,03)	0,550 (0,00)	0,0689	ND
C. Fenólicos	16,51 (5,59)	18,99 (0,09)	0,0000	D
Flavonóides	7,19 (1,56)	7,79 (0,18)	0,0007	D
CIM- <i>E. coli</i>	302 (5,59)	142 (0,08)	0,0000	D
CIM- <i>S. aureus</i>	288 (0,59)	285 (0,00)	0,0000	D
CIM- <i>P. aeruginosa</i>	302 (5,59)	142 (0,08)	0,0000	D
CIM- <i>C. albicans</i>	0 (0,00)	285 (0,18)	0,0000	D

N= número de amostras; D=Detectada; ND=Não detectada; Dif.= diferença entre períodos. DP= desvio padrão da média.

FIGURA 1- Cromatogramas (CLAE) de méis de *Apis mellifera* do município de Canarana-BA, de dois períodos. Amostras 1.1 e 1.2 com imagens sobrepostas (a 340nm com zoom).

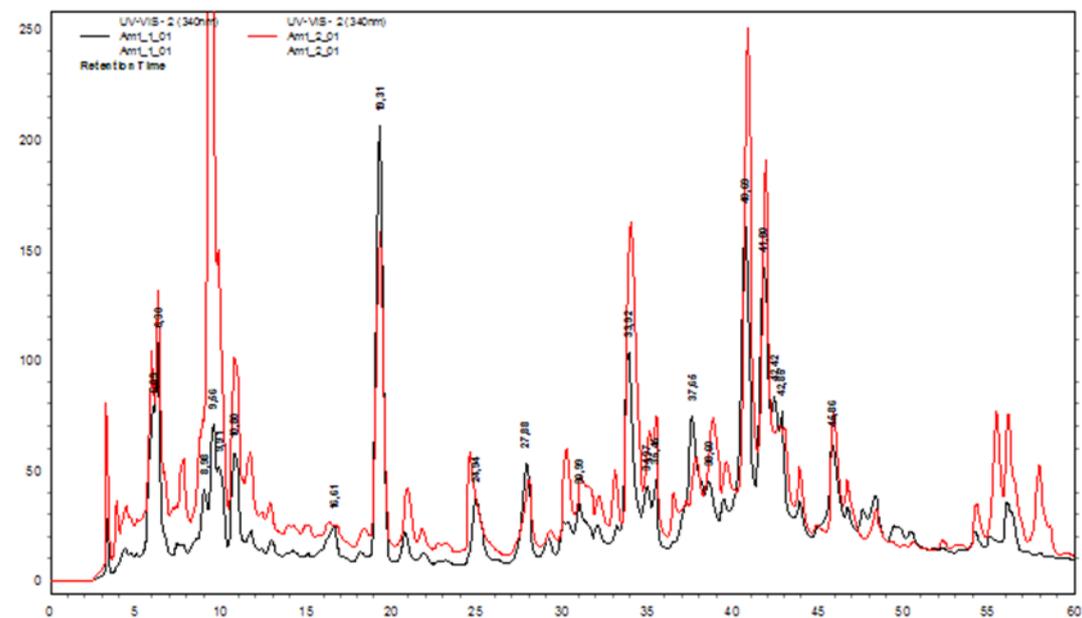
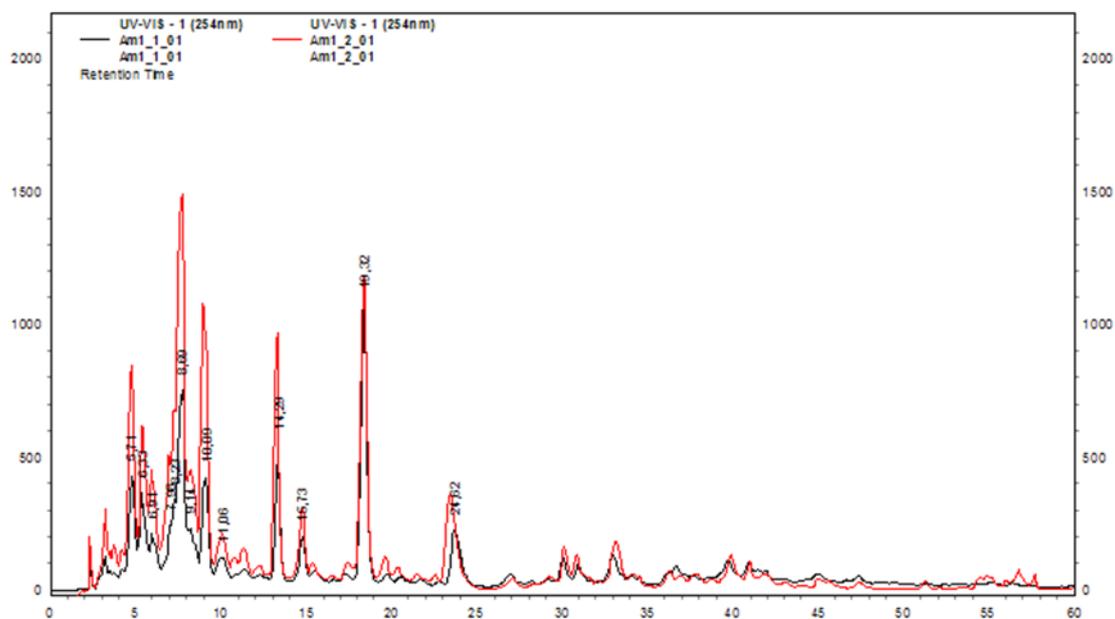


FIGURA 2- Cromatogramas (CLAE) de méis de *Apis mellifera* do município de Canarana-BA, de dois períodos. Amostras 2.1 e 2.2 com imagens sobrepostas.

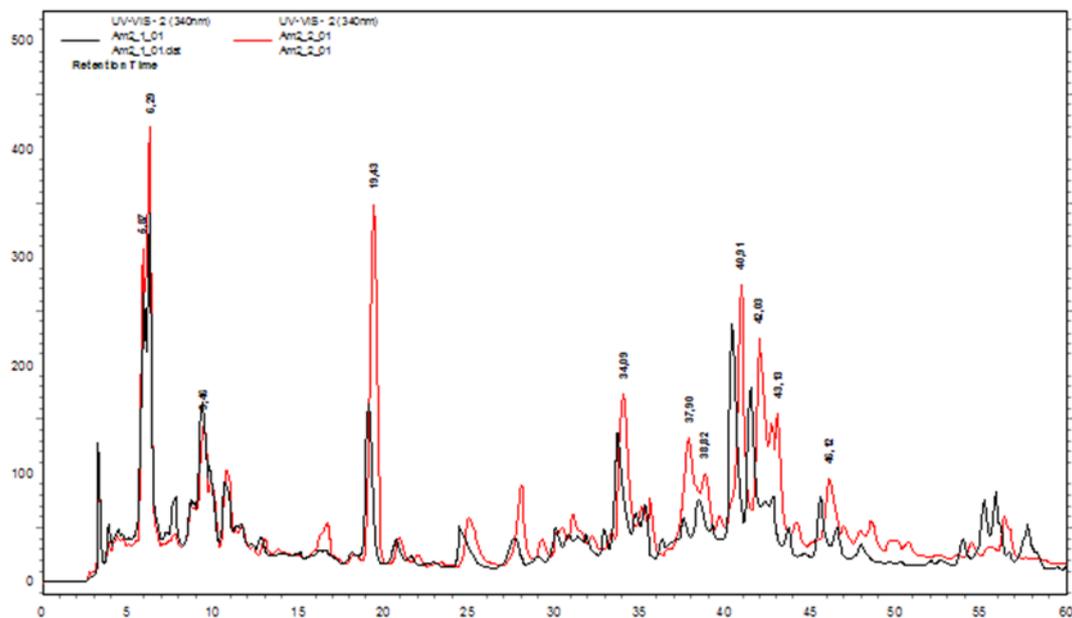
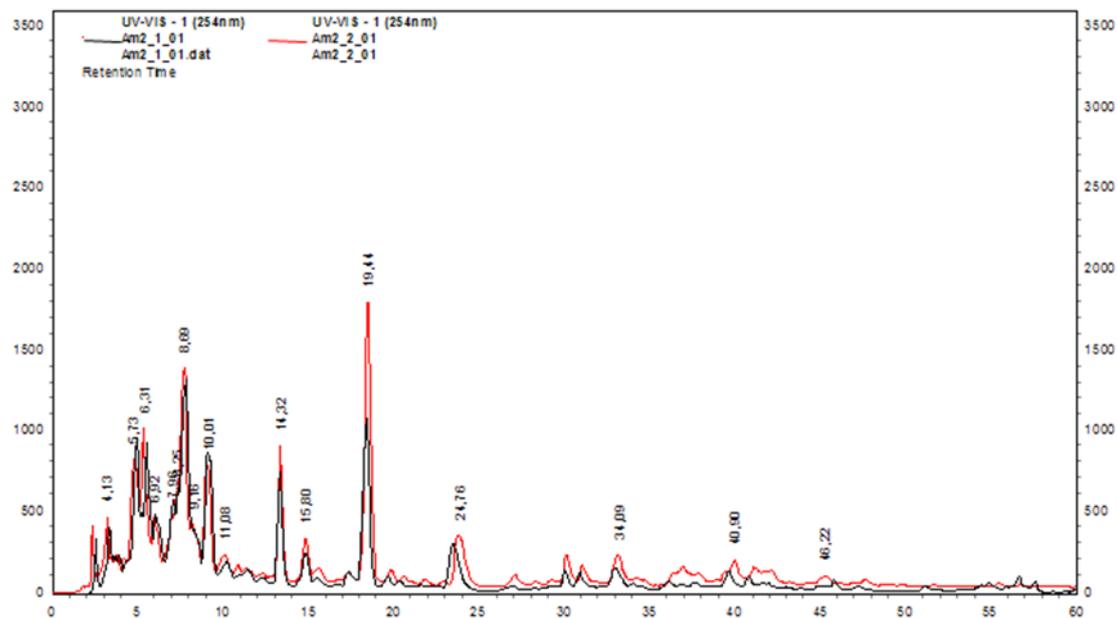


FIGURA 3- Cromatogramas (CLAE) de méis de *Apis mellifera* do município de Canarana-BA, de dois períodos. Amostras 3.1 e 3.2 com imagens sobrepostas.

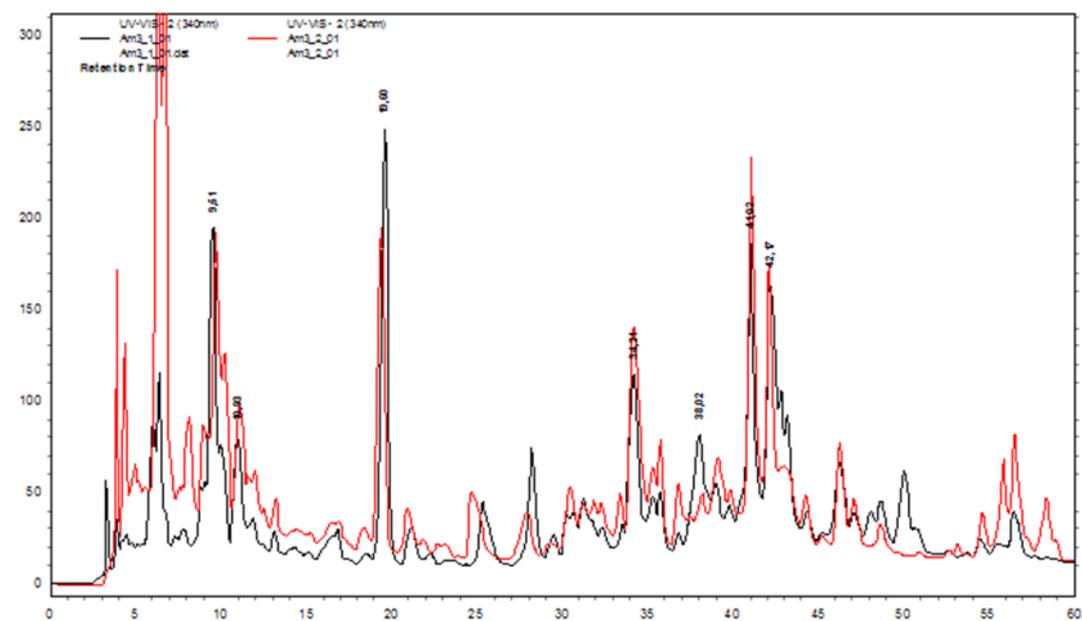
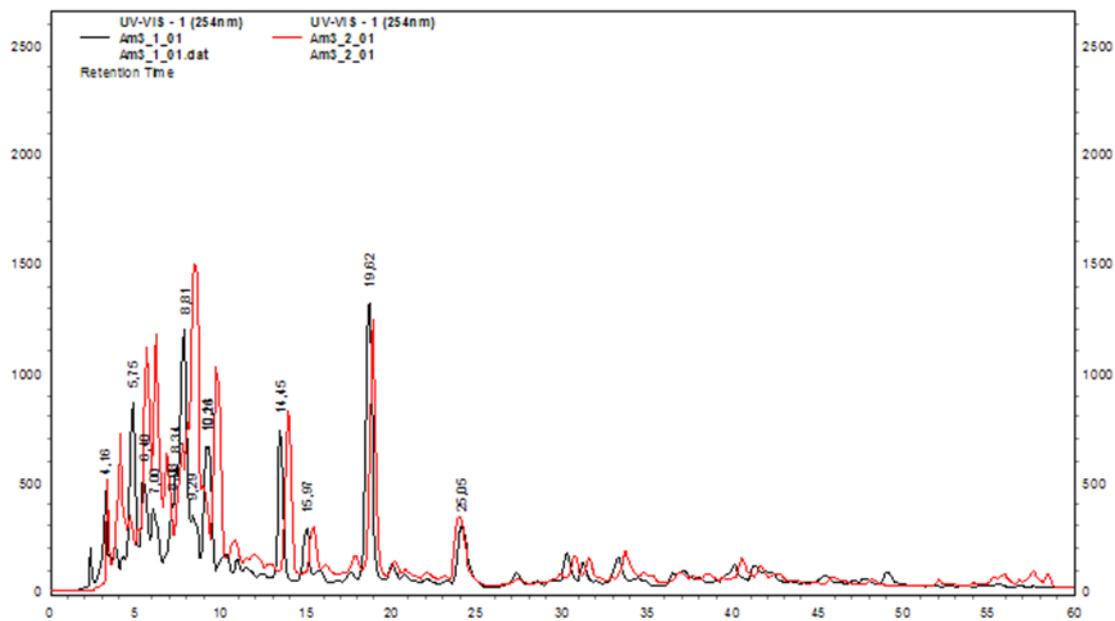


FIGURA 4- Cromatogramas (CLAE) de méis de *Apis mellifera* do município de Canarana-BA, de dois períodos. Amostras 4.1 e 4.2 com imagens sobrepostas.

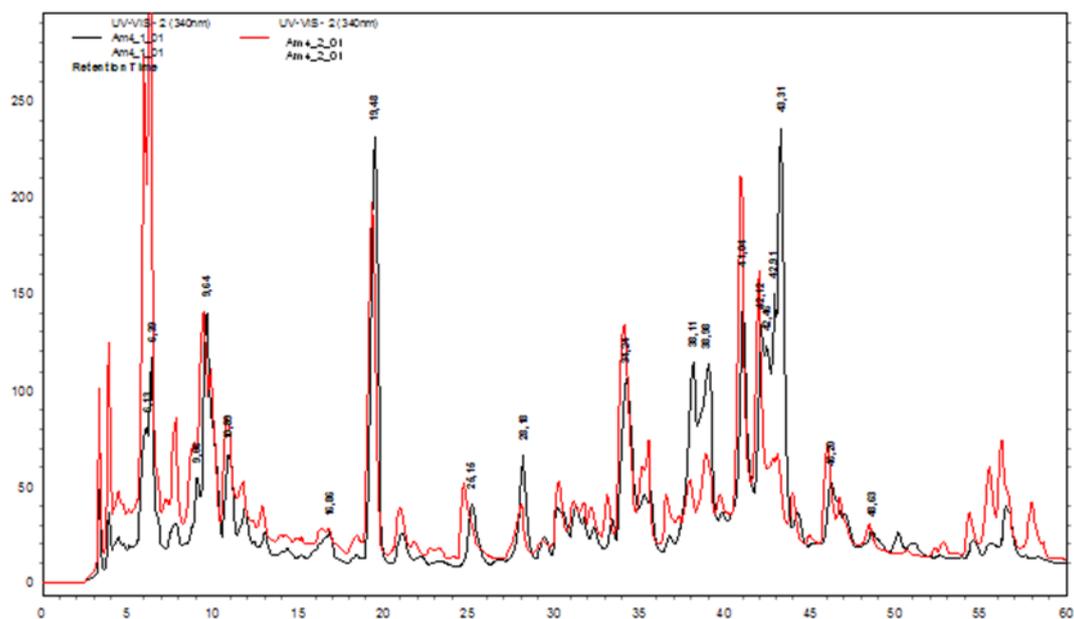
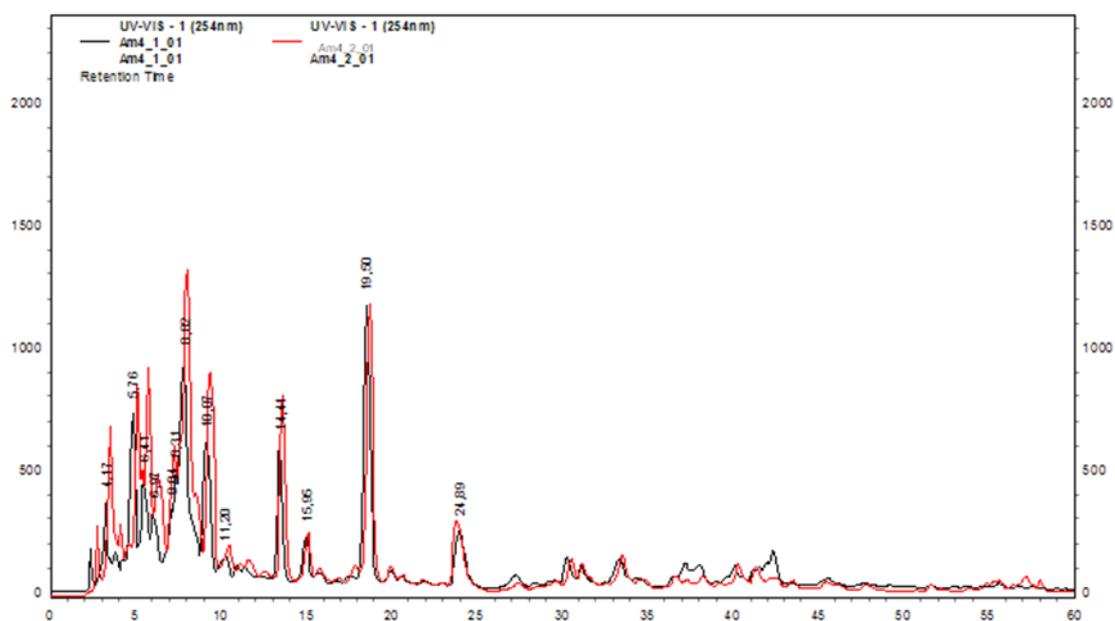


FIGURA 5- Cromatogramas (CLAE) de méis de *Apis mellifera* do município de Canarana-BA, de dois períodos. Amostras 5.1 e 5.2 com imagens sobrepostas.

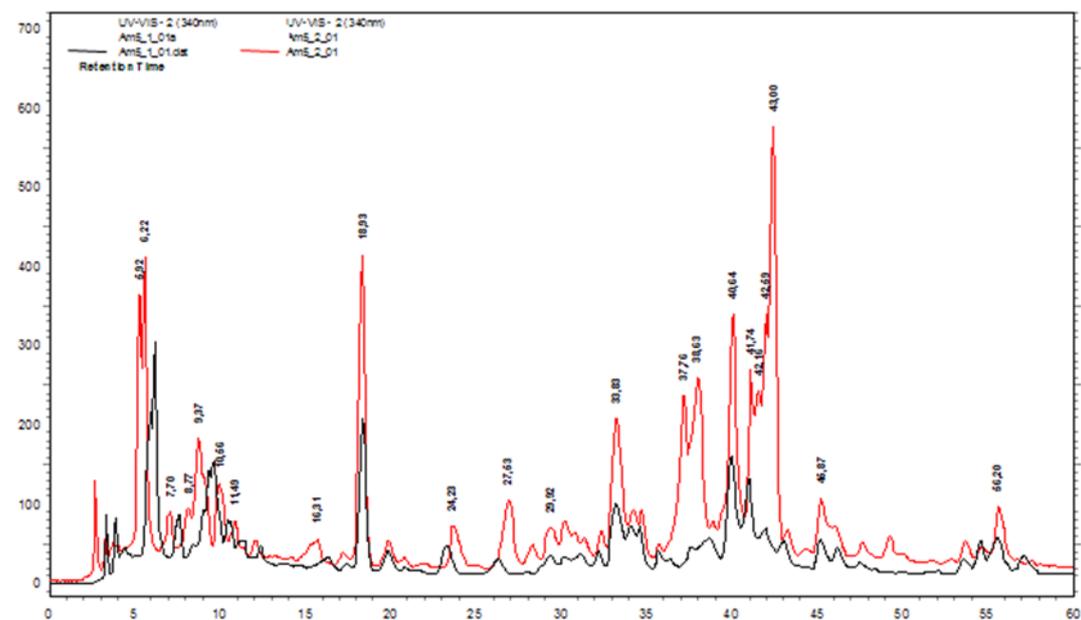
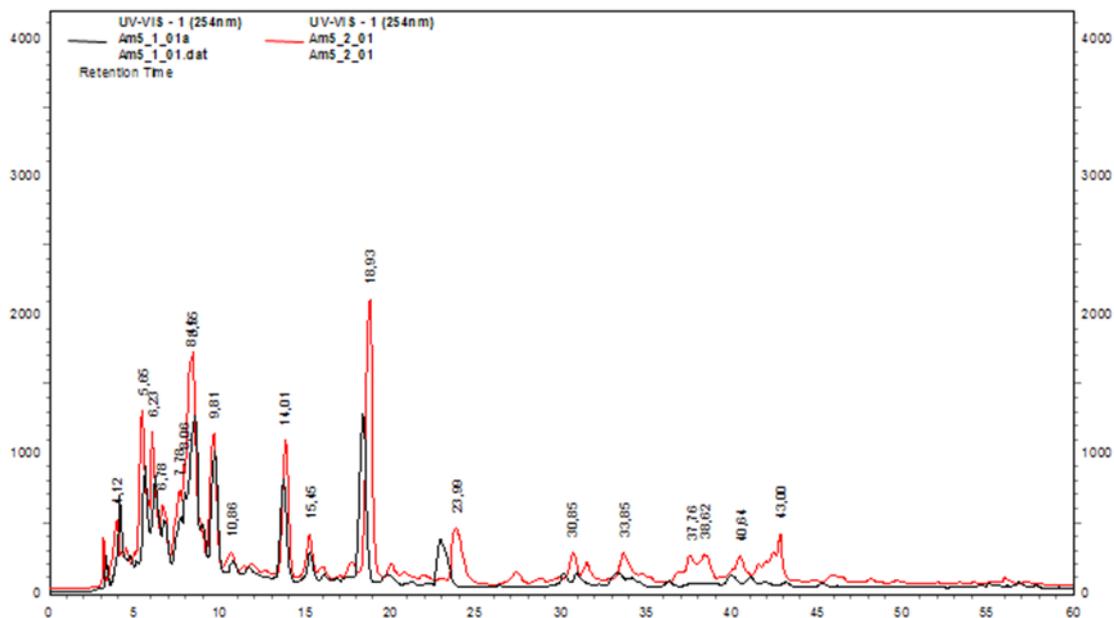


FIGURA 6- Cromatogramas (CLAE) de méis de *Apis mellifera* do município de Canarana-BA, de dois períodos. Amostras 6.1 e 6.2 com imagens sobrepostas.

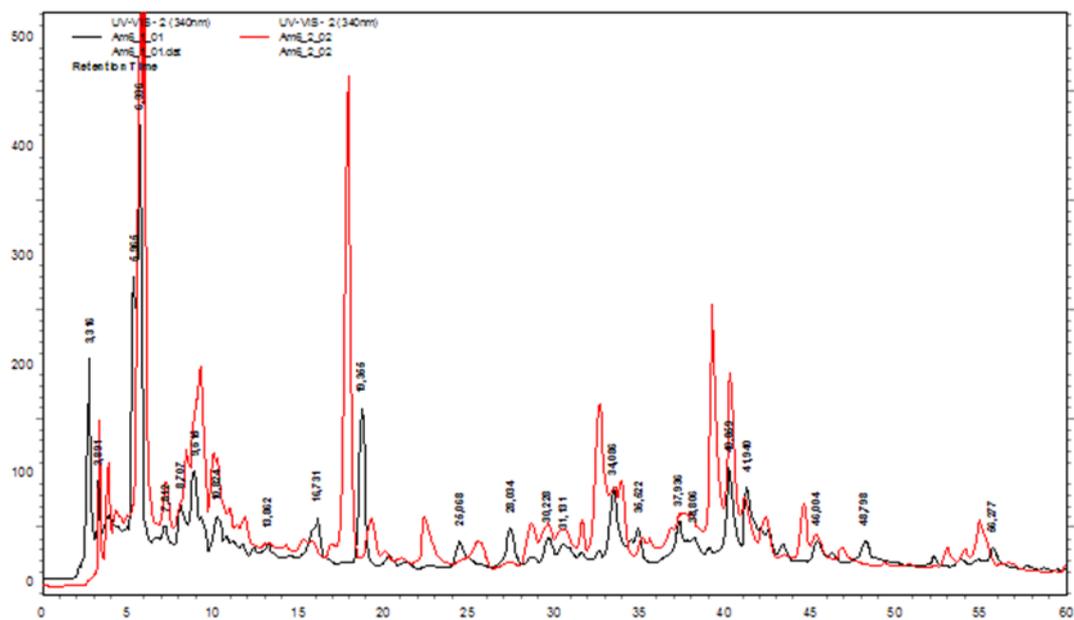
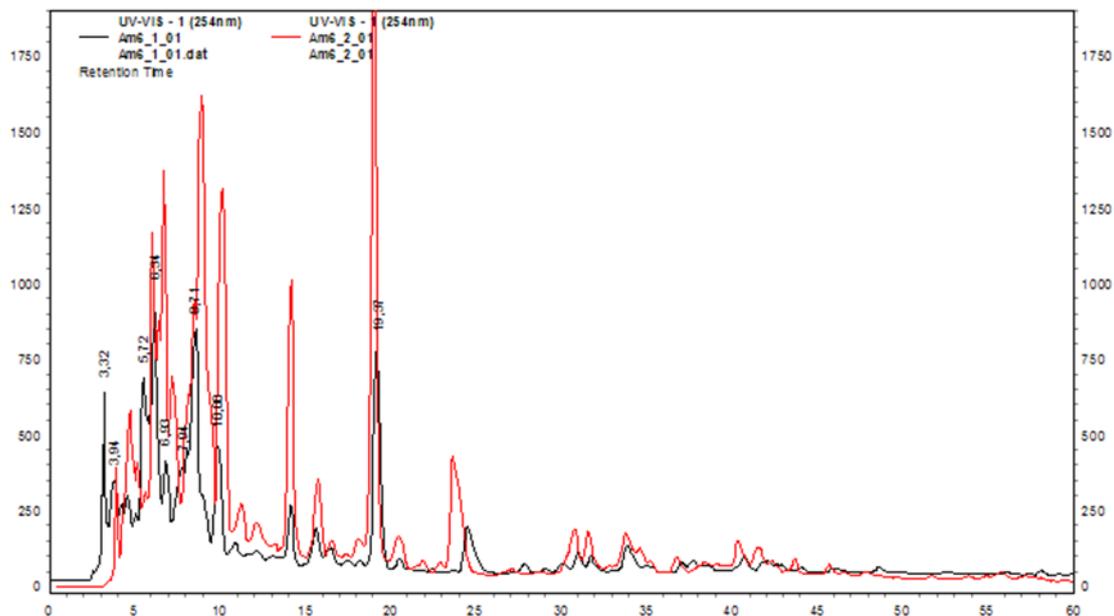


FIGURA 7- Cromatogramas (CLAE) de méis de *Apis mellifera* do município de Canarana-BA, de dois períodos. Amostras 7.1 e 7.2 com imagens sobrepostas.

