

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ALIMENTOS
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

TATYANE LAYANNE BORTOTI

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MEL DE *Apis Mellifera* DE
DIFERENTES REGIÕES DO PARANÁ**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CAMPO MOURÃO

2020

TATYANE LAYANNE BORTOTI

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MEL DE *Apis Mellifera* DE
DIFERENTES REGIÕES DO PARANÁ**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, do Departamento Acadêmico de Alimentos – DALIM – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Campo Mourão, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Aline Takaoka Alves
Baptista

CAMPO MOURÃO

2020



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Campo Mourão



TERMO DE APROVAÇÃO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MEL DE *Apis Mellifera* DE
DIFERENTES REGIÕES DO PARANÁ

por

TATYANE LAYANNE BORTOTI

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado dia 14 de fevereiro de 2020, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Aline Takaoka Alves
Baptista
(Orientador)

Profa. Dra. Eliane Sloboda Rigobello

Prof. Dra. Adriana Aparecida Droval

Nota: O documento original e assinado pela banca examinadora encontra-se na Coordenação do Curso de Tecnologia em Alimentos da UTFPR câmpus Campo Mourão.

*A minha família, que sempre esteve ao meu lado
independente de qualquer circunstância!*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que permitiu que este momento fosse vivido por mim, trazendo alegria aos meus pais e a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, por ter me dado saúde, forças e superar todas as dificuldades e conseguir chegar onde hoje estou.

Agradeço de forma especial ao meu pai Reinaldo Bortoti Sobrinho e à minha mãe Nilda de Souza por serem os maiores incentivadores, por todas as vezes em que eu gritei socorro e estavam ali me auxiliando, me dando forças. Aos meus irmãos Layla Kissielly Bortoti e Chrystian Maylon Bortoti por não medirem esforços para que eu pudesse levar meus estudos adiante, por estarem ao meu lado, por todo amor, apoio, por serem a minha base, eu serei imensamente grata por tudo o que fizeram e fazem por mim, também ao meu cunhado Anderson Cordeiro e os meus sobrinhos Thauanny e Brayan que mesmo longe, são a luz que ilumina meus dias, Eu amo vocês.

A minha orientadora Msc. Aline Takaoka, a professora Msc. Idinea Fernandes dos Santos e Dra. Maria Josiane Sereia agradeço pela confiança, paciência, atenção, por não terem sido apenas professoras e orientadoras, pelas correções e incentivos, por mostrar os caminhos quando eu me perdia, por todos os conhecimentos transmitidos, por serem excelentes professoras e profissionais. Obrigada por terem contribuído essa minha conquista. Às professoras Dra. Marcia Geraldo Ferreira Perdoncini, Dra. Adriana Aparecida Droval, Dra. Roberta Leone de Souza e Dra. Eliane Sloboda Rigobello por aceitarem a compor a banca examinadora, muito obrigada pelas sugestões e auxílio para elaboração deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos Laila Crystina, Vanessa Lemes e Giovanne Willian, por serem a minha família da faculdade que Deus me presenteou, em especial as minhas companheiras de apartamento Larissa Oliveira e Taislaine Andrade por todos os momentos compartilhados, pelos trabalhos elaborados, pela amizade durante a graduação e que vai continuar presente em minha vida. Agradeço também minha amiga Claudia R. Borges Fernandes por todo apoio e incentivo, paciência e compreensão durante toda a minha graduação. Vocês foram essenciais nessa jornada.

Em especial à minha amiga Érika Cardoso, por estar todas as noites ao meu lado enquanto eu enlouquecia com as análises e pensava em desistir a todo momento,

cada palavra de amparo, apoio, foram de suma importância para não me deixar desistir, por me lembrar todos os dias que eu era capaz. Você sabe que parte dessa conquista é sua também.

A Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *campus* de Campo Mourão, por ceder espaço físico e pelo ensino de qualidade que foram proporcionados ao longo desses anos, aos professores que colaboraram direta e indiretamente para a minha formação acadêmica.

A todos minha eterna gratidão.

*Não se molde ao padrão deste mundo,
mas transforme-se!*

Romanos 12:1

RESUMO

BORTOTI, Tatyane Layanne. Atividade antimicrobiana de mel de *Apis mellifera* de diferentes regiões do Paraná. 2020. 32 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2020.

O mel é um alimento muito antigo e prezado pela humanidade, nos últimos tempos vem despertando o interesse dos pesquisadores em validar seu potencial antimicrobiano. Este estudo buscou contribuir para a possibilidade de ampliação do uso do mel para fins terapêuticos, investigando estas características em amostras de mel produzidos em distintas regiões do estado do Paraná, sendo elas Sul, Leste, Oeste e Noroeste, frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*, onde foi verificada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) através do Método de Microdiluição em Caldo proposto pelo Clinical and – Laboratory Standards Institute (CLSI). A levedura *Candida albicans* demonstrou maior resistência que as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O CIM encontrado para os três microrganismos avaliados diversificou entre 12,5 à 25%, e o CBM esteve entre 25% e 50%. Para as regiões analisadas, o território sul foi o que exibiu os melhores resultados para a concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima. Concluiu-se que o mel é um eficiente agente bactericida e bacteriostático, com alto potencial biotecnológico e que diversos fatores podem estar associados à sua ação bactericida.

Palavras-chave: Microrganismos patogênicos. Potencial antimicrobiano, Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CIM) Propriedades curativas do mel.

ABSTRACT

BORTOTI, Tatyane Layanne. Antimicrobial activity of *Apis mellifera* honeys from different regions of Paraná. 2020. 36 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2020.

Honey is a very old food and prized by mankind, in recent times has aroused the interest of researchers to validate its antimicrobial potential. This study sought to contribute to the possibility of expanding the use of honey for therapeutic purposes, investigating these characteristics in samples of honey produced in different regions of the state of Paraná, being them South, East, West and Northwest, facing the microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*, where the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericide Concentration (MCBM) were verified through the Method of Microdilution in Broth proposed by Clinical and - Laboratory Standarts Institute (CLSI). *Candida albicans* yeast showed higher resistance than *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria. The MIC found for the three microorganisms evaluated ranged from 12.5 to 25%, and CBM was between 25% and 50%. For the regions analyzed, the southern territory showed the best results for minimum inhibitory concentration and minimum bactericide concentration. It was concluded that honey is an efficient bactericidal and bacteriostatic agent, with high biotechnological potential and that several factors may be associated to its bactericidal action

Keywords: Pathogenic microorganisms. Antimicrobial Potential, Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MIC) Healing properties of honey.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO PRINCIPAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 O MEL	18
3.1.2 PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DO MEL	19
3.3 MICROORGANISMOS PATOGÊNICOS	21
3.4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO MEL	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 COLETA DE AMOSTRAS	23
4.3 CEPAS MICROBIANAS	24
4.4 PREPARO DA ESCALA MCFARLAND	25
4.5 PREPARAÇÃO DO INOCULO BACTERIANO E PADRONIZAÇÃO	25
5. TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA	26
5.1 MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO	26
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
7 CONCLUSÕES	30
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1 INTRODUÇÃO

O mel é considerado fluído viscoso, aromático e doce, elaborado pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções provenientes de partes vivas de plantas ou ainda, de secreções de insetos sugadores de seivas vegetais que se encontram sobre as partes vivas dessas plantas. As abelhas recolhem e transformam o néctar que possui substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos (*Apis*) ou em potes (melíponas) separados da colmeia (EMBRAPA, 2007).

Segundo Buligon et al. (2015), o mel é um alimento de alto valor energético por ser constituído de carboidratos simples (monossacarídeos e oligossacarídeos), pigmentos vegetais, ácidos orgânicos, vitaminas, proteínas, hormônios e enzimas. Esse alimento apresenta atividades biológicas, como antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, antiviral, antiparasitária, anti-inflamatória e imunossupressora (BORSATO et al., 2013).

A criação de abelhas refere-se uma atividade em que se obtêm resultados econômicos, ecológicos, sociais e sustentáveis. Uma atividade que vêm sendo desenvolvida de pequenos a grandes criadores, despertando assim o interesse dos mesmos e também das instituições do Brasil. Existem duas grandes linhas de estudo quando o assunto é a criação de abelhas, Apicultura e a Meliponicultura. Na Apicultura, o conhecimento é sobre o mel produzido por abelhas com ferrão. No entanto, a Meliponicultura, os estudos são mais recentes e desenvolvidos com abelhas regionais sem ferrão (RODRIGUES et al., 2005). O mel mais comum produzido é o da abelha *Apis mellifera* africanizadas, é abundantemente estudado e usado pela população. Principalmente na região Neotropical, além de várias espécies indígenas sem ferrão ou meliponíneos (como *Melipona spp.*, *Scaptotrigona spp.*, e *Trigona spp.*) elaboram mel diferenciado. Sua característica físico-química e sensorial específica das abelhas sem ferrão tornam seu valor comercial mais elevado, comparando-se ao mel tradicional (BORSATO et al., 2013).

Segundo Bazoni (2012), as propriedades antibacterianas do mel foram reconhecidas *in vivo* por Aristóteles (350 A. C) e seguidamente *in vitro* por Sackett (1919). Estudos têm sido direcionados para especificar os constituintes responsáveis por esses parâmetros. Sua atividade antimicrobiana foi originalmente apreciada como

sendo devido aos fatores físicos, como osmolaridade (partículas osmoticamente ativas) e acidez (pH 3,4). Dold et al. (1937) analisou que estas atividades (osmolaridade e acidez) apresentavam-se mesmo depois do mel ser diluído. Outros pesquisadores concluíram que esta atividade do mel diluído era correspondente à presença de peróxido de hidrogênio, ocasionada pela ação da enzima glicose oxidase, acrescentada ao mel pelas abelhas através das glândulas hipofaríngeas, a qual reage com a água e a glicose formando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio, cuja quantidade presente no mel é correlativa com os níveis de glicose oxidase, quanto de catalase, devido que a mesma se origina do pólen da flor destrói o peróxido de hidrogênio.

O mel selado nos alvéolos é esterilizado pelo peróxido de hidrogênio por ser um antisséptico esporicida, capaz também de protegê-lo contra a decomposição bacteriana até que seu conteúdo de açúcares esteja alto o suficiente para fazê-lo (BAZONI, 2012).

Entre os principais microrganismos que geralmente causam toxinfecções alimentares são bactérias das famílias dos *Staphylococcaceae* e *Enterobacteriaceae*. *Staphylococcus aureus*, agente patogênico de alta virulência, associada a várias doenças devidas a elevada resistência a antibióticos. Bactérias gram-positivas, anaeróbicas facultativas de uma geração temida, cada vez mais preeminente na comunidade. Sendo ainda uma das cinco fontes mais popular de infecção nasocomiais e de doenças potencialmente letais como meningite, pneumonia, endocardite, bacteremia entre outras (SANTOS et al., 2007).

Logo, *Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa de origem fecal, sendo considerado um dos patógenos alimentares mais importantes da atualidade. Onde deve ser avaliada sob duas formas por ser uma enterobactérias, uma vez detectada é indicativo de condições higiênicas insatisfatórias. Outra concepção é que diversas ascendências são comprovadamente patogênicas ao homem e animal (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

As infecções fúngicas invasivas causadas pela *Candida Albicans*, uma levedura parasita das superfícies das mucosas, torna-se um patógeno em condições que lhe permite aderir e habitar tecidos epiteliais, causando riscos letais e infecções disseminadas. A mortalidade causada por candidemia é superior a 30%, se tornando

dominante em todo o mundo devido á extensão de pacientes imunocomprometidos, apesar das terapias antifúngicas continua com um número elevado de mortalidade. Como se multiplica unicelularmente por gemulação tem alta resistência, auxiliando em sua penetração nas superfícies epiteliais, posto que na corrente sanguínea tenha ação danosa. Com esses e outros diversos fatores tem motivado o interesse em explorar a área (MORGAN et al., 2005).

Dessa forma, esta pesquisa tem por objetivo ampliar o conhecimento sobre o mel produzido no estado do Paraná e colocando em evidência seu potencial como matéria-prima para o desenvolvimento de estudos no campo medicinal e biotecnológico.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Verificar a atividade antimicrobiana de mel obtidos em diferentes regiões do Paraná frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), e a levedura *Candida albicans* (ATCC 10231).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reativar e padronizar os inóculos dos microrganismos *S. aureus*, *E. coli* e levedura *C. albicans* utilizada nos testes.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) frente aos microrganismos testados;
- Analisar os dados obtidos para verificar se existem ou não diferenças ou similaridades entre as amostras provenientes de diferentes regiões do estado do Paraná, verificado pelo Teste de Sensibilidade Antimicrobiana.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O MEL

O mel, contemplado desde a Grécia antiga foi desfrutado pelo homem como alimento, medicamento e oferenda aos deuses. Existem relatos da aplicação do mel como medicamento em papiros egípcios de cerca de 1500 a.C., onde constitui de centenas de prescrições para uso externo e interno. Por vários séculos foi extraído das colônias de forma excessiva e predatória, muitas vezes causando danos ao meio ambiente e matando as abelhas. Entretanto, com o tempo, o homem foi aprendendo a proteger seus enxames, a mantê-los em colmeias racionais e manejá-los afim de obter maior produção de mel sem causar prejuízo para as abelhas (GOIS COSTA et al., 2013).

O Brasil possui flora diversificada e clima benéfico, assegurando-o como um dos maiores produtores de mel do mundo. A qualidade e origem do mel depende de várias circunstâncias, entre eles as condições climáticas em todo o processo de produção, tipo de planta forrageada pelas abelhas, as características geográficas do seu local de origem, bem como as condições de processamento e armazenagem, subespécie de abelhas, estado fisiológico da colônia, entre outros (AL-WAILI et al., 2011).

Como a flora brasileira apresenta-se altamente variada, devido à extensão territorial do país e a oscilação climática (edafoclimática) existente, é possível produzir mel o ano todo com formação e características distintas (MARCHINI et al., 2005).

O mel é um alimento muito antigo, produzido a partir do néctar das plantas, apreciado pela humanidade por ser nutritivo e de fácil digestibilidade, possui inúmeras aplicações terapêuticas, e sua produção derivar-se da abundância e da qualidade das flores existentes no raio de ação das abelhas, ocasiona nas diferentes propriedades físicas e químicas, onde constitui-se em um excelente suplemento alimentar. Conforme a flor de que o néctar foi obtido pelas abelhas, bem como de sua localização geográfica, o mel resultará em características diferentes quanto ao sabor, cor e perfume (BACAXIXI et. al., 2011).

O campo de ação do mel é amplo, possuindo função bacteriostática e bactericida em bactérias gram-negativas, gram-positivas em fungos e leveduras, além da capacidade de degradar o DNA plasmídeo genômico bacteriano (BRUDZINSKI et al., 2012). Há estudos para o tratamento de feridas, bem como do seu efeito antibacteriano para infecções respiratórias e diarreia, uma vez que o mel inibe mais de sessenta espécies bacterianas patogênicas distintas (EUNETU et al., 2013; HEGAZI et al., 2017; HUSSAIN, 2017).

3.1.2 PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS DO MEL

No Brasil, a Instrução Normativa nº 11/2000 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), define os requisitos de identidade e qualidade do mel de *Apis mellifera* e os critérios de aceitação para as características sensoriais e técnicas de produção (BRASIL, 2000). Apontado como o único produto natural derivado de insetos que tem valores nutricionais, cosméticos, terapêuticos e industriais (BANSAL, MEDHI; PANDHI, 2005), essencialmente devido à comprovação científica de suas diversas propriedades benéficas à saúde. Sua atividade antimicrobiana tem despertado interesse entre os pesquisadores devido seu alto potencial de aplicação em casos clínicos (ETERAF- OSKOUEI; NAJAFI, 2013; SAMARGHANDIAN, FARKHINDEH; SAMINI, 2017).

Salonen et. al. (2017), observaram que o néctar retirado das flores pelas abelhas contem compostos fenólicos e voláteis, ácidos orgânicos, piruvaldeído e uma enzima chamada catalase. Enquanto a água do néctar é evaporada, as abelhas adicionam as enzimas glicose oxidase, invertase a diástase, bem como ácidos orgânicos, antibiótico e antifúngico, compostos peptídicos e a proteína defensina-1. Além de que, compostos procedentes das bactérias ácido-láticas que crescem no estômago das abelhas e o composto antibacteriano ácido 10-hidróxi-2-decenóico originário da geleia real pode contribuir para a bioatividade do mel por (SALONEN et. al., 2017; BUCEKOVA et. al., 2018 no prelo)

As propriedades curativas e terapêuticas do mel relacionam-se com a atividade antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatório e aumento do sistema

imunológico (AL-WAILI et. al., 2011; ALVAREZ-SUAREZ et. al., 2014; BUCEKOVA et. al., 2018).

O mel combate bactérias por ação direta e indireta. A ação direta baseia-se na inibição direta ou morte das bactérias por elementos específicos do mel que são tóxicos para os agentes patogênicos, pois afetam diretamente o metabolismo e estrutura dos microrganismos. Estes incluem peróxido de hidrogênio, alta osmolaridade, acidez, não peróxido e fenóis. A ação indireta do mel estimula a reação antibacteriana de todo o organismo em direção a bactérias, ou seja, produção de linfócitos e anticorpos (AL-WAILI et. al., 2011).

Contudo, foi licenciado o uso tópico do mel em conjunto com curativos no tratamento de queimaduras e feridas por proporcionar uma barreira protetora precavendo a infecção microbiana. O uso do mel diminui o tempo de cura e isso pode ser explicado através de um efeito duplo na resposta inflamatória, efeito esse, que impede a inflamação prolongada, permitindo a re-epitelização e diminuição dos danos causados pelos radicais livres resultantes da inflamação, impedindo a necrose adicional (ALVAREZ-SUAREZ et. al., 2014). Também há estudos do seu efeito antibacteriano para infecções respiratórias e diarreia, uma vez que o mel inibe mais de sessenta diferentes espécies bacterianas patogênicas e também pode aumentar o crescimento da flora benéfica do trato gastrointestinal por apresentar um número de probióticos que promovem o crescimento de bactérias úteis, como bifidobactérias e lactobacilos (EWNETU et al., 2013; HUSSAIN, 2017).

Nos últimos anos as propriedades antimicrobianas do mel tem recebido mais atenção e devido às variações em seus compostos e por isso pode se encontrar estudos em diversas regiões do mundo. Outro fato que vem estimulando a medicina moderna a voltar sua atenção para o uso de produtos naturais, como o mel, é a ausência do risco de resistência antimicrobiana e seu baixo custo. O mel de todas as áreas geográficas exibem atividade considerável contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, mas seu valor medicinal pode ser influenciado devido à variação existente na característica de cada mel. Dessa forma, se pode afirmar que o mel de diferentes fontes é único em sua composição, aroma, cor, sabor e nível de

atividade antimicrobiana (AL-WAILI et al., 2011; ALVAREZ-SUAREZ et. al., 2014; HUSSAIN, 2017).

3.3 MICROORGANISMOS PATOGÊNICOS

A *Escherichia coli* gram-negativa, tem como habitat natural o intestino. É o principal agente causador de infecção do trato urinário (ITU) e gastroenterites, que ocorre em mulheres jovens, podendo complicar em pielonefrite, e se ocorrer a perfuração da parede intestinal ou do trato urinário, a letalidade é alta (OMS, 2017). A maioria das ocorrências de meningite em neonatos é causada por *E. coli* e estas também são agentes causadores de infecções de feridas e septicemia, seguidamente fatal em 15% dos casos (TODAR, 2004).

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva abundantemente distribuída em todo o mundo. Atualmente este microrganismo é uma das principais causas de infecções associadas à assistência hospitalar (OMS, 2017). Geralmente agridem a pele e subcutâneo, favorecido pelo fato de que esta espécie é encontrada tanto na pele como nas mucosas dos seres humanos, o que permite a penetração na corrente sanguínea do paciente através de feridas cirúrgicas, bem como através de contato direto ou indireto com pessoal médico, com um objeto contaminado ou com outro paciente (TODAR, 2004). É resistente aos altos níveis de açúcares e aos níveis de acidez presentes no mel, ao mesmo tempo que sensível à ação antimicrobiana do peróxido de hidrogênio (Osmolaridade, Lisozimas, Ácidos Fenólicos, Flavonóides e Acidez) (EWNETU et. al., 2013).

De meio eucariótico, a levedura *Candida albicans* é um fungo dimórfico pertencente ao grupo Eumicota, a qual é um importante patógeno oportunista para o homem, existindo como parasita em pelo menos 50% da população humana. Pesquisas tem demonstrado que a *C. albicans* é a espécie mais vista em isolados clínicos (NONAKA, et. al., 2008). Trata-se de um fungo de colonização assintomática, sendo, portanto, parasita: quando há um comprometimento da microbiota normal ou sistema imunológico, torna-se patogênico (ALANGADEN, 2011).

A *Candida albicans* está entre as leveduras que causam infecção invasiva, e embora frequentemente infecte pele e mucosas, ela pode causar infecções sistêmicas como pneumonia, septicemia e endocardites em pacientes imunodeprimidos, apresentando morbidade entre 30 e 50% (OMS, 2017). A infecção mais comum é a candidíase pode ser aguda ou crônica, com lesões superficiais ou profundas. Além disso mais resistente ao mel que as demais espécies fungicas e bacterianas (McLOONE, et. al., 2016; ALANGADEN, 2011; PEMÁM et. al., 2011).

3.4. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO MEL

A maior parte da energia que as abelhas precisam obtêm-se dos carboidratos na forma de açúcares simples produzidos pelas plantas, os quais são naturais do néctar identificado nas flores, casualmente em secreções de insetos que se alimentam de plantas e nectários extraflorais (COUTO; COUTO, 2006). O néctar floral que é produzido pelas plantas com o intuito de atrair polinizadores, é uma excreção aquosa das plantas que contem de 5 a 75% de açúcar, sendo as principais: sacarose, frutose, glicose e também pequenas quantidades de compostos nitrogenados, mineiras, vitaminas, ácidos orgânicos, lipídeos, pigmentos e substancias aromáticas. Os açúcares são secretados pelos nectários da flor na forma de néctar, ou seja, solução de açúcar e água, após serem coletados pelas operárias forrageadoras são levados até o ninho dentro da vesícula melífera. O conteúdo de vitaminas é baixo, mas podem ser encontradas no néctar como: piridoxina, nicotínico e fólico, tiamina, riboflavina, ácido pantotênico, biotina e ácido ascórbico, a vitamina de maior quantidade no néctar e no mel (AL-WAILI et. al., 2011).

Conforme descrição do Codex Standard For Honey (2001), o mel além de ser composto de açúcares, predominando os monossacarídeos glicose e frutose, apresenta também teores de proteínas, vitaminas, aminoácidos, enzimas, ácidos orgânicos, substâncias minerais, água, pólen, sacarose, maltose, malesitose e outros oligossacarídeos, além de pequenas concentrações de fungos, algas, leveduras e outras partículas sólidas resultantes do processo de obtenção do mel. A coloração do mel varia de quase transparente a castanho escuro. A consistência pode ser fluída, viscosa ou cristalizada. Estes atributos dependem do clima, da fonte floral e de práticas de apicultura individuais (RACOWSKI et. al., 2007).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DE AMOSTRAS

As amostras de mel foram adquiridas de seis cidades referentes a cinco regiões do estado do Paraná. General Carneiro – Sul; Pitanga – Central; Curitiba – Leste; Maringá –Noroeste e Marechal Cândido Rondon e Santa Helena - Oeste (Figura 1). Foram coletadas seis amostras por região, exceção da região oeste que foram sete, totalizando 31 amostras no período de agosto de 2016 a fevereiro de 2017 (Tabela 1). As amostras foram armazenados em potes plásticos ou vidros. Após recebimento, numeradas sequencialmente do 1 ao 31 e mantidas em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) ao abrigo de luz, até a realização das análises no Laboratório de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR Campo Mourão.



Fig. 1- Amostras de mel coletadas em cinco regiões do Estado do Paraná. 1 a 6 – Região Sul; 7 a 12 – Região Central; 13 a 18 região Leste; 19 a 24 região Noroeste; 25 a 31 região Oeste.

Tabela 1 – Regiões de coleta de 31 amostras de mel *Apis Mellifera* do estado do Paraná.

AMOSTRAS	PROCEDÊNCIA	REGIÃO
1	General Carneiro	Sul
2	General Carneiro	Sul
3	General Carneiro	Sul
4	General Carneiro	Sul
5	General Carneiro	Sul
6	General Carneiro	Sul
7	Pitanga	Central
8	Pitanga	Central
9	Pitanga	Central
10	Pitanga	Central
11	Pitanga	Central
12	Pitanga	Central
13	Curitiba	Leste
14	Curitiba	Leste
15	Curitiba	Leste
16	Curitiba	Leste
17	Curitiba	Leste
18	Curitiba	Leste
19	Maringá	Noroeste
20	Maringá	Noroeste
21	Maringá	Noroeste
22	Maringá	Noroeste
23	Maringá	Noroeste
24	Maringá	Noroeste
25	Santa Helena	Oeste
26	Santa Helena	Oeste
27	Santa Helena	Oeste
28	Marechal Cândido Rondon	Oeste
29	Marechal Cândido Rondon	Oeste
30	Marechal Cândido Rondon	Oeste
31	Marechal Cândido Rondon	Oeste

4.3 CEPAS MICROBIANAS

Os microrganismos patogênicos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida Albicans* ATCC 12231, foram cedidos pelo laboratório de microbiologia do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Ambiental da Universidade Estadual de Maringá - UEM.

O material biológico foi acondicionado em tubos de ensaio, identificadas com respectivos dados, posteriormente depositadas em caixas térmicas mantidas a temperatura de 4°C, foram transportadas via terrestres.

4.4 PREPARO DA ESCALA MCFARLAND

Segundo Brasil (2006), para padronização da escala, usou-se cloreto de bário BaCl₂, grau de pureza 99% e ácido sulfúrico H₂SO₄, grau de pureza 98%. Realizou-se a concentração molar de cada reagente e transferiu-se esta massa para balão volumétrico de 100 mL, completando-se com água destilada. Acrescentou-se 0,5 mL de BaCl₂ a 99,5 mL de H₂SO₄, homogeneizando constantemente para manter a suspensão. A densidade correta do controle de turbidez foi verificada no espectrofotômetro, onde a absorbância da solução padrão de McFarland adequou-se a 0,08 a 0,10 utilizando um comprimento de onda de 625 nm.

4.5 PREPARAÇÃO DO INOCULO BACTERIANO E PADRONIZAÇÃO

Realizado segundo as recomendações do Clinical and –Laboratory Standarts Institute (CLSI) documento M07-A9 (2012) para as bactérias e o M27 – A2 (2002) para a levedura, com recomendações segundo Sereia et al.(2017b). As culturas de microrganismos foram mantidas a 4°C em ágar nutriente (AN), onde as bactérias foram recuperadas em caldo Mueller-Hinton (MH) por 24 horas numa temperatura de 35°C e as leveduras em caldo Sabouraud Dextrose (CS) durante 24/48h a 36°C. Posteriormente, os inoculos foram repicados em placas de ágar MH para as bactérias e Ágar Sabouraud (AS) para a levedura, incubadas a 35°C por 24 horas antes do teste.

Foram preparadas suspensões de cultura, diluídas em solução salina 0,85% utilizando a escala de 0,5 de MacFarland até a obtenção de aproximadamente $1,5 \times 10^7$ Unidades Formadoras de Colônia (UFC.mL⁻¹) para a bactéria e $2,0 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ para levedura.

Uma diluição foi de 1:10 realizada no meio de cultura equivalente ao microrganismo para obter uma concentração 10^7 UFC/mL. Ao ser adicionado ao poço

que contém o meio de cultura esta concentração corresponderá à 10^4 UFC/mL. Um volume de 0,5 µl do inoculo preparado foi adicionado ao poço já contendo meio de cultura e o mel. As placas foram incubadas a temperatura ótima de crescimento dos microrganismos testados para avaliação da CIM e CBM.

5. TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA

5.1 MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO

Para o teste de sensibilidade antimicrobiana foi utilizado microplacas de 96 poços em forma de U, com demarcações indicando a posição das linhas (A-H) e as colunas (1-12). Foi pesado em tubo estéril aproximadamente 0,8g de mel em *eppendorff* de 2 ml e completou-se de igual peso com caldo MH para as bactérias e SD para a levedura, homogeneizou-se o meio utilizando vórtex, desta maneira procedendo com uma concentração de 50%. Em seguida, pipetou-se 200 µL dessa mistura no primeiro poço de cada fileira da placa, os demais foram completados com 100 µL de caldo respectivo para cada espécie, sendo que para cada amostra de mel foi utilizado três linhas da placa.

A diluição seriada foi realizada em porcentagem de mel seguindo as seguintes proporções em cada poço 1 – 50%; 2 – 25%; 3 – 12,5%; 4 – 6,25%; 5 – 3,12%; 6 – 1,56%; 7 – 0,78%; 8 – 0,39%; 9 – 0,19%. Como controle bacteriano (sem adição de mel) foi utilizado o poço 10, e como controle do caldo (sem adição de mel e inoculo), utilizou-se o poço 11. Depois de adicionado o mel, inoculou-se 5 µL da suspensão padronizada da bactéria em triplicatas, exceto no poço de controle do caldo, de maneira que a concentração final de bactérias teste seria de aproximadamente 5×10^4 UFC/poço. As microplacas foram identificadas e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24h.

Após este período de incubação as microplacas foram analisadas para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). O CIM foi definido como a menor concentração de mel em que não houve crescimento visível (turvação) após a incubação (CLSI, 2012; SEREIA et. al., 2017b). Para determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), foi pipetado 10 µL de suspensão de cada poço da

microplaca que não apresentou crescimento e de um poço subsequente que apresentou turvação em placa de Petri contendo ágar MH para *E. coli* e *S.aureus* e AS para a levedura *C. albicans*, sendo realizada a contagem de células viáveis do último poço que apresentou crescimento. As análises foram sucedidas em triplicata, as placas foram identificadas e incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por 24h. Findada às 24h de incubação as microplacas foram analisadas para determinação do CBM (CRUZ et. al., 2014).

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Tabela 2 apresenta os resultados dos testes microbianos de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) das 31 amostras de mel *Apis mellifera* provenientes de diferentes regiões do Paraná, frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida Albicans*.

Tabela 2 – Resultados dos testes microbianos de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Regiões	Nº Amostras	CIM%			CBM %		
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Sul	6	25aA	25bB	12,5eC	25aA	25bB	25eF
Central	6	25aA	25bB	12,5eC	25aA	25bB	50eF
Leste	6	25aA	25bB	12,5eC	25aA	50cC	50eF
Noroeste	6	25aA	25bB	25eD	25aA	50cC	50eF
Oeste	7	25aA	12,5cC	25eD	25aA	25bB	50eF

Tabela 2: Letras diferentes nas linhas diferem por microrganismos, letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem por região

A tabela apresenta que os três microrganismos patogênicos avaliados, revelaram sensibilidade ao mel de *Apis mellifera* independente da região de origem, os valores observados foram de 12,5% e 25%, para o teste bacteriostático de Concentração Inibitória Mínima (CIM). A levedura *Candida albicans* se mostrou mais sensível que as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, com exceção para as amostras da região oeste, em que *S. aureus* teve maior sensibilidade, pois quanto menor a quantidade de mel necessária para inibir o crescimento do microrganismo melhor é a funcionalidade daquele mel. (Tabela 2).

Resultados semelhantes foram descobertos por Chan-Rodrigues et al. (2012), que observaram para *S. aureus* e *E. coli*, inibição entre 15 e 31%, que contrapõem

dos encontrados por Cruz et. al. (2014), que para *E. coli* e *S. aureus* encontraram CIM foi de 7%, e de 40% para *C.albicans* muito inferior a encontrada nesse experimento. Kuncic, Jaclic, Lapanje e Gunde-Cimerman (2012), analisaram amostras de mel eslovenos de diversas origens florais e observaram CIM de 2,5 % contra *S. aureus*, e de 0,0% para *C. albicans*, neste trabalho o CIM para as bactérias foi de 25% com excessão a região oeste e para a levedura o mel testado não apresentou resultados satisfatórios, demonstrando que as amostras testadas das diferentes regiões do Paraná tem efeito negativo em relação a levedura *C. albicans*.

Pesquisadores da Queen Margaret University, Edimburgo, estudando a atividade antimicrobiana de um mel escocês, chamado mel de Portobello e do mel de Manuka em concentrações entre 0 a 70% contra *S. aureus*, *E. Coli*, observaram que somente concentrações de 50 e 70% inibiam a maioria das bactérias testadas (SCHNEIDER, COYLE, WARNOCK, GOW e FYFE, 2013). Estes resultados foram superiores aos encontrados nesse experimento, independente da região.

Em relação a Concentração Bactericida Mínima (CBM), foram observados que em todas as regiões estudadas os resultados foram semelhantes ao CIM, com exceção da levedura *C.albicans* que mostrou maior resistência em relação as bactérias, OSÉS et. al. (2015), analisaram a atividade bactericida de amostras de mel de diferentes localidades, verificaram para CIM e CBM 10% em relação microrganismo *S. aureus*. Resultados inferiores ao desse experimento que os valores para CIM foi de 12,5 % à 25% e CBM de 25% à 50% entre as regiões coletadas.

Esses resultados podem estar relacionados às origens regionais, como tipo de vegetação e épocas de floração, e a perda de atividade antibacteriana com o processamento e manuseio do mel (IRISH, BLAIR e CARTER, 2011). Como também os diferentes microrganismos utilizados no experimento, cada microrganismo tem características específicas e mostram comportamento diferente em relação a cada mel. As leveduras possuem parede celular complexa semelhante à dos eucariotos, essa característica a protege evitando a lise osmótica do protoplasto e bloqueando o ingresso de moléculas tóxicas que possam degradar sua parede celular (FUKUDA et. al. 2009). Tais características podem ter contribuído para diferença significativa entre CIM e CBM em relação a *C. albicans* nesse experimento.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos para CIM e CBM expressaram que há diferença entre as amostras de mel coletadas, a ação bactericida e bacteriostática se diferiram com mais intensidade em relação a levedura *Candida albicans*, a qual se mostrou mais resistente que as bactérias.

Conclui-se portanto, que o mel pode ser considerado um agente bactericida e bacteriostático, tendo alto potencial biotecnológico.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANGADEN, G. J. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 25, n. 1, p. 201-225, 2011.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; GASPARRINI, M.; FORBES-HERNÁNDEZ, T. Y.; MAZZONI, L.; GIAMPIERI, F. The composition and biological activity of honey: a focus on manuka honey. **Foods Science Journal**, v. 3, p. 420-432, 2014.

AL-WAILI, N. S.; SALOM, K.; BUTLER, G.; AL GHAMDI, A. A. Honey and microbial infections: a review supporting the use of honey for microbial control. **Journal Medical Food**, v. 14, n. 10, p. 1079–1096, 2011.

BACAXIXI, P.; BUENO, C.; RICARDO, H.; EPIPHANIO, P. D.; SILVA, D. P.; BARROS B. M. C.; SILVA, T. F.; BOSQUE G. G.; LIMA, F. C. C. Importância da apicultura no Brasil. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 10, n. 20, 2011.

BANSAL, V., MEDHI, B., & PANDHI, P. (2005). Honey – A remedy rediscovered and its therapeutic utility. *Kathmandu University Medical Journal*, 3(305).

BAZONI, M. O.; 2012. **Atividade antimicrobiana dos méis produzidos por *Apis Mellifera* e abelhas sem ferrão nativas do Brasil**. 116 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

BORSATO, Débora. M.; ESMERINO, Luís. A.; FARAGO, Paulo. VITOR.; MIGUEL, Marilis. D.; MIGUEL Obdulio. G. Atividade antimicrobiana de méis produzidos por meliponíneos nativos do Paraná (Brasil). **B.CEPPA**. Curitiba, v. 31, n. 1, p. 57-66, jan./jun. 2013.

BUCEKOVA, M.; JURICOVA, V.; MONTON, E.; MARTINOTTI, S.; RANZATO, E.; MAJTAN, J. Microwave processing of honey negatively affects honey antibacterial activity by inactivation of bee-derived glucose oxidase and defensin-1. **Food Chemistry**, v. 240, p.1131–1136, 2018.No prelo

BULIGON, Catiele.; PEGORARO , Nara.; BERSCH, Patrícia.; SALAZAR, Rodrigo F. dos S .; SALAZAR Ludmila. N. An investigation into the fraudulent use of honey in northwestern Rio Grande do Sul. *Disciplinarum Scientia*. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v. 16, n. 2, p. 213-220, 20

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Termo de cooperação nº 37.** Controle interno da qualidade para testes de sensibilidade a antimicrobianos. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, pecuária e Abastecimento. Defesa Animal. Legislações. Legislação por Assunto. Legislação de Produtos Apícolas e Derivados. Instrução Normativa n. 11, de 20 de outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel. (2000). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/sda/dipoa/in_11_2000.htm>. Acesso em 18 de outubro de 2018.

BRUDZYNSKI, K., ABUBAKER, K., & MIOTTO K. (2012) Unraveling a mechanism of honey antibacterial action: Polyphenol/H₂O₂-induced oxidative effect on bacterial cell growth and on DNA degradation. *Food Chemistry*, 133(2), 329-336.

BRUDZYNSKI, K.; ABUBAKER, K.; MIOTTO, K. Unraveling a mechanism of honey antibacterial action: Polyphenol/H₂O₂-induced oxidative effect on bacterial cell growth and on DNA degradation. **Food Chemistry**, v. 133, p. 329-336, 2012.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard-Tenth Edition. Wayne, CLSI document M02-A10.

CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Norma M27-A2. (2002). Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. 2.ed. Pennsylvania: NCCLS, 51p.

COUTO, R.H.N.; COUTO, L.A. Apicultura: manejo e produtos. Jaboticabal-SP: FUNEP, 2002. 191p.

CRUZ, A.; B.; N. PIERI, F.; A. ZILSE-CARVALHO, G.; A. ORLANDI, P.; P. NUNES-SILVA, C.; G. LEONIL, L. Atividade antimicrobiana de méis de Duas Espécies de abelhas sem ferrão e *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) contra microrganismos patogênicos. **Acta Amazônica**. Manaus, v.44, n.2, 2014.

ETERAF-OSKOU EI, T., & NAJAFI, M. (2013). Traditional and modern uses of natural honey in human diseases: a review. *Iran Journal Basic Medical Sciences*, 16(6), 731-742.

EWNETU, Y.; LEMMA, W.; BIRHANE, N. Antibacterial effects of *Apis mellifera* and

stingless bees honeys on susceptible and resistant strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* in Gondar, Northwest Ethiopia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 269, p. 1-7, 2013.

FUKUDA, E. K., VASCONCELOS, A. F. D., MATIAS, A. C., BARBOSA, A. M., DEKKER, R. F. H., & SILVA, M. L. C. (2009). Fungal cell wall polysaccharides: purification and characterization, *Semina: Ciências Agrárias*, 30(1), 17-134.

FRANCO, B. D. G. de M., LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

GOIS, G. C., LIMA, C. A. B., SILVA, A. L. T., & Evangelista-Rodriguez, A. (2013). Composição do mel de *Apis mellifera*: requisitos de qualidade. *Acta Veterinária Brasileira*, 7(2), 137-147.

HEGAZI, A. G.; AL GUTHAMI, F. M.; AL GETHAMI, A. F. M.; ALLAH, F. M.; SALEH, A. A.; FOUAD, E. A. Potential antibacterial activity of some Saudi Arabia honey. **Veterinary World**, v. 10, n. 2, p. 233-237, 2017.

HUSSAIN, M. B. Role of honey in topical and systemic bacterial infections. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, p. 1-10, 2017.

IRISH, I., BLAIR, S., & CARTER, D. A. (2011). The antibacterial activity of honey derived from Australian flora, *Plos One*, 6 (3).

KUNCIC, M. K., JAKLIC, D., LAPANJE, A., & GUNDE-CIMERMAN, N. (2012). Antibacterial and antimycotic activities of Slovenian honeys. *British Journal Biomedical Science*, 69(4), 154-158.

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.

MORGAN, J.; MELTZER, M. I.; PLIKAYTIS, B.D.; SOFAIR, A. N.; HUIE-WHITE, S.; WILCOX, S. (2005). **Excess mortality, hospital stay, and cost due to candidemia: a casecontrol study using data from population based candidemia surveillance**. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v.26, p.54-547.

McLOONE, P.; WARNOCK, M.; FYBE, L. Honey: a realistic antimicrobial for skin

disorders. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 49, n. 2, p. 161-167, 2016.

NONAKA, C. F. W. NASCIMENTO, G. J.F.; GOULART-FILHO, J. A. V.; LIMA, K. C.; MILAN, E. P. *Candida dubliniensis*–levedura emergente associada à candidíase oral. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 37, n. 2, p. 125-132, 2008.

Organização Mundial de Saúde (OMS) - **OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente** – 2017. Disponível em: http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:omspublica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novosantibioticosurgente&Itemid=812. Acesso em Outubro de 2018.

Organização Mundial de Saúde (OMS) - **OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente** – 2017. Disponível em: http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5357:omspublica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novosantibioticosurgente&Itemid=812. Acesso em Novembro de 2018.

OSÉS, S. M., PASCUAL-MATÉ, A., FERNÁNDEZ-MUIÑO, M. A., LÓPEZ-DÍAZ, T. M., & SANCHO, M. T. (2016). Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chemistry*, 196, 1215-1223.

PEMÁN, J.; ZARAGOZA, R.; QUINDÓS, G.; ALKORTA, M.; CUÉTARA, M. S.; CAMARENA, J. J.; RAMIREZ, P.; GIMÉZEZ, M. J.; MARTIN-MAZUELOS, E.; LINARESSICILIA, M. L.; POTÓN, J. Clinical factors associated with a *Candida albicans* germ tube antibody positive test in intensive care unit patients. **BMC infectious diseases**, v. 11, n. 1, p. 60, 2011.

RACOWSKI, I.; SILVAS, F.P.C.; TAKUSHI, D.T.T.; SILVA, D.W.G.; MIRANDA, P.S. 2007. Ação antimicrobiana do mel em leite fermentado. **Revista Analytica**, 30, 115 – 117.

SALONEN, A.; VIRJAMO, V.; TAMMELA, P. FAUCH, L.; JULKUNEN-TIITTO, R. Screening bioactivity and bioactive constituents of Nordic unifloral honeys. **Food Chemistry**, v. 237, p. 214-224, 2017.

SAMARGHANDIAN, S.; FARKHONDEH, T.; SAMINI, F. Honey and health: a review of recent clinical research. **Pharmacognosy Research**, v. 9, n. 2, p. 121–127, 2017.

SANTOS, A. dos L.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H.C. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.43, n.6, 2007.

SEREIA, M. J., PERDONCINI, M. R. F. G., MARÇO, P. H., PARPINELLI, R. S., LIMA, E. G. L., & ANJO F. A. (2017a). *Honey Analysis*. (1º ed.) Croácia: Intech, (Capítulo 09).

SEREIA, M. J., PERDONCINI, M. R. F. G., MARÇO, P. H., PARPINELLI, R. S., LIMA, E. G. L., & ANJO F. A. (2017b). *Honey Analysis*. (1º ed.) Croácia: Intech, (Capítulo 12).

SCHNEIDER, M., COYLE, S., WARNOCK, M., GOW, I., & FYFE, L. (2013). Anti-microbial activity and composition of Manuka and Portobello honey. *Phytother Research*, 27(8), 1162-1170.

SHERLOCK, O.; DOLAN, A.; ATHMAN, R.; POWER, A.; GETHIN, G.; COWMAN, S. Comparison of the antimicrobial activity of ulmo honey from Chile and manuka honey against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 10, n.2, p. 10-47, 2010.

TODAR, K. Web Review Online Textbook of Bacteriology. "The Good, the Bad, and the Deadly". **Science Magazine**, v. 304, p. 1421, 2004.