

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Avaliação da atividade antimicrobiana de méis e
água-mel**

Carina Isabel da Silva

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Prof. Doutora Maria Leonor Faleiro e Prof. Doutora Maria da
Graça Miguel

2013

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Avaliação da atividade antimicrobiana de méis e
água-mel**

Carina Isabel da Silva

Dissertação

Mestrado Integrado em Engenharia Biológica

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Prof. Doutora Maria Leonor Faleiro e Prof. Doutora Maria da
Graça Miguel

2013

Avaliação da atividade antimicrobiana de méis e água-mel

Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Copyright:

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

À professora doutora Maria Leonor Faleiro pela orientação, por exigir o meu melhor mas dar o seu melhor, pelo acompanhamento, ensinamentos e paciência.

À Elsa, por me receber de braços abertos quando cheguei ao laboratório (fora da área de conforto) e me fazer sentir em “casa”.

À Joana, pela amizade, ajuda no decorrer desta tese; companhia nas horas de trabalho e por me confortar quando as coisas não eram tão “cor-de-rosa”.

À Liseta que rapidamente passou de colega de laboratório a “tia” e que levo no coração.

Às minhas amigas Daniela Coelho, Cátia Pires, Ana Nunes, Ana Caramelo, Ana Matos e Jaqueline por serem o meu Xanax, por me garantirem que ia conseguir e me ouvirem sempre. Nos momentos mais difíceis estiveram lá. Obrigado.

Ao Ricardo por todo o amor, amizade mas acima de tudo compreensão; por ter sido o meu pilar e o meu porto seguro.

Às minhas tias, tios e primas que foram essenciais à minha adaptação nos primeiros anos.

À minha avó, por toda ajuda nestes anos de cursos, pelo amor incondicional e por nunca mas nunca duvidar que conseguia.

À minha mãe, por todos os sacrifícios, pelo amor, palavras de conforto, mimos e motivação. Uma guerreira, não fosse da terra da grande Maria da Fonte. O meu maior obrigado.

Resumo

O mel é conhecido desde a antiguidade não só pelas suas propriedades nutricionais, mas também pelas suas propriedades medicinais. A emergência de estirpes resistentes aos antibióticos tem levado à exploração de agentes alternativos. A utilização do mel no controlo de infeções sob esta ótica está presentemente sob intensa investigação.

A capacidade antibacteriana de três tipos de méis monoflorais e duas amostras de água-mel da região do Algarve foi determinada pelo método de microdiluição. O crescimento das estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes e não resistentes à meticilina e das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium bovis* foi inibido a concentrações de 25 % e a 50% (p/v).

Os méis e as amostras de água-mel testados também inibiram a aderência das bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* em cerca de $31,33\% \pm 3,08$ - $81,04\% \pm 1,23$ e $32,51 \pm 0,21$ - $73,20\% \pm 0,52\%$, respetivamente.

O impacto dos méis na virulência das estirpes de *S. aureus* e *P. aeruginosa* foi avaliada recorrendo ao modelo *Galleria mellonella*. A sobrevivência das larvas injetadas com as células de *S. aureus* tratadas com os méis foi afetada. Não se registam diferenças significativas na sobrevivência das larvas injetadas com as células de *P. aeruginosa* após tratamento com os méis. Neste estudo foi também avaliada a atividade anti-inflamatória dos méis e água-mel mediante avaliação da atividade enzimática da hialuronidase e lipoxigenase. As percentagens de inibição variaram entre $5,42\% \pm 0,22$ - $94,33\% \pm 5,67$ para a hialuronidase e $55,59\% \pm 0,24$ - $96,57\% \pm 0,77$ para a lipoxigenase.

Os méis e as amostras de água-mel analisados apresentaram propriedades anti-inflamatórias, inibiram o crescimento bacteriano e a sua capacidade de aderência, bem como a virulência de estirpes resistentes. Estes produtos com impacto económico na região do Algarve tem um valor acrescido pelas suas propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias.

Palavras-chave: Mel, água-mel, atividade antibacteriana, atividade anti-inflamatória, biofilme, *Galleria mellonella*.

Abstract

Honey is known not only for its nutritional proprieties but also for its medicinal properties since ancient times. The emergence of antibiotic resistant strains has led to explore alternative agents. The use of honey in the control of infections from this perspective is currently under intense investigation.

The antibacterial ability of three types of monofloral honeys and two “água-mel” samples from Algarve region was determined by the microdilution method. The growth of strains of *Staphylococcus aureus* resistant and non-resistant to methicillin, *Pseudomonas aeruginosa* and *Mycobacterium bovis* was inhibited at concentrations of 25% (w/v) and 50% (w/v).

In addition to inhibit the bacterial growth the tested honeys also inhibited the adherence of *S. aureus* and *P. aeruginosa* that ranged from $31.33\% \pm 3.08$ to $81.04\% \pm 1.23$ and $32.51\% \pm 0.21$ to $73.20\% \pm 0.52$, respectively.

The impact of honeys and “água-mel” on virulence of *S. aureus* and *P. aeruginosa* strains was evaluated using the *Galleria mellonella* model. The survival of larvae injected with the *S. aureus* cells treated with the honeys samples was affected. No differences on the larvae survival was found when the *P. aeruginosa* cells treated with honeys were used to inject the larvae. The anti-inflammatory activity of honey and water-honey through enzymatic activity of hyaluronidase and lipoxygenase was also estimated. The inhibition percentages ranged from $5.42\% \pm 0.22$ to $94.33\% \pm 5.67$ and $55.59\% \pm 0.24$ to $96.57\% \pm 0.77$ for hyaluronidase and lipoxygenase, respectively.

The analyzed samples of honey and “água-mel” showed anti-inflammatory proprieties, were able to inhibit the bacterial growth and as well the virulence of resistant strains. These products with economic impact in the Algarve region have a plus value due to their antibacterial and anti-inflammatory proprieties.

Key words: Honey, honey-water, antibacterial activity, anti-inflammatory activity, biofilm, *Galleria mellonella*.

Abreviaturas

AASACV - Associação dos Apicultores do Sudoeste Alentejano e Costa Vicentina

BAP - *biofilm-associated protein*.

DNA – Ácido desoxirribonucleico.

DOP - Origem protegida de mel.

FNAP - Federação Nacional dos Apicultores de Portugal.

h- horas.

LOX – Lipoxigenase.

MIC – Concentração mínima inibitória.

Min – minutos.

mL – Mililitro.

MRSA- *S. aureus* resistentes à metilina.

MSCRAMM - *Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*.

nm – Nanómetro.

ORSA - *S. aureus* resistentes à oxacilina.

p/v – Peso/volume.

PBS – Tampão fosfato salino.

ufc- Unidades formadoras de colónias.

VRE - *Enterococci* resistentes à vancomicina.

µg – Micrograma.

Índice

| | |
|--|-----|
| Agradecimentos..... | iv |
| Resumo..... | v |
| Abstract | vi |
| Abreviaturas | vii |
| Capítulo I..... | 1 |
| 1.1. Mel | 1 |
| 1.1.1. Definição | 1 |
| 1.1.2. Perspetiva Histórica..... | 1 |
| 1.1.3. Fabrico do mel..... | 2 |
| 1.1.3.1. Produção de mel em Portugal e na Europa..... | 2 |
| 1.1.3.2. Hidratos de carbono | 5 |
| 1.1.3.3. Água | 5 |
| 1.1.3.4. O valor de pH..... | 5 |
| 1.1.3.5. Proteínas | 6 |
| 1.1.3.6. Vitaminas e minerais..... | 6 |
| 1.1.3.7. Compostos fenólicos e aromáticos | 6 |
| 1.1.4. Propriedades medicinais..... | 7 |
| 1.1.5. Propriedades antimicrobianas..... | 8 |
| 1.1.5.1. Efeito osmótico | 9 |
| 1.1.5.2. Acidez | 9 |
| 1.1.5.3. O teor de Peróxido de Hidrogénio..... | 10 |
| 1.1.5.4. Lisozima | 10 |
| 1.1.5.5. Compostos fenólicos | 10 |
| 1.1.6. Propriedade antioxidante..... | 11 |
| 1.1.7. Propriedade anti-inflamatória..... | 11 |
| 1.2. Água-mel..... | 12 |
| 1.3. Algumas bactérias com importância clínica..... | 13 |
| 1.3.1. A bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> | 13 |
| 1.3.2. A bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 16 |
| 1.3.3. A bactéria <i>Mycobacterium bovis</i> | 17 |

| | | |
|--|--|----|
| 1.4. | Modelos <i>in-vivo</i> para estudo de virulência bacteriana | 19 |
| 1.5. | Objetivos | 20 |
| Capítulo II - Materiais e Métodos | | 22 |
| 2.1. | Material | 22 |
| 2.1.1. | Equipamento..... | 22 |
| 2.1.2. | Meios de cultura | 22 |
| 2.1.3. | Material biológico | 22 |
| 2.1.3.1. | Amostras de mel e água-mel | 22 |
| 2.1.3.2. | Microrganismos..... | 23 |
| 2.2. | Métodos..... | 23 |
| 2.2.1. | Determinação do pH do mel..... | 23 |
| 2.2.2. | Condições de crescimento | 23 |
| 2.2.3. | Avaliação da atividade antimicrobiana por microdiluição | 24 |
| 2.2.3.1. | Preparação da suspensão bacteriana e inoculação das microplacas | 25 |
| 2.2.3.2. | Cálculo da percentagem de inibição..... | 26 |
| 2.2.4. | Avaliação da perda de constituintes | 27 |
| 2.2.4.1. | Preparação da suspensão bacteriana e inoculação..... | 27 |
| 2.2.5. | Inibição da formação de biofilme..... | 27 |
| 2.2.6. | Avaliação do impacto do tratamento com mel e água-mel na virulência bacteriana | 29 |
| 2.2.7. | Atividade anti-inflamatória | 30 |
| 2.2.7.1. | Cálculo da percentagem de inibição das enzimas | 33 |
| 2.2.8. | Tratamento estatístico | 33 |
| Capítulo III- Resultados e Discussão | | 34 |
| 3.1. | Valor de pH das soluções de méis..... | 34 |
| 3.2. | Avaliação da atividade antimicrobiana | 35 |
| 3.2.1. | A suscetibilidade da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> | 35 |
| 3.2.2. | A suscetibilidade da bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 39 |
| 3.2.3. | A suscetibilidade da bactéria <i>Mycobacterium bovis</i> | 42 |
| 3.3. | Avaliação da perda de constituintes em <i>Mycobacterium bovis</i> | 49 |
| 3.4. | Inibição da aderência..... | 50 |
| 3.5. | Avaliação do impacto do tratamento com mel e água-mel na virulência bacteriana ... | 55 |
| 3.6. | Atividade anti-inflamatória | 63 |
| 3.6.1. | Hialuronidase | 63 |

| | |
|-------------------------------|----|
| 3.6.2. Lipoxigenase | 66 |
| Capítulo IV- Conclusões | 68 |
| 4.1. Conclusões | 68 |
| 4.2. Perspetivas futuras..... | 69 |
| Capítulo V- Bibliografia..... | 70 |
| Anexos..... | 76 |

| | |
|---|----|
| Tabela 1.1.1- Produção de mel no ano de 2011. (FAO, 2012)..... | 4 |
| Tabela 1.1.2- Composição química do mel (Bogdanov, et al., 2008). | 4 |
| Tabela 1.1.3- Relação entre pH e percentagem de inibição de crescimento da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> (Bogdanov, 1997). | 10 |
| Tabela 1.3.4- Doenças causadas por infecção de <i>Staphylococcus aureus</i> | 14 |
| Tabela 1.3.5- Fatores de virulência da bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e efeitos biológicos. (Murray, et al., 2005) | 16 |
| Tabela 2.1.6- Origem das bactérias utilizadas neste estudo. | 23 |
| Tabela 2.2.7- Diferentes concentrações de mel e água-mel testados. | 31 |
| Tabela 3.1. 8- Valores de pH das diferentes amostras de méis (preparadas com meio BHI). | 34 |
| Tabela 3.2. 9- Inibição do crescimento de <i>M. bovis</i> na presença de diferentes méis e água-mel determinada ao fim de 7 e 14 dias de incubação | 42 |
| Tabela 3.3.10- Perda de constituintes (DO _{280nm}) da bactéria <i>Mycobacterium bovis</i> na presença de diferentes méis e água-mel. | 50 |
| Tabela 3.6.11- Percentagem de inibição da enzima lipoxigenase na presença de méis e água-mel 2011 de concentração 15 g/L. | 66 |

| | |
|---|----|
| Figura 1.3.1- Estrutura de uma parede celular micobacteriana. A- membrana plasmática, B- peptidoglicano, C- arabinogalactano, D- lipoarabinomanano, E- Proteínas associadas à membrana plasmática, F- ácidos micólicos e G- moléculas de glicolípidos de superfície associadas a ácidos micólicos. (Murray, et al., 2005) | 18 |
| Figura 3.2.2- Suscetibilidade da bactéria <i>S. aureus</i> ATCC 6538 aos méis de rosmaninho, laranja e medronheiro. Os dados são representativos de três réplicas. As barras de erro não são visíveis pois estão cobertas pelo símbolo devido ao seu pequeno tamanho..... | 35 |
| Figura 3.2.3- Suscetibilidade da bactéria <i>S. aureus</i> MRSA 4 aos méis de rosmaninho, laranja e medronheiro. Os dados são representativos de três réplicas. As barras de erro não são visíveis pois estão cobertas pelo símbolo devido ao seu pequeno tamanho..... | 36 |
| Figura 3.2.4- Suscetibilidade da bactéria <i>S. aureus</i> MRSA 4 aos méis de rosmaninho, laranja e medronheiro. Os dados são representativos de três réplicas. As barras de erro não são visíveis pois estão cobertas pelo símbolo devido ao seu pequeno tamanho..... | 37 |
| Figura 3.3.5- Suscetibilidade da bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aos méis de rosmaninho, laranja e medronheiro. Os dados são representativos de três réplicas. As barras de erro não são visíveis pois estão cobertas pelo símbolo devido ao seu pequeno tamanho..... | 39 |
| Figura 3.2.6- Variação da percentagem de inibição do mel de rosmaninho de concentração 50, 25 e 12,5% (p/v) decorridos 7 e 14 dias de crescimento..... | 45 |
| Figura 3.2. 7- Variação da percentagem de inibição do mel de laranja de concentração 50, 25 e 12,5% (p/v) decorridos 7 e 14 dias de crescimento..... | 46 |
| Figura 3.2.8- Variação da percentagem de inibição do mel de medronheiro de concentração 50, 25 e 12,5% (p/v) decorridos 7 e 14 dias de crescimento..... | 47 |
| Figura 3.2.9 - Variação da percentagem de inibição da água-mel 2011 de concentração 50, 25 e 12,5% (p/v) decorridos 7 e 14 dias de incubação..... | 47 |
| Figura 3.3.10- Variação da percentagem de inibição da água-mel 2012 de concentração 50, 25 e 12,5% (p/v) decorridos 7 e 14 dias de crescimento..... | 48 |
| Figura 3.2.11- Variação da percentagem de inibição do peróxido de hidrogénio 0,5% (v/v) decorridos 7 e 14 dias de crescimento..... | 48 |
| Figura 3.2.12. Variação da percentagem de inibição de cloranfenicol 30µg/mL decorridos 7 e 14 dias de crescimento. | 49 |
| Figura 3.4.13- Percentagens de inibição da capacidade de aderência da bactéria <i>S. aureus</i> ATCC 6538 na presença dos diferentes méis e água-mel. Os dados são representativos de três réplicas. As barras de erro representam o desvio-padrão. | 51 |

| | |
|---|----|
| Figura 3.4.14- Percentagens de inibição da capacidade de aderência da bactéria <i>S. aureus</i> MRSA 4 na presença dos diferentes méis e água-mel. Os dados são representativos de três réplicas. As barras de erro representam o desvio-padrão. | 52 |
| Figura 3.4.15- Percentagens de inibição da capacidade de aderência da bactéria <i>S. aureus</i> MRSA 12 na presença dos diferentes méis e água-mel. Os dados são representativos de três réplicas. As barras de erro representam o desvio-padrão. | 52 |
| Figura 3.4.16- Percentagens de inibição da capacidade de aderência da bactéria <i>P. aeruginosa</i> 12 na presença dos diferentes méis e água-mel de concentração 25% (p/v). Os dados são representativos de três réplicas. As barras de erro representam o desvio-padrão. | 53 |
| Figura 3.4.17- Percentagens de inibição da capacidade de aderência da bactéria <i>P. aeruginosa</i> 12 na presença dos diferentes méis e água-mel de concentração 12,5% (p/v). Os dados são representativos de três réplicas. As barras de erro representam o desvio-padrão. | 53 |
| Figura 3.5.18- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe <i>S. aureus</i> ATCC 6538 tratadas (-◆-) com o mel de rosmaninho 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão. | 55 |
| Figura 3.5.19- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe <i>S. aureus</i> ATCC 6538 tratadas (-◆-) com o mel de laranja 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão. | 56 |
| Figura 3.5.20- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe <i>S. aureus</i> ATCC 6538 tratadas (-◆-) com o mel de medronheiro 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão. | 56 |
| Figura 3.5.21- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe <i>S. aureus</i> ATCC 6538 tratadas (-◆-) com água-mel 2012 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão. | 57 |
| Figura 3.5.22- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe MRSA 4 tratadas (-◆-) com mel de rosmaninho 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão. | 58 |
| Figura 3.5.23- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe MRSA 4 tratadas (-◆-) com mel de laranja 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão. | 58 |
| Figura 3.5.24- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe MRSA 4 tratadas (-◆-) com mel de medronheiro 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão. | 59 |

| | |
|--|----|
| Figura 3.5.25- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe MRSA 4 tratadas (-◆-) com água-mel 2012 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão. | 59 |
| Figura 3.5.26- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe MRSA 12 tratadas (-◆-) com o mel de rosmaninho 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão. | 60 |
| Figura 3.5.27- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe MRSA 12 tratadas (-◆-) com o mel de laranja 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão. | 60 |
| Figura 3.5.28- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe MRSA 12 tratadas (-◆-) com o mel de medronheiro 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão. | 61 |
| Figura 3.5.29- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe MRSA 12 tratadas (-◆-) com a água-mel 2012 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão. | 61 |
| Figura 3.6.30- Percentagens de inibição das diferentes diluições da solução de ácido ascórbico (controle). | 63 |
| Figura 3.6.31- Percentagens de inibição da enzima hialuronidase na presença de diferentes méis e água-mel 2011. | 64 |
| Figura 3.6.32- Percentagens de inibição das diferentes diluições da solução de eugenol (controle). | 66 |

Capítulo I

1.1. Mel

1.1.1. Definição

A definição de mel depende da pessoa que o está a definir (Al-Jabri, 2005).

O mel é um produto natural produzido a partir do néctar de plantas e outros açúcares naturais, recolhido e modificado por abelhas do género *Apis* e *Meliponinae* e armazenado nos favos da colmeia. (Namias, 2003); (Al-Jabri, 2005)

Há dois tipos de méis: de apiário e de floresta. O mel de apiário é produzido pelas abelhas do género *Apis cerana* subespécie *indica* e *Apis mellifera* e recolhido por um método de extração moderno, apresentando uma cor mais clara, transparente e isento de outros componentes. O mel do tipo floresta é produzido a partir de enxames silvestres de *Apis dorsata* e de *Apis cerana indica* que é recolhido pelo método grosseiro de compressão do favo de mel. Estes méis apresentam um aspeto turvo devido à presença abundante de pólen, cera, larvas/partes de abelhas e materiais de plantas. E, por isso é necessário proceder à sua filtração (Subrahmanyam, 2007).

Segundo o Decreto-lei n.º 131/85 de 29 de Abril, entende-se por mel a substância açucarada produzida pelas abelhas melíficas (género *Apis mellifera*) a partir do néctar das flores ou das secreções provenientes de outras partes vivas das plantas, ou que sobre elas se encontrem, e que sugam, transformam e combinam com matérias específicas e armazenam nos favos da colmeia.

1.1.2. Perspetiva Histórica

As propriedades medicinais do mel são conhecidas e ocupam um lugar de elevada importância na medicina desde a antiguidade. Estas propriedades estão referenciadas na Bíblia, no Corão, Torá, papiro de Edwin Smith (datado do século 17 a.C.). Foram ainda referenciadas por Hipócrates e Demócrito (Grécia Antiga), Galen (Roma Antiga) e Avicena (tempos medievais) (Namias, 2003); (Zumla et al., 1989).

O mel era usado para o tratamento e prevenção de diversas infeções, desde feridas de pele, queimaduras, infeções urinárias e úlceras (Zumla et al., 1989).

Além das propriedades medicinais do mel, este era também usado por algumas culturas como uma fonte de energia, fazendo parte da sua dieta. Na Bíblia faz-se referência ao uso do mel na alimentação numa passagem do antigo testamento proferida pelo rei Salomão: “ Come mel meu filho, porque o mel é bom”. Até ao ano de 1800 o mel era a fonte de hidratos de carbono mais importante e o produto mais doce disponível (Bogdanov et al., 2008).

1.1.3. Fabrico do mel

A primeira etapa na produção de mel é a recolha do néctar e outros depósitos doces pelas abelhas. (Namias, 2003)

A segunda etapa consiste na digestão enzimática *in vivo* do néctar e depósitos recolhidos. Esta digestão ocorre imediatamente aquando da recolha do néctar e continua nos favos da colmeia. Devido ao calor relativo e à agitação provocada pelas abelhas, o teor de água é reduzido por evaporação até cerca de 17%. Os açúcares presentes no néctar são convertidos em glucose e frutose. Por sua vez, a glucose oxidase converte a glucose em ácido glucónico e peróxido de hidrogénio (Namias, 2003).

Para fins comerciais o mel pode ser sujeito a um aquecimento com o objetivo de inativar as enzimas que facilitam/promovem a sua cristalização. Contudo, este pode ser adquirido no estado não transformado, isto é, pode ser comercializado sem passar por um processo de aquecimento (Namias, 2003).

1.1.3.1. Produção de mel em Portugal e na Europa

O sector apícola em Portugal, tal como no resto da União Europeia, é uma atividade tradicionalmente ligada à agricultura. Na generalidade esta atividade é encarada como um complemento ao rendimento das explorações (GPP, 2010).

Segundo dados do Instituto Nacional de Estatística foram produzidas 6851 toneladas de mel em Portugal no ano de 2012.

O Centro é a região onde se situa um maior número de apicultores (38% do total de apicultores registados); o Algarve e o Alentejo são as regiões do Continente com um menor número de apicultores, mas onde se localizam os apicultores de maior dimensão média com 108,5 e 59,5 colónias por apicultor respetivamente (GPP, 2010).

Em relação às regiões autónomas Açores e Madeira são as regiões de Portugal com menos apicultores, menos apiários e menos colónias (GPP, 2010).

A riqueza e a diversidade em flora melífera de Portugal, quer de espécies silvestres quer de plantas cultivadas, como o castanheiro e o eucalipto, fazem com que exista uma grande diversidade de méis monoflorais ao longo do país, nomeadamente: mel de rosmaninho, urze, castanheiro, alecrim, medronheiro, soagem, poejo, laranjeira, cardo, eucalipto e girassol (GPP, 2010).

Em Portugal, existem reconhecidas nove denominações de origem protegida de mel (DOP). O Regulamento (CE) nº 510/2006 do Conselho da UE, de 20 de Março, refere que, a denominação de origem protegida consiste no “nome de uma região, de um local determinado ou, em casos excepcionais, de um país, que serve para designar um produto agrícola ou um género alimentício: originário dessa região, desse local determinado ou desse país; cuja qualidade ou características se devem essencial ou exclusivamente a um meio geográfico específico, incluindo, os factores naturais e humanos, e cuja produção, transformação e elaboração ocorrem na área geográfica delimitada”. Relativamente aos preços há a referir que os preços são mais elevados do que os praticados exatamente pelas mesmas entidades gestoras para méis não certificados como DOPs (GPP, 2010).

Os méis do Alentejo, Barroso, da Serra da Lousã, da Serra do Monchique, do Parque de Montesinho, da Terra Quente, do Ribatejo Norte, das Terras Altas do Minho e dos Açores têm DOP (GPP, 2010).

Para além da produção em modo convencional, muitos apicultores apostam na produção de mel em modo biológico devido à crescente procura deste tipo de produtos. Contudo, o número de apicultores em modo de produção de mel biológico é ainda reduzido: Norte- 423, Centro- 1058, Lisboa e Vale do Tejo- 9, Alentejo- 802 e Algarve- 0 (GPP, 2010).

O crescente consumo de mel faz com que quer em Portugal, quer nos restantes países da Europa ocorra a importação de mel.

Atualmente, os principais produtores de mel a nível mundial são a China, os Estados Unidos da América, a Argentina, a Turquia e a Ucrânia (FAO, 2012).

Tabela 1.1.1- Produção de mel no ano de 2011. (FAO, 2012)

| País | Produção de mel (toneladas) |
|----------------------------------|--|
| China | 446089 |
| Estados Unidos da América | 67000 |
| Argentina | 59000 |
| Turquia | 94245 |
| Ucrânia | 73000 |

Composição química

A fonte (néctar) usada para a produção do mel, o processo de fabrico e o clima conferem diferentes características como o aroma, sabor, cor e composição. (Al-Jabri, 2005)

O mel é um produto natural complexo constituído, pelo menos, por 181 substâncias. É essencialmente constituído por hidratos de carbono, proteínas, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, polifenóis, carotenoides, produtos da reação de *Maillard*, vitaminas e minerais (Gheldof et al., 2004) ; (Sato et al., 2000).

Tabela 1.1.2- Composição química do mel (Bogdanov et al., 2008).

| | Média (g/100g) |
|--------------------------------|-----------------------|
| Água | 17,2 |
| Frutose | 38,2 |
| Glucose | 31,3 |
| Sacarose | 0,7 |
| Outros dissacarídeos | 5,0 |
| Melecitose | ≤ 0,1 |
| Erlose | 0,8 |
| Outros oligossacarídeos | 3,6 |
| Açúcares totais | 70,7 |
| Minerais | 0,2 |
| Aminoácidos, proteínas | 0,3 |
| Ácidos | 0,5 |
| pH | 3,9 |

1.1.3.2. Hidratos de carbono

Os açúcares constituem cerca de 95% do peso seco do mel. A glucose e frutose são considerados os componentes maioritários e resultam da hidrólise da sacarose (Alvarez-Saurez et al., 2010).

A toma diária de 20 g de mel satisfaz cerca de 3% do valor de energia diária necessária, uma vez que após a ingestão de mel a frutose e glucose são rapidamente transportados para o sangue, podendo ser usados pelo corpo humano como energia (Bogdanov, et al., 2008).

A composição em açúcares pode ser determinada por diferentes métodos cromatográficos, sendo o HPLC (*High-performance liquid chromatography*) o mais utilizado (Bogdanov et al., 2008).

1.1.3.3. Água

A água é, em termos quantitativos, o segundo componente mais importante do mel. O seu teor no mel depende de um número de fatores ambientais durante a produção, tais como a temperatura e humidade dentro da colmeia, condições e tipo de néctar usado e tratamento do mel durante a extração e armazenamento (Manyi-Loh, et al., 2011).

Apenas os méis com menos de 18% de água podem ser armazenados, com pouco ou nenhum risco de fermentação (Bogdanov et al., 2008); (Manyi-Loh et al., 2011).

1.1.3.4. O valor de pH

O valor de pH do mel é normalmente baixo; esta característica é determinante para o sabor (Bogdanov, 2009).

Vários ácidos foram encontrados em méis: glucónico, fórmico, acético, cítrico, láctico, maleico, oxálico, piroglutâmico e succínico. Embora o ácido glucónico (produto da oxidação da glucose) seja encontrado maioritariamente, não contribui para a acidez do mel, uma vez que se encontra na forma de éster, designando-se por lactona (Bogdanov, 2009).

1.1.3.5. Proteínas

O teor em aminoácidos e enzimas é relativamente baixo (cerca de 0,7%); no entanto é muito importante aquando da avaliação da qualidade do mel (Bogdanov et al., 2008); (Manyi-Loh et al., 2011).

Reações cruciais no processo de produção do mel são catalisadas por enzimas. Nomeadamente, a invertase (α -glucosidase) que converte a sacarose em glucose e frutose. Outro exemplo é a oxidação da glucose, por ação a glucose oxidase, em ácido glucónico e peróxido de hidrogénio. Dextrina e maltose são produzidas a partir de cadeias longas de amido ou de glicogénio pela atividade da enzima amílase (Bogdanov, 2009).

As enzimas diastase e invertase desempenham um papel importante para a avaliação da qualidade do mel e são utilizadas como indicadores do grau de frescura do mel (Bogdanov, 2009).

Estão presentes no mel cerca de 18 aminoácidos essenciais e não essenciais. Prolina é o aminoácido maioritário seguido da lisina. As quantidades relativas de cada aminoácido variam com a origem do mel (Iglesias et al., 2004).

1.1.3.6. Vitaminas e minerais

As vitaminas (tiamina, riboflavina e niacina), minerais (fósforo, enxofre e cálcio) e componentes vestigiais (níquel, bário e crómio) dependem do tipo de néctar e da localização geográfica (Manyi-Loh et al., 2011).

Com base nas várias funções biológicas conhecidas e desconhecidas das vitaminas, minerais e elementos vestigiais, estes desempenham um papel fundamental nas atividades biomédicas relacionadas com o mel (Bogdanov et al., 2008).

1.1.3.7. Compostos fenólicos e aromáticos

Os compostos voláteis são responsáveis pelo aroma do mel. Estes compostos podem ter origem na planta da qual o néctar foi retirado pelas abelhas ou adicionados pelas abelhas. Estes compostos pertencem a diferentes famílias químicas: cetonas, aldeídos, ácidos, ésteres e terpenos (Manyi-Loh et al., 2011).

Os compostos voláteis podem funcionar como “impressões digitais” uma vez que através da sua identificação sabe-se a origem botânica do mel.

O aroma também permite a detecção de adulteração do produto e a sua qualidade organolética, sendo por isso uma das características mais importantes (Alvarez-Saurez et al., 2010).

Metabolitos secundários derivados das plantas, como ácidos fenólicos e polifenóis, são potenciais marcadores bioquímicos para autenticação geográfica do mel e conferem-lhe propriedades antioxidantes. Ácidos benzóico e cinâmico, flavanonas são exemplos de ácidos fenólicos e flavonóides, respetivamente. O teor em flavonoides influencia a cor do mel; méis com maior concentração de flavonoides apresentam uma cor mais escura (Bogdanov et al., 2008) ; (Gheldof et al., 2004).

1.1.4. Propriedades medicinais

O mel é usado com propósitos médicos desde a antiguidade. No entanto, com a descoberta dos antibióticos o seu uso foi diminuindo. Recentemente o recurso à medicina tradicional e sistemas de tratamento complementares de origem natural aumentou. Produtos naturais voltaram a ser alvo de grande atenção por parte da comunidade médica e científica e recorre-se ao seu uso como complemento da terapêutica convencional, com a utilização de antibióticos ou antissépticos (Bogdanov 2012); (Lusby et al., 2002).

A aceitação do mel como agente de tratamento de úlceras e feridas da pele tem vindo a aumentar (Mandal et al., 2011).

No caso de feridas na pele, o mel oferece uma atividade antibacteriana, mantém um ambiente húmido e apresenta uma elevada viscosidade, funcionando como uma barreira que impede o alastramento da infeção e promove a cura da ferida (Mandal et al., 2011).

No tratamento de úlceras pépticas e gastrites o mel promove a reparação da mucosa intestinal e funciona como um agente anti-inflamatório (Mandal et al., 2011).

O mel Manuka (originário da Austrália e Nova Zelândia) e outros méis de pasto são capazes de estimular os monócitos, precursores de macrófagos, para segregar o fator de necrose tumoral (TNF- α). A secreção de TNF pelos macrófagos pode também ser induzida por proteínas glicosiladas. Esta citocina é conhecida por induzir o mecanismo

de reparação de feridas. Além disso, o mel possui a capacidade de reduzir a "libertação intermediários reativos", podendo limitar os danos nos tecidos danificados por macrófagos ativados durante o processo de cicatrização das feridas (Mandal et al., 2011).

1.1.5. Propriedades antimicrobianas

A atividade antibacteriana do mel foi reportada pela primeira vez por Van Ketel em 1982. Estudos mais intensivos não foram feitos até 1937 (Bogdanov, 1997) ; (Molan, 1992).

Os fatores associados à capacidade antibacteriana do mel são a sua elevada osmolaridade, acidez, presença de peróxido de hidrogénio, lisozima, compostos fitoquímicos (metilglioxal), produtos da reação de *Maillard*, compostos fenólicos e flavonoides. (Bogdanov 1997); (Taormina et al., 2001); (Brudzynski et al., 2011)

Recentemente foi reportada a capacidade do mel degradar o DNA plasmídico e genómico bacteriano (Brudzynski et al., 2011).

O espectro de ação do mel é bastante vasto, constando na bibliografia um número elevado de bactérias patogénicas com características morfológicas e fisiológicas bastante distintas que apresentam suscetibilidade ao mel. Tem uma função bacteriostática e bactericida em bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e em fungos (Nasir et al., 2010) ; (Nicolaas et al., 2008). Alguns exemplos de bactérias que apresentam suscetibilidade a diferentes méis são *Proteus* spp., *Serratia marcescens*, *Vibrio cholerae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica serovar Typhi*, *M. tuberculosis* e *Escherichia coli* (Mandal et al., 2011).

A ação antibacteriana do mel é também bastante eficaz em estirpes bacterianas resistentes e multi-resistentes. Cooper et al., (2000) demonstrou a suscetibilidade de 20 estirpes bacterianas de *Burkholderia cepacia* ao mel Manuka; os valores de MIC obtidos para as várias estirpes foi foram diferentes. O mel Manuka apresenta um eficácia elevada em estirpes de *S. aureus* resistentes à metilicina e oxacilina (ORSA) e *Enterococci* resistentes à vancomicina (VRE) (Mandal et al., 2011); (Jenkins et al., 2012).

Um aspeto de elevado interesse é a possibilidade de sinergia entre os antibióticos e o mel. Jenkins et al., (2012) verificou que o tratamento com o mel Manuka aumentava a suscetibilidade de MRSA à oxacilina.

Várias estirpes de *P. aeruginosa* multirresistentes e *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* recolhidas de queimaduras de paciências foram testadas quanto à sua suscetibilidade ao mel, sendo classificadas como suscetíveis (Glasser et al., 2012).

1.1.5.1. Efeito osmótico

Dos compostos sólidos que constituem o mel cerca de 84% são uma mistura de frutose e glucose, fazendo do mel uma solução supersaturada de açúcares, tendo apenas na sua composição 15-21% de água. A atividade das moléculas de açúcar com a água é elevada, não havendo água disponível para ser usada pelos microrganismos no seu crescimento (Molan, 1992).

O teor de água “livre” pode ser medido e designa-se por atividade da água. Embora algumas leveduras possam crescer em méis em que o teor de água é um pouco mais elevado, o valor de atividade da água é relativamente baixo, dificultando o seu crescimento (Molan, 1992).

O crescimento da maioria das bactérias, incluindo *Staphylococcus aureus* que é bastante tolerante a baixas atividades da água, é inibido pelo mel (Molan, 1992).

Apesar dos fungos serem mais tolerantes que as bactérias a valores de atividade da água baixos também têm o seu crescimento inibido pelo mel. Isto sugere que a atividade antibacteriana não pode ser apenas avaliada pelo teor em açúcares de um mel (Molan, 1992).

1.1.5.2. Acidez

O primeiro fator apontado como responsável pela capacidade antibacteriana do mel foi o seu pH baixo (3,2 - 4,5). A sua acidez deve-se à presença de alguns ácidos, sendo o ácido glucónico o encontrado em maior quantidade. (Molan, 1992)

Foram realizados estudos para avaliar a relação entre o pH e a capacidade antibacteriana dos méis e não foi encontrada qualquer relação. (Molan, 1992)

O mel é uma mistura complexa e alguns dos componentes que o constituem têm um efeito tampão; o conteúdo em ácidos pode ser elevado , no entanto o valor de pH pode não ser tão baixo como seria de esperar. Um exemplo deste efeito é ilustrado na tabela III (Bogdanov, 1997).

Tabela 1.1.3- Relação entre pH e percentagem de inibição de crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* (Bogdanov, 1997).

| Mel | pH | Ácidos livres | Ácidos totais | %inibição |
|---------------|-----|---------------|---------------|-----------|
| Acácia | 3,9 | 1,14 | 1,97 | 57 |
| Flor | 4,1 | 1,44 | 2,27 | 56 |
| Castanha | 5,4 | 0,58 | 1,01 | 56 |
| Dente-de-leão | 4,4 | 0,65 | 0,89 | 66 |
| Eucalipto | 4,4 | 1,10 | 1,78 | 40 |
| Lavanda | 3,4 | 2,18 | 3,80 | 64 |
| Laranja | 3,8 | 0,99 | 1,71 | 47 |
| Colza | 3,9 | 0,93 | 2,01 | 74 |
| Rododendro | 3,7 | 0,86 | 1,51 | 37 |
| Girassol | 3,7 | 1,49 | 2,51 | 58 |
| Melada | 4,4 | 2,24 | 2,96 | 67 |

1.1.5.3. O teor de Peróxido de Hidrogénio

Alguns autores apontam o peróxido de hidrogénio como o agente antibacteriano mais importante presente no mel (Bogdanov, 1997)

O peróxido de hidrogénio é formado, na presença de água, pela oxidação da glucose – reação catalisada pela glucose oxidase. Portanto, a quantidade de peróxido de hidrogénio e consequentemente a atividade bacteriana depende da atividade enzimática (Molan, 1992); (Namias, 2003).

A atividade do composto peróxido de hidrogénio é sensível à luz e ao calor, podendo ser afetada durante o armazenamento do mel (Bogdanov, 1997).

1.1.5.4. Lisozima

A lisozima é uma enzima com atividade bactericida uma vez que degrada certos hidratos de carbono, incluindo o peptidoglicano presente nas paredes celulares.

Esta enzima foi encontrada no mel contribuindo para a capacidade antibacteriana do mel (Molan, 1992).

1.1.5.5. Compostos fenólicos

Existe uma enorme variação nos resultados de fatores antibacterianos não-peróxidos presentes no mel; assim como a sua importância quantitativa na atividade antibacteriana do mel (Bogdanov, 1997).

Os compostos polifenólicos são poderosos pró-oxidantes na presença de fontes de oxigénio (H_2O_2 / O_2) e iões de metálicos (Fe (II) e Cu (II)). A degradação do DNA

é induzida por radicais fenoxil e hidroxil. Estes radicais formam-se por auto-oxidação dos polifenóis (em presença de H_2O_2) e a reação de Fenton (na presença de íões metálicos) (Brudzynski et al., 2011).

A concentração de polifenóis no mel é um fator determinante na ação destes compostos como antioxidantes ou pró-oxidantes. Verifica-se uma atividade antioxidante quando a concentração de polifenóis é elevada; quando é reduzida os polifenóis desempenham uma atividade pró-oxidante (Brudzynski et al., 2011).

1.1.6. Propriedade antioxidante

Dizer que o mel tem uma ação antioxidante significa que o mel tem a capacidade de reduzir as reações de oxidação que ocorrem no ser humano, diminuindo assim a formação de radicais (descritos em 1.1.6.5.). Em geral, méis escuros têm uma capacidade antioxidante mais elevada (Baltrusaityte, et al., 2007).

Compostos como flavonoides e outros polifenóis têm o potencial de dificultar a formação de radicais (Alvarez-Suarez et al., 2010; (Manyi-Loh et al., 2011). Foi demonstrado que o extrato fenólico do mel em comparação com o mel bruto apresenta uma maior atividade antioxidante o que evidencia a sua forte contribuição na atividade antioxidante do mel (Ferreira et al., 2009).

Portanto, pode dizer-se que a propriedade antioxidante do mel está em parte relacionada com a capacidade anti-inflamatória (Manyi-Loh et al., 2011).

1.1.7. Propriedade anti-inflamatória

A inflamação é uma reação normal do corpo humano a uma infeção ou ferida. No entanto se a resposta for exagerada pode atrasar a cicatrização ou até mesmo piorar a infeção. Entende-se por resposta exagerada a formação de radicais livres de forma excessiva. Esta formação é despoletada por alguns tipos de leucócitos ativados durante o processo inflamatório (Al-Jabri, 2005) ; (Pala et al., 2008).

Os radicais livres podem causar danos severos e quebrar lípidos, proteínas e ácidos nucleicos que são essenciais para o funcionamento celular (Van der Berg, et al., 2008). A administração de mel num modelo inflamatório da colite é eficaz devido a capacidade do mel prevenir a formação de radicais livres pelo tecido inflamado (Bilsel et al., 2002).

1.2. Água-mel

A água-mel é um subproduto do mel que tem sido produzido essencialmente na zona do Algarve e Alentejo e até ao presente ainda não tem muita visibilidade no mercado português, uma vez que os estudos de caracterização e avaliação da sua segurança alimentar até muito recentemente eram inexistentes. A água-mel é utilizada na confeção de bolos e doces, e atualmente tem sido utilizada por chefes de cozinha em pratos sofisticados conferindo um toque de requinte. Para além das suas aplicações na culinária são conhecidos na medicina popular os seus benefícios no tratamento de constipações, infeções das vias respiratórias e cutâneas. De modo a eliminar as lacunas no conhecimento sobre este produto foi elaborado o projeto no âmbito do programa Apícola Nacional 2011-2013, Medida 6A “Caraterização Qualitativa da Água-Mel para a sua valorização a nível nacional” executado com a participação da Universidade do Algarve, a Federação Nacional dos Apicultores de Portugal (FNAP) e a Associação dos Apicultores do Sudoeste Alentejano e Costa Vicentina (AASACV) onde se pretendeu realizar a caracterização química da água-mel, avaliar a qualidade microbiológica e as propriedades biológicas, em particular as propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anti-virais.

O processo de produção de água-mel consiste na remoção dos resíduos das ceras dos opérculos que contêm ainda quantidades remanescentes de mel, própolis e pólen através de lavagem com água a cerca de 70-75°C. A água recolhida é depois sujeita a um tratamento térmico durante algumas horas (entre 8 a 10 h) até à obtenção de um produto mais ou menos viscoso de cor castanho escuro. Em Portugal este produto é denominado de água-mel e em Itália, na região da Sardenha este produto obtido por um procedimento muito semelhante é denominado de abbamel (Miguel et al. 2013 a,b; Spano et al., 2008).

De acordo com os resultados obtidos por Miguel et al., (2013b) a água-mel revelou possuir uma qualidade microbiológica adequada ao consumo humano, todavia não é aconselhável o seu consumo a crianças com idades inferiores a 2 anos, tal como ocorre para o mel, uma vez que é possível a ocorrência de esporos de *Clostridium botulinum*. Nos estudos conduzidos por Miguel et al (2013 b,c) foram avaliadas as características físico-químicas e as actividades antimicrobianas, antivirais e antioxidantes. Os

resultados obtidos nestes estudos apontam para uma boa correlação entre a atividade antioxidante e o teor de pigmentos castanhos (meloidinas) em contraste com o teor de fenóis. Em relação à atividade antimicrobiana a água-mel revelou ter atividade contra as bactérias Gram positivas e Gram negativas atingindo a concentrações superiores a 20% (p/v) valores de inibição de crescimento bacteriano entre 80 a 100%. A atividade antifúngica testada contra as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* foi eficaz. O menor valor de inibição do crescimento da levedura *C. albicans* na concentração de 20% (p/v) foi de 57,07%±1,04 ao passo que a levedura *S. cerevisiae* a esta concentração teve uma promoção do crescimento para algumas amostras o que foi explicado pela sua elevada resistência a valores elevados de osmolaridade. As amostras de água-mel avaliadas também revelaram uma eficaz atividade antiviral que foi testada contra o bacteriófago Q β .

Em conclusão o produto água-mel evidencia um forte potencial, quer como produto alimentar quer como um produto medicinal.

1.3. Algumas bactérias com importância clínica

1.3.1. A bactéria *Staphylococcus aureus*

O nome do género *Staphylococcus* vem do grego Staphyle que significa "cacho de uvas" (Murray et al., 2005). Morfologicamente as bactérias do género *S.aureus* são cocos cujo diâmetro varia entre 0,5 e 1 mm. São bactérias anaeróbias facultativas e são capazes de crescer num meio contendo uma concentração elevada de sal (por exemplo, 10% (p/v) de cloreto de sódio) a temperaturas entre 18 e 40 ° C (Murray, et al., 2005).

Reagem positivamente à coloração de Gram e não são produtores de endósporos. Em termos de caracterização bioquímica existem dois testes importantes neste grupo que é a pesquisa da enzima catalase e coagulase. A bactéria *S. aureus* é positiva para os dois testes (Murray, et al. 2005)

Atualmente o género *Staphylococcus* inclui 35 espécies e 17 subespécies, muitos dos quais fazem parte da microbiota humana (flora nasal e pele). Em particular, a bactéria *S. aureus* está presente em cerca de 25% da população saudável (Frees et al., 2005); (Murray et al., 2005)

Contudo, esta bactéria pode-se tornar patogénica em situações de quebra da barreira cutânea ou diminuição da imunidade. É o maior agente patogénico causador de doenças agudas e crónicas na população e na comunidade hospitalar; os doentes hospitalizados são mais suscetíveis de contrair a infeção. As infeções causadas por *S. aureus* podem ser superficiais ou mais graves. Apresentam-se alguns exemplos na tabela 1.3.4 (Cucarella et al., 2002) ; (Manna et al., 2007) ; (Gelatti et al., 2009)

Tabela 1.3.4- Doenças causadas por infeção de *Staphylococcus aureus*.

| Tipo de infeção | Doença |
|-----------------------------|--|
| Pele | Carbúnculos, foliculites, fúruculos |
| Mediadas por toxinas | Intoxicação alimentar, síndrome da pele escaldada, síndrome do choque tóxico |
| Outras | Artrite séptica, bacteriemia, empiema, endocardite, osteomielite, pneumonia |

Atualmente, as infeções causadas por *S. aureus* são de grande preocupação pública devido à vacinação não ser totalmente eficiente no seu tratamento e à emergência de estirpes resistentes a diversos antibióticos (Manna et al., 2007).

A primeira etapa de uma infeção por *S. aureus* é a adesão à superfície, colonização dos tecidos do hospedeiro e secreção de algumas proteínas (Frees et al., 2005)

Para levar a cabo esta adesão a bactéria possui diversas adesinas, designadas por *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMM). As MSCRAMM interagem com vários polipéptidos, proteínas do soro sanguíneo e tecidos humanos e/ou animais, o que permite a adesão bacteriana a diferentes tipos celulares, promovendo a infeção e apoptose das células infetadas; são portanto cruciais para a virulência de *S. aureus* (Cucarella et al., 2002) ; (Frees et al., 2005).

A segunda etapa do processo de infeção é a formação de biofilme. Este tipo de colonização por *S. aureus* é de elevada importância por conferir proteção contra a ação de antibióticos (Cucarella et al., 2002).

Dois componentes de superfície estão implicados na formação do biofilme: o produto do operão *icaADBC* e a proteína BAP (*biofilm-associated protein*). O operão *icaADBC* codifica para a síntese do polissacarídeos PIA/PNSG (poli-N-succinil- α -1-6-

glucosamina). A proteína Bap promove a adesão à superfície e adesão intracelular; o PIA/PNSG apenas promove a adesão intracelular (Cucarella et al., 2002).

As proteínas de superfície são produzidas durante a fase de crescimento bacteriano no início da infecção, enquanto que as toxinas e enzimas (hemolisinas, enterotoxinas, proteases, lipases, e coagulases) que degradam os tecidos são segregadas quando a infecção já está estabelecida. A produção destas enzimas pode estar sob regulação por percepção de quórum (produção de péptidos de sinal que se ligam às cinases sensoras implicadas na ativação dos genes alvo) (Frees et al., 2005); Lyon e Novick, 2004).

Como foi referido anteriormente a bactéria *S. aureus* é particularmente hábil no desenvolvimento de resistências aos antimicrobianos onde se destaca o grupo resistente à meticilina. Este grupo foi descrito no início da década de sessenta do século passado (Fermeiro et al., 2010).

Inicialmente as infeções causadas por esta bactéria resistente estavam limitadas ao ambiente hospitalar devido aos fatores de risco associados. No entanto, desde a década passada foram descritos casos de infeções por MRSA na comunidade, em crianças e adultos, onde os fatores de risco existentes no hospital estão ausentes. Esta estirpe foi denominada por *S. aureus* resistente à meticilina associado ou adquirido na comunidade (CA-MRSA) (Gelatti et al., 2009).

A resistência à meticilina em *S. aureus* é conferida pela presença do gene *mecA* (contido num elemento móvel designado cassete *mecA* do cromossoma de *S. aureus* – SCCmec) que codifica para uma proteína de ligação à penicilina (PBP) adicional – PBP2a. As PBPs são transpedidasas que estão envolvidas nas ligações peptídicas do peptidoglicano. Em condições de ausência de resistência os agentes antimicrobianos β -lactâmicos ligam-se às PBPs impedindo a formação das ligações peptídicas induzindo a lise bacteriana. Contudo, a PBP2a produzida pelas estirpes resistentes tem uma afinidade muito baixa para os agentes β -lactâmicos, mantendo a sua função e por isso conferindo resistência à bactéria (Gelatti et al., 2009).

As estirpes bacterianas adquiridas em meio hospitalar e as associadas à comunidade são genética e fenotipicamente diferentes. Os elementos do SCCmec de MRSA de origem hospitalar são classificados atualmente em tipos I a XI e possuem apenas o gene *mecA* como determinante de resistência; os elementos da cassete SCCmec de CA-MRSA são de menor tamanho, pertence a linhagens genéticas distintas e expressam factores de virulência específicos, como a PVL (Panton-Valentine

leicocidina) e o EMCA (Elemento móvel catabólico da arginina), bem como possuem determinantes múltiplos de resistência aos antibióticos não beta-lactâmicos, o que confere multirresistência a antibióticos (Moussallem et al., 2007); Okuma et al., 2002).

1.3.2. A bactéria *Pseudomonas aeruginosa*

As bactérias *Pseudomonas aeruginosa* são pequenos bacilos Gram-negativos retos ou ligeiramente curvados, encapsulados, normalmente dispostos em agregados e possuem um metabolismo respiratório para obtenção de energia. Embora se definam como aeróbios restritos, podem crescer em condições de anaerobiose na presença de nitrato de arginina. Algumas destas bactérias adquirem um aspeto mucoide resultante da abundância de polissacarídeos capsulares e podem produzir pigmentos (piocianina, fluoresceína e piorrubina) (Murray et al., 2005).

As variadas necessidades de crescimento e nutricionais da bactéria *P. aeruginosa* permitem a sua ampla distribuição pelos inúmeros e distintos ambientes: terra, matéria orgânica em decomposição, vegetação, água e ambientes hospitalares húmidos (alimentos, jarros com flores, casas-de-banho, respiradores e equipamentos de diálise) (Murray et al., 2005).

Várias infeções como endocardites, foliculites, meningites, pneumonia, infeções do trato urinário e/ou intestinal e feridas da pele (sobretudo em queimaduras) estão associadas à colonização por *P. aeruginosa*. Associados à virulência destas infeções estão os inúmeros fatores de virulência produzidos por *P.aeruginosa*: componentes estruturais, toxinas e enzimas (tabela 1.3.5) (Henriques et al., 2010).

Tabela 1.3.5- Fatores de virulência da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e efeitos biológicos. (Murray et al., 2005)

| Fatores de virulência | Funções biológicas |
|--------------------------------|---|
| Componentes estruturais | |
| Cápsula | Inibe a ação bactericida dos antibióticos e suprime a atividade dos linfócitos e neutrófilos |
| Pili | Função de adesão |
| Lipossacarídeos | Endotoxina |
| Piocianina | Aumenta a libertação de Interleucina-8, estimulando a resposta inflamatória Media o dano tecidual. |
| Toxinas e enzimas | |

| | |
|--------------------------|--|
| Exotoxina A | Inibe a síntese de algumas proteínas, promove o dano tecidual, atua como imunossupressor |
| Exotoxina S | Inibe a síntese de algumas proteínas, atua como imunossupressor |
| Citotoxina (leucocidina) | Citotóxica para as membranas eucariotas |
| Elastase | Destruição de tecidos que possuem elastina e colagénio. |
| Protease alcalina | Destruição tecidual, inativação do fator de necrose tumoral |
| Fosfolipase C | Destruição tecidual; estimula a ação inflamatória |

Os fatores de virulência são cruciais numa infecção por *P. aeruginosa*. Contudo, a capacidade desta bactéria formar biofilme também desempenha um papel importante no desenrolar da infecção, pois atua como barreira protetora. As moléculas dos agentes antimicrobianos têm que passar através da matriz do biofilme a fim de inativar as células bacterianas que o constituem (Donlan et al., 2002).

O desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos por *P. aeruginosa* constitui um fator de elevada preocupação na microbiologia clínica.

Vários mecanismos de resistência foram identificados, contudo a mutação das porinas constitui o principal mecanismo. A penetração dos antibióticos para o interior da célula ocorre através dos poros pelo que a alteração das proteínas que configuram a parede destes poros resulta numa diminuição da entrada do agente antimicrobiano e possibilidade do aparecimento de resistência (Murray et al., 2005).

1.3.3. A bactéria *Mycobacterium bovis*

O género *Mycobacterium* é constituído por bacilos aeróbios imóveis, esporulados, ácido-resistentes e possuem ácidos micólicos. Em alguns casos estes bacilos podem formar ramificações que devido à sua fragilidade podem ser facilmente rompidas. A parede celular deste género de bactérias é extremamente rica em lípidos o que lhes confere resistência sobre alguns desinfetantes (Murray et al., 2005).

O crescimento deste tipo de bactérias é excessivamente lento devido à complexidade da parede celular (Figura 1.3.1) e às elevadas exigências nutricionais; normalmente uma célula de *Mycobacterium* divide-se a cada 12/24 horas e necessitam

de 3 a 4 semanas de incubação para obtenção de um inóculo representativo (Murray et al., 2005)

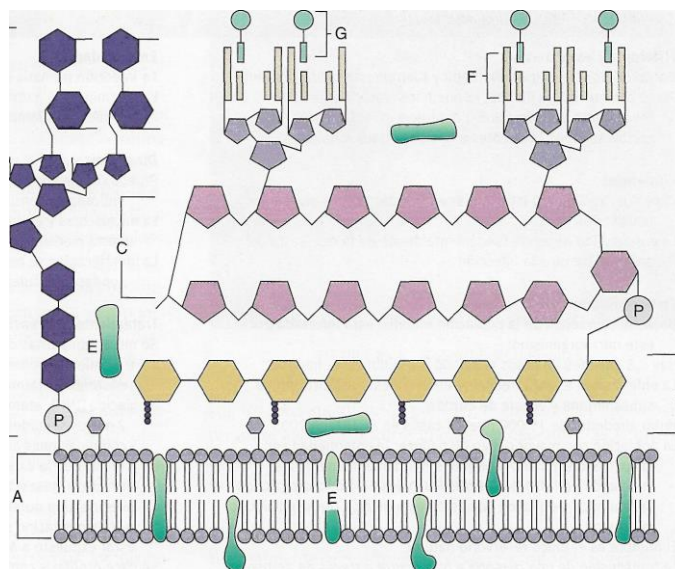


Figura 1.3.1- Estrutura de uma parede celular micobacteriana. A- membrana plasmática, B- peptidoglicano, C- arabinogalactano, D- lipoarabinomanano, E- Proteínas associadas à membrana plasmática, F- ácidos micólicos e G- moléculas de glicolípido de superfície associadas a ácidos micólicos. (Murray et al., 2005)

A bactéria *M. bovis* é responsável por causar a tuberculose em bovinos, podendo também infectar humanos; estes tipos de doenças designam-se por zoonoses (Pollock et al., 2002).

Antigamente, o número de pessoas infectadas por *Mycobacterium bovis* era relativamente elevado (sobretudo crianças) pois esta bactéria é transmitida pelo leite. A introdução de processos de pasteurização fez erradicar, quase completamente, este tipo de infecções. Atualmente outros meios de transmissão (via respiração, contato direto) permitem que a infecção passe de animais para humanos (O'Reilly et al., 1995).

Atualmente, a infecção por *M. bovis* não é tida como um perigo de saúde pública, não só devido aos processos de transformação de alimentos, mas também pela prática da vacinação dos animais. Contudo em países em desenvolvimento onde não há possibilidade de implementação de estratégias de controlo ou onde o controlo ou vacinação é feito esporadicamente o risco de transmissão zoonótica é elevado (Corner et al., 2011) ; (Pollock et al., 2002)

A tuberculose é definida como uma doença do trato respiratório, imunopatológica, onde as lesões que são geradas resultam de uma resposta imunitária à presença de *M. bovis* (Corner et al., 2011).

Numa infecção por *M. tuberculosis* os fatores de virulência têm como objetivo garantir a sobrevivência das células bacterianas dentro dos macrófagos e promover a infecção no hospedeiro (Corner et al., 2011).

Os mecanismos de virulência no *M. bovis* são muito semelhantes aos da bactéria *M. tuberculosis*. As bactérias permanecem no interior dos macrófagos e células dendríticas do hospedeiro onde ocorre a liberação de antígenos de micobactérias, estimulando a resposta imune. Sem esta fase inicial não se dá a formação de agregados de linfócitos e macrófagos nem o aparecimento dos sintomas típicos de tuberculose; as lesões só começam a ser desenvolvidas quando há uma resposta imune significativamente potente (pode demorar semanas) (Corner et al., 2011).

1.4. Modelos *in-vivo* para estudo de virulência bacteriana

Com o objetivo de controlar bactérias patogênicas inúmeras e sofisticadas técnicas para entender e decodificar os mecanismos de virulência bacterianos têm vindo a ser desenvolvidas. Modelos de identificação de fatores de virulência baseados em mudanças fenotípicas e bioquímicas estão a ser substituídos por modelos que tenham em conta o desenrolar da infecção e a resposta imunológica no hospedeiro (Mahajan-Miklos et al., 2000).

Estudos mais recentes mostram semelhanças no sistema imunitário inato e não-adaptativo de mamíferos, plantas e invertebrados. (D'Argenio, et al., 2001); (Mahajan-Miklos et al., 2000)

A bactéria objeto de estudo é apenas uma variável na complexa interação agente patogénico-hospedeiro (Valdivia, 2004).

Vários modelos *in vivo* foram utilizados com sucesso para estudos utilizando as bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Nomeadamente, plantas, ratos, nematodos e insetos (*Drosophila melanogaster* e *Galleria melonella*). (Brackman, et al., 2011) ; (D'Argenio et al., 2001) ; (Jander et al., 2000) ; (Mahajan-Miklos et al., 2000).

O modelo escolhido para o estudo da virulência no âmbito desta tese de mestrado foi a *Galleria melonella*, conhecida como a larva da traça da cera, pelo que a seguir se discute.

Os mecanismos de defesa dos insetos consistem em respostas celular e imune. A resposta celular engloba processos de fagocitose, encapsulação e nodulação, enquanto a imune envolve a produção de péptidos antimicrobianos, espécies reativas (oxigênio), intermediários nitrogenados e cascatas de reações enzimáticas que regulam a coagulação e melanização da hemolinfa (Andrejko et al., 2012).

As vantagens de usar este modelo in vivo em comparação com modelos de mamíferos são várias, entre elas podemos destacar: (Desbois, et al., 2011)

- A resposta imunitária em insetos é semelhante à resposta imune inata que ocorre mamíferos e a morte de agentes patogénicos ocorre pelos mesmos mecanismos;
- O ensaio pode ser executado a 37°C (temperatura médica corporal dos humanos);
- O inóculo é injetado diretamente no corpo do hospedeiro;
- É favorável para avaliar a eficácia de agentes antimicrobianos ou estudo de novos agentes terapêuticos, incluindo agentes para usar no tratamento de fungos.

Os modelos de mamíferos têm ainda as desvantagens se serem dispendiosos e morosos, bem como acarretam problemas éticos (Desbois et al., 2011).

1.5. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho experimental é a avaliação da suscetibilidade das bactérias *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium bovis* aos méis de rosmaninho, laranja e medronheiro e água-mel. No caso de *S. aureus* a avaliação será realizada em 3 estirpes: uma sensível à meticilina (ATCC 6538) e duas estirpes resistentes à meticilina (MRSA 4 e MRSA 12).

Um dos fatores determinantes para o crescimento bacteriano é o pH do meio, portanto foram determinados os valores de pH das soluções de méis e água-mel.

A avaliação de fenômenos de lise celular, inibição da capacidade de aderência das células bacterianas e a influência do mel na capacidade infecciosa da bactéria *P. aeruginosa* e das 3 estirpes de *S. aureus* são também objetivos deste trabalho.

Um processo de infecção despoleta sempre uma reação anti-inflamatória, revelando-se importante avaliar a capacidade anti-inflamatória dos méis e água-mel.

Capítulo II - Materiais e Métodos

2.1. Material

2.1.1. Equipamento

- Agitador magnético com aquecimento Agimatic-E (Selecta, Espanha)
- Autoclave Uniclave88 – 44x60 (AJC, Lisboa, Portugal)
- Balança analítica XS-410 (Fisher Scientific, Portugal)
- Banho-maria SW 22 (Julabo, Alemanha)
- Câmara de Fluxo laminar Bio48 (Faster, Itália)
- Centrifugadora refrigerada - Mikro 22R (Hettich, Reino Unido)
- Congelador ultra low temperature freezer -80°C U725 (Innova New Brunswick Scientific, EUA)
- Espectrofotómetro Novaspec®II (Amersham Pharmacia Biotech, Espanha)
- Espectrofotómetro UV – 160 A (Shimadzu, Brasil)
- Incubadora 37°C (Binder, EUA)
- Leitor de microplacas Tecan Infinite M200 (Tecan, Áustria)
- Medidor de pH GLP 21 (Crison, Espanha)
- Vortex L46 (Labinco, Holanda)

2.1.2. Meios de cultura

- Agar infusão de cérebro e coração, BHI (do inglês, Brain Heart infusion) (Biokar Diagnostics, Beauvais). Preparado de acordo com as instruções do fabricante, com adição de 1,5% (p/v) de agar (VWR, EUA).
- Mycobacterium broth base (Oxoid, Inglaterra). Preparado de acordo com as instruções do fabricante, suplementado com 25% (v/v) de mycoplasma G (Oxoid, Inglaterra).

2.1.3. Material biológico

2.1.3.1. Amostras de mel e água-mel

Os méis utilizados são de origem monofloral de rosmaninho, laranja e medronheiro. As amostras de mel de rosmaninho, medronheiro e laranja são da região do Algarve.

As amostras de água-mel são também da região do Algarve.

2.1.3.2. Microorganismos

Tabela 2.1.6- Origem das bactérias utilizadas neste estudo.

| Bactéria | Origem | Referência, Fonte |
|---|-----------------------|--|
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | Ferida | Coleção Americana de Culturas Tipo |
| <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente 4 (MRSA 4) | Clínica | Universidade do Algarve, IBB-CBME, Portugal |
| <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente 12 (MRSA 12) | Clínica (Hemocultura) | Universidade do Algarve, IBB-CBME, Portugal |
| <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> | - | Coleção Alemã de Culturas Tipo |
| <i>Mycobacterium bovis</i> DSM 43990 (BCG) | - | Coleção Americana de Culturas Tipo |

2.2. Métodos

2.2.1. Determinação do pH do mel

Sendo o pH um fator importante no crescimento bacteriano foi medido valor de pH das diferentes soluções de méis nas diferentes concentrações (50, 25 e 12,5% (p/v)).

Foram preparadas três réplicas independentes.

2.2.2. Condições de crescimento

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* cresceu numa placa de Petri estéril contendo meio BHI agar durante 18 horas a 37°C. A partir desta placa inoculou-se um tubo Falcon com 10 mL de meio BHI, com recurso a uma ansa, e incubou-se 18 horas a 37°C, DO_{600nm} de aproximadamente 1,2. Foram realizadas três réplicas independentes.

A estirpe de *Mycobacterium bovis* cresceu num tubo Falcon estéril contendo meio Mycoplasma broth base suplementado com 25% mycoplasma G durante 18 dias a 37°C (DO_{600nm} = 0,040). Foram realizadas duas réplicas independentes.

2.2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana por microdiluição

A atividade antimicrobiana de uma determinada substância é avaliada através da determinação da quantidade mínima necessária dessa substância para inibir o crescimento de um microrganismo; esse valor é conhecido como Concentração Mínima Inibitória (MIC) (Ostrosky et al., 2008).

Atualmente existem vários métodos para testar a atividade antimicrobiana de diferentes substâncias. Na escolha do método é necessário ter em atenção as (des)vantagens e fatores que podem afetar a atividade das substâncias em estudo, como o meio de cultura, valor de pH, inóculo, entre outros. Os métodos frequentemente utilizados são o método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição (Ostrosky et al., 2008).

No caso das micobactérias a avaliação do crescimento celular por turbidometria tem a desvantagem destas terem tendência a agregar. Então a avaliação neste tipo de bactérias passa pela utilização de um corante indicador de oxidação/redução, como o 3-[4, 5 dimetiltiazol-2-il]-2, 5- difeniltetrazolium brometo (MTT) (Sánchez et al., 2010).

Este método consiste na avaliação da viabilidade/crescimento celular pela quantificação da redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) pelas desidrogenases pelas células bacterianas vivas. Dessa forma, a quantidade de formazan formado é diretamente proporcional ao número de células de *M. bovis* vivas. Após a solubilização do formazan procede-se à leitura da DO a 540 nm (Abate, et al., 2004) ; (Adrião et al., 2008); (Mshana et al., 1998).

O método de microdiluição em microplaca estéril de 96 poços (Greiner) descrito por Patton et al., (2006) e já utilizado no laboratório na avaliação da atividade de água-mel (um subproduto do mel) (Miguel et al., 2013) foi o método escolhido. Este método é expedito uma vez que pode ser usado para um grande número de amostras, tem reprodutibilidade, é 30 vezes mais sensível que outros métodos usados na literatura e requer uma pequena quantidade de amostra (Ostrosky et al., 2008).

Para as estirpes bacterianas de *S. aureus* ATCC 6538, MRSA12 e MRSA 4 foram testados méis de rosmaninho, laranja e medronheiro a 50%, 25% e 12,5% (p/v); para *P. aeruginosa* além dos méis mencionados anteriormente testou-se também água-mel 2012 nas mesmas concentrações. A água-mel não foi testada para *S. aureus* uma vez que já foi determinada a sua suscetibilidade num estudo anterior (Miguel et al., 2013). Para a bactéria *Myco. bovis* foram testados os três méis e água-mel produzida nos anos 2012 e

2011, nas mesmas concentrações. O controlo positivo foi constituído pela cultura sem adição de amostra ou agente antibacteriano; os controlos negativos usados foram peróxido de hidrogénio 0,5% (v/v) e cloranfenicol 30 µg/mL.

No caso de *S. aureus* e *P. aeruginosa* o crescimento foi monitorizado por espectrofotometria contínua durante 16h e posteriores leituras às 24, 36 e 48h; para *Myco. bovis* o crescimento foi avaliado aos 7 e 14 dias.

2.2.3.1. Preparação da suspensão bacteriana e inoculação das microplacas

- *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

Foram transferidos 100 µL do inóculo para um tubo eppendorf seguido de uma centrifugação (2790xg, 5 min, 4°C). Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o tubo foi colocado em gelo. A cada 100 µL de inóculo foram adicionados 100 µL da amostra de teste (mel ou água mel) na concentração a testar. Foram igualmente preparados volumes correspondentes de inóculo para os controlos peróxido de hidrogénio 0,5% (v/v) e cloranfenicol 30 µg/mL.

Procedeu-se à inoculação da microplaca, transferindo 20 µL de cada suspensão para os poços que continham 180 µL da solução de mel ou água mel na respetiva concentração, bem como peróxido de hidrogénio 0,5% (v/v) e cloranfenicol 30 µg/mL. Uma série de 8 poços com o meio de cultura BHI não inoculado (200 µL) foram utilizados como branco. O controlo positivo consistiu em inocular um poço com 20 µL de cada réplica da cultura e 180 µL de meio BHI.

A quantidade de inóculo foi determinada pelo método de Miles e Misra (1938). Os valores obtidos foram de cerca de 10^7 e 10^8 UFC/mL.

- *Mycobacterium bovis*

A suscetibilidade de *M.bovis* foi determinada como descrito por Franzblau et al., 1998 e Montoro et al., 2005. Foram centrifugados 250 µL do inóculo para um tubo eppendorf (2790xg, 7 min, 4°C). O sobrenadante foi descartado e o tubo foi colocado em gelo para inibição do crescimento bacteriano. Em seguida foram adicionados a cada

tubo 250 µL da amostra de teste (mel ou água mel) na concentração a testar, bem como 250 µL de peróxido de hidrogénio a 0,5% (v/v) e cloranfenicol 30 µg/mL, com posterior homogeneização no vortéx.

Para a inoculação da microplaca, transferiu-se 100 µL de cada suspensão para os poços, contendo 100 µL do mel ou água mel da respetiva réplica e concentração de teste, bem como peróxido de hidrogénio 0,5% (v/v) e cloranfenicol 30 µg/mL. Estes últimos foram usados como poços controlo negativo. Os poços contendo apenas meio BHI (200 µL) constituíram o branco. O controlo positivo consistiu em inocular um poço com 100 µL de cada réplica da cultura e 100 µL de meio BHI (Franzblau, et al., 1998).

Após 7 dias de incubação a 37°C adicionou-se 10 µL de uma solução de MTT (5 g/L), preparada em PBS e incubou-se a placa durante a noite a 37°C (Montoro, et al., 2005). No caso de se ter verificado a formação de um precipitado violeta (formazan), 50 µL de uma solução de 0,1 % (p/v) SDS/DMF foram adicionados. A placa foi incubada 3 horas a 37°C com posterior leitura da DO a 540 nm (Montoro, et al., 2005).

Os poços que constituíram os brancos continham 200 µL de água-mel ou mel a 50%, 25% e 12,5% (p/v). Aquando do tratamento de dados, os valores de branco obtidos foram subtraídos à DO da amostra.

Aos 14 dias de incubação repetiu-se o procedimento como descrito acima para análise do crescimento de *Mycobacterium bovis*.

2.2.3.2. Cálculo da percentagem de inibição

A percentagem de inibição do crescimento bacteriano foi calculada como descrito por (Patton et al., 2006):

$$\%inibição = 1 - \frac{DO\ T15 - DO\ T0}{DO\ cultura\ T15} \times 100$$

Para o cálculo da percentagem de inibição foi escolhido o tempo referente a 15 horas de crescimento pois é o intervalo de tempo onde a inibição é máxima.

No caso em que o cálculo da percentagem de inibição deu valores negativos significa que ocorreu promoção do crescimento e a fórmula utilizada foi (Patton, et al., 2006):

$$\%inibição = \frac{DO\ T15 - DO\ T0}{DO\ cultura\ T15} \times 100$$

2.2.4. Avaliação da perda de constituintes

Com a análise dos valores de percentagem de inibição (acima dos 100%) a hipótese de que estaria a ocorrer um fenómeno de lise foi ponderada. Para determinar a possível perda de constituintes foi realizada uma leitura da DO a 260 nm. O fenómeno de lise ou rutura da parede bacteriana leva à libertação do conteúdo bacteriano (Carson et al., 2002).

Foram testados os méis de rosmaninho, laranja e medronheiro, águas-mel de 2011 e 2012 a 25% e peróxido de hidrogénio 0,5% (v/v).

A preparação do inóculo de *Mycobacterium bovis* foi realizado num tubo Falcon estéril contendo meio *Mycoplasma broth* base suplementado com 25% (v/v) mycoplasma G durante 18 dias a 37°C (DO_{600nm} = 0,032). Foram realizadas duas réplicas independentes.

2.2.4.1. Preparação da suspensão bacteriana e inoculação

Num eppendorf de 2 mL estéril foram transferidos 750 µL da cultura bacteriana e adicionados 750 µL do mel/água-mel a testar com uma concentração de 50% (concentração final = 25% (p/v)). As suspensões foram homogeneizadas no vortéx e incubadas a 37°C durante 24h.

Decorridas as 24h recolheram-se 500 µL de cada eppendorf e fez-se a leitura da DO a 260 nm, registando-se os valores obtidos. Procedeu-se do mesmo modo aos 7 e 14 dias.

2.2.5. Inibição da formação de biofilme

Apesar do mecanismo pelo qual a formação do biofilme está relacionada com o desenvolvimento de doenças no hospedeiro humano ser pouco conhecido, é claro, a

partir de evidências epidemiológicas, que os biofilmes desempenham um papel no desenvolvimento de doenças infecciosas (Donlan et al., 2002)

Tornou-se por isso importante avaliar se o tratamento das diferentes estirpes de *S. aureus* e *P. aeruginosa* com os diferentes méis e água-mel afetou a sua capacidade de formação de biofilme.

Para avaliar a formação de biofilme realizou-se um ensaio de aderência em poliestireno, conforme descrito por Adrião et al., (2008).

Testaram-se os méis de rosmaninho, laranja, medronheiro, água-mel 2012 a 25% (p/v) e clorhexidina 0,2% (v/v) para todas as estirpes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Adicionalmente, testaram-se os méis e água-mel referidos acima a 12,5% (p/v) para *P. aeruginosa*.

As bactérias *P. aeruginosa* e as três estirpes de *S. aureus* ATCC 6538, MRSA 12 e MRSA 4 cresceram numa placa de Petri estéril contendo meio BHI agar durante 18 h a 37°C. A partir desta placa inoculou-se um tubo Falcon com 10 mL de meio BHI, com recurso a uma ansa. A incubação decorreu durante 18 horas a 37°C, atingindo um valor de DO_{600nm} de aproximadamente 1,2.

Transferiram-se para um eppendorf 250 µL do inóculo, seguindo-se uma centrifugação (2790xg, 5 min, 4°C). O sobrenadante foi descartado e adicionou-se a cada tubo 250 µL de cada mel, água-mel e clorhexidina. Retiraram-se 200 µL de cada eppendorf e transferiram-se para um poço da microplaca. Os poços que constituíram o branco continham 200 µL de água mel ou o respetivo mel a 25% e 12,5% (p/v) e clorhexidina 0,2% (v/v). Aquando do tratamento de dados, os valores do branco foram subtraídos à DO da amostra. A incubação decorreu à temperatura ambiente durante 2 h. Foram também inoculados 3 poços com 200 µL da cultura bacteriana.

Após o período de incubação, a cultura foi recolhida e os poços lavados com 200 µL de PBS. Os poços secaram durante 15 min ao ar (perto do bico de Bunsen).

As células foram fixadas com calor (80°C, durante 30 min).

Depois do arrefecimento da microplaca as células foram coradas com 220 µL de cristal violeta a 0,1% (p/v) durante 1 minuto; seguindo-se o descartar do corante e duas lavagens com 220 µL de PBS.

Por fim, adicionaram-se 200 µL de uma mistura de álcool e acetona (80:20) e aguardou-se 15 min antes da leitura da DO a 600 nm.

Foram realizados três ensaios independentes.

A inibição de biofilme foi calculada usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - \left[\left(\frac{\text{DO}_{595\text{nm}} \text{ poço com componente}}{\text{DO}_{595\text{nm}} \text{ poço controle}} \right) \times 100 \right]$$

2.2.6. Avaliação do impacto do tratamento com mel e água-mel na virulência bacteriana

A virulência pode ser definida como a capacidade de um microrganismo entrar, replicar e persistir num hospedeiro. (Cross, 2008)

Com o objetivo de avaliar se a virulência das bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* era afetada pelo contato com o méis e água-mel fez-se um estudo in vivo usando como modelo a larva da cera *Galleria mellonella*.

As larvas usadas neste estudo foram facultadas pelo Prof. Doutor Luís Neto do Centro de Estudos de Ciências e Tecnologia Agrárias da Universidade do Algarve e pesavam entre 250 e 350 mg.

O procedimento adotado foi o descrito por Schrama et al., (2013).

Para as estirpes bacterianas de *S. aureus* ATCC 6538 MRSA12 e MRSA 4 foram testados méis de rosmaninho, laranja, medronheiro e água-mel 2012 a 25% (p/v); para *P. aeruginosa* testaram-se os méis mencionados anteriormente a 50%, 25% e 12,5% (p/v). O controlo positivo foi a cultura sem a adição de amostra ou agente antibacteriano; a solução de PBS foi utilizada como controlo negativo.

As bactérias *P. aeruginosa* e as três estirpes de *S. aureus* ATCC 6538, MRSA 12 e MRSA 4 cresceram numa placa de Petri estéril contendo meio BHI agar durante 18 h a 37°C. A partir desta placa inoculou-se um tubo Falcon com 10 mL de meio BHI, com

recurso a uma ansa. A incubação decorreu durante 3 h a 37°C, com agitação até obter uma DO_{600nm} de aproximadamente 0,5.

Transferiu-se 1 mL das culturas referidas anteriormente para tubos eppendorf, seguido de centrifugação (2790xg, 5 min, 4°C) e eliminação do sobrenadante. Adicionou-se 1 mL do mel ou água-mel na concentração a testar e a incubação decorreu durante 2 horas à temperatura ambiente.

Após as 2 h de contato procedeu-se a uma nova centrifugação 2790xg, 5 min, 4°C) e o pellet foi mantido em gelo até o momento da infeção das larvas.

Imediatamente antes da infeção das larvas as culturas eram ressuspensas em 1 ml de PBS estéril e homogeneizadas no vortéx.

Foram infetadas 10 larvas com 10 µl da suspensão inicial na segunda pro-pata direita do segundo conjunto de pro-patas utilizando uma microseringa de 50 µl (Sigma).

As larvas foram infetadas por injeção, na segunda pró-pata do lado direito do segundo conjunto de pró-patas com 10 µL da suspensão bacteriana, usando uma seringa (Sigma) de volume total 50 µL. Antes da injeção as larvas foram desinfetadas com álcool a 70% (v/v).

As larvas foram depois colocadas em caixas de Petri estéreis e vigiadas de 24 em 24 h, até um tempo máximo de 5 dias. Eram consideradas mortas as larvas que não respondiam ao toque e apresentavam um elevado nível de melanização. Este processo ocorre após a morte e caracteriza-se pelo aparecimento de uma tonalidade castanho-escuro nas larvas resultante da ativação da profenoloxidase (enzima que se encontra na hemolinfa). (Andrejko, et al., 2012)

Foram realizados três ensaios independentes.

2.2.7. Atividade anti-inflamatória

Explorou-se a hipótese de o mel e a água-mel, além de possuírem um efeito antibacteriano, terem um efeito anti-inflamatório.

Testaram-se os méis de rosmaninho, laranja e medronheiro e água mel de 2011 a 75% preparados em água (p/v) para duas enzimas, a hialuronidase e lipoxigenase.

- Bovine testicular hialuronidase (BST)

A hialuronidase é uma enzima associada à degradação de ácido hialurónico (Granica et al., 2013).

A atividade da enzima hialuronidase foi avaliada pelo método colorimétrico, denominado ensaio de Morgan-Elson. Este baseia-se na reação de N-acetil-D-glucosamina (GlucNAc) presente nas extremidades reductoras do ácido hialurónico com o p-dimetilaminobenzaldeído (PDMAB), resultando num produto de cor vermelha. A quantidade de produto formada é medida por espectrofotometria a 586 nm.

Na reação de Morgan-Elson formam-se três cromogéneos (produz cor): os cromogéneos I e II formam-se em condições alcalinas (100°C, pH 9) e o cromogéneo III que é formado por eliminação de água, por adição de ácido acético glacial. Este último cromogéneo reage com o PDMAB (reagente de Ehrlich) originando um produto vermelho instável, razão pela qual a leitura tem que ser realizada de imediato.

Testaram-se 4 concentrações de mel e água-mel, fazendo variar o volume da solução inicial (concentração_{inicial} = 75%) pipetado para o tubo de reação. (Tabela 2.2.7)

O ácido ascórbico (1,2 mg/mL) foi usado como controlo positivo e foram preparadas 5 diluições sucessivas de 1:2.

Ao controlo positivo não foi adicionado qualquer agente de teste (mel/água-mel), apenas água MiliQ (utilizada na preparação das soluções).

Tabela 2.2.7- Diferentes concentrações de mel e água-mel testados.

| Diluição | BST (µL) | mel/água-mel (µL) | Água (µL) | Concentração final do mel/água-mel (g/L) |
|-----------------|---------------------|------------------------------|----------------------|---|
| 1 | 100 | 100 | 0 | 35,71 |
| 2 | 100 | 75 | 25 | 26,79 |
| 3 | 100 | 50 | 50 | 17,86 |
| 4 | 100 | 25 | 75 | 8,93 |

Num tubo de reação de 15 mL adicionaram-se 100 µL BST (7900 U/mL preparada em tampão fosfato pH 3,6) à amostra de mel ou água-mel na quantidade desejada. Para ativação da enzima os tubos foram incubados 20 minutos a 37°C.

Findo o tempo de incubação foram adicionados 50 µL de cloreto de cálcio (12,5 mM) e os tubos foram colocados a 37°C durante 20 minutos. Em seguida foram adicionados 250 µL de hialuronato de sódio (1,2 g/L) a todos os tubos e foram de novo colocados a 37°C durante 40 minutos.

Após o período de incubação adicionaram-se 50 µL de hidróxido de sódio (0,4 M) e 100 µL borato de sódio (0,2M), seguido de 3 minutos a 100°C. Após o arrefecimento à temperatura ambiente adicionaram-se 1,5 mL de PDMAB. a

Transferiram-se 200 µL para uma microplaca de 96 poços estéril (Greiner) e realizou-se de imediato a leitura da DO_{586nm} .

- Lipoxigenase

Lipoxigenase (LOX) é uma enzima pró-inflamatória que catalisa a conversão de ácido araquidónico em leucotrienos (lípidos), nomeadamente ácido 13-hidroperoxilinoico. (Granica et al., 2013)

Para avaliar a atividade da LOX recorreu-se a um método espectrofotométrico descrito por Wu H. (1996).

Foram transferidos 960 µL de uma solução tampão borato (2M, pH 9), 10 µL de amostra (mel/água mel) e 5 µL de enzima (8000U/mg) para uma couvette de quartzo. O branco era lido simultaneamente e consistia na mesma solução com adição de 10 µL de água (sem adição de amostra).

Como controlos positivos foram usados soluções de eugenol 1% (v/v) e fizeram-se 10 diluições sucessivas de 1:2. A atividade da enzima sem qualquer inibidor foi quantificada e usada como controlo negativo.

A reação foi iniciada adicionando 20 µL de substrato- ácido linoleico (2,8 g/L) e a leitura de DO_{234nm} foi realizada de imediato.

A concentração final de mel e água-mel foi de 15 g/L.

Fizeram-se 3 medições por amostra.

2.2.7.1. Cálculo da percentagem de inibição das enzimas

A percentagem de inibição da enzima hialuronidase foi calculada pela fórmula:

$$\%inibição = \frac{(AbHA - AbHYAL)(AbW - AbHYAL)}{(AbHA - AbHYAL)} \times 100,$$

sendo que AbHA - absorvência da solução sem enzima, AbHYAL - absorvência da solução sem amostra e AbW- absorvência da solução com adição de amostra. (Granica et al., 2013)

A percentagem de inibição da enzima lipoxigenase foi calculada pela fórmula:

$$\%inibição = \frac{(A - B)}{A} \times 100,$$

sendo que A corresponde à atividade da enzima sem amostra e B à atividade da enzima em presença de amostra. (Compaoréa et al., 2012)

2.2.8. Tratamento estatístico

Para o tratamento estatístico dos dados foi usado o programa *BM SPSS Statistics 21*.

Os resultados do crescimento bacteriano na presença e ausência de mel ou água-mel, perda de constituintes, inibição da aderência e atividade enzimática foram tratados estatisticamente por one-way Anova aplicando o teste de Tukey.

Os dados obtidos para o ensaio de avaliação da virulência bacteriana foram analisados estatisticamente aplicando o teste t-student independente.

O intervalo de confiança utilizado foi de 95% e foram considerados diferentes estatisticamente quando $P < 0,05$.

Capítulo III- Resultados e Discussão

3.1. Valor de pH das soluções de méis

Quer para a própria caracterização dos méis, quer por este constituir um parâmetro com importância relevante para a atividade antibacteriana do mel, o valor de pH das amostras foi determinado.

Tabela 3.1. 8- Valores de pH das diferentes amostras de méis (preparadas com meio BHI).

| Mel | Concentração (% p/v) | Valor pH \pm DP |
|-------------|-------------------------|-------------------|
| Laranja | 50 | 5,38 \pm 0,10 |
| | 25 | 6,84 \pm 0,06 |
| | 12,5 | 7,15 \pm 0,04 |
| Rosmaninho | 50 | 5,40 \pm 0,04 |
| | 25 | 6,41 \pm 0,10 |
| | 12,5 | 7,09 \pm 0,05 |
| Medronheiro | 50 | 6,31 \pm 0,04 |
| | 25 | 6,42 \pm 0,04 |
| | 12,5 | 6,33 \pm 0,03 |

Os dados são representativos de três determinações \pm desvio-padrão.

As soluções dos méis analisados apresentam um perfil alcalino. Os valores de pH das soluções de méis de laranja e rosmaninho mais diluídas apresentam um valor de pH mais elevado; o meio BHI (pH 7,2 \pm 0,2) usado na sua preparação será o responsável por esse valor.

O mel de medronheiro é ainda conhecido por mel amargo devido ao seu valor de pH mais baixo e os valores de pH das soluções deste mel são semelhantes, apontando um possível efeito tampão deste mel.

3.2. Avaliação da atividade antimicrobiana

3.2.1. A suscetibilidade da bactéria *Staphylococcus aureus*

A avaliação da suscetibilidade da estirpe *S.aureus* ATCC 6538, MRSA 4 e MRSA 12 aos méis de rosmaninho, laranja e medronheiro foi determinada pelo método da microdiluição. Os resultados estão ilustrados nas Figuras 3.3.2; 3.3.3 e 3.3.4.

3.2.1.1. Estirpe ATCC 6538

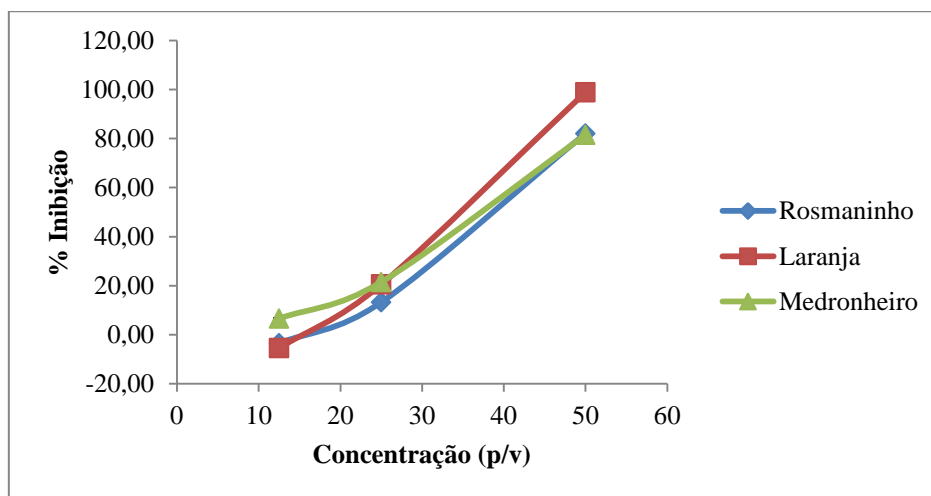


Figura 3.2.2- Suscetibilidade da bactéria *S. aureus* ATCC 6538 aos méis de rosmaninho, laranja e medronheiro. Os dados são representativos de três réplicas. As barras de erro não são visíveis pois estão cobertas pelo símbolo devido ao seu pequeno tamanho.

A bactéria *S. aureus* ATCC 6538 foi suscetível a todos os méis testados. Na presença de mel de rosmaninho na concentração de 25% e 50% (p/v) os valores de inibição foram $13,28 \pm 0,42$ % e $82,10 \pm 0,95$ %, respetivamente. Contudo a concentração de 12,5% (p/v) não se observou uma inibição do crescimento, mas sim uma promoção do crescimento (valor negativo de inibição) que atingiu o valor de $103,04 \pm 2,69$ %. À semelhança do comportamento observado para o mel de rosmaninho, o mel de laranja na concentração de 12,5% (p/v) também promoveu o crescimento de *S. aureus* ATCC 6538 (valor negativo de inibição) cujo valor foi de $111,06 \pm 9,83$ %. O mel de laranja à concentração de 25% (p/v) provocou uma inibição de $20,54 \pm 0,52$ % e na concentração mais elevada (50%) o valor de inibição atingiu o valor de $98,92 \pm 0,70$ %.

O mel de medronheiro teve um efeito inibitório para as três concentrações testadas aumentando com a concentração ($6,63 \pm 0,15\%$ para 12,5%, $21,52 \pm 0,86\%$ para 25% e $81,52 \pm 0,93\%$ para 50%).

As diferenças das taxas de inibição das 3 concentrações dos méis de rosmaninho, laranja e medronheiro testadas foram significativas, sendo por isso a concentração um fator determinante na atividade antibacteriana ($P < 0,05$).

O mel de laranja na concentração mais elevada (50% [p/v]) teve um efeito inibitório significativamente mais elevado em comparação com o mel de rosmaninho e medronheiro ($P < 0,05$). Na concentração de 25% (p/v) os méis de laranja e medronheiro causaram um efeito semelhante ($P > 0,05$) entre eles e significativamente mais elevado quando comparado com o mel de rosmaninho ($P < 0,05$). A comparação dos méis à concentração mais baixa evidenciou uma ação antibacteriana mais eficaz do mel de medronheiro em oposição aos méis de laranja e rosmaninho que à concentração de 12,5% (p/v), promoveram o crescimento.

A ação do peróxido de hidrogénio 0,5% (v/v) foi a mais forte registando uma taxa de inibição superior a 100% ($105,60 \pm 0,1194$). Os de DO_{600nm} eram negativos em adição a uma taxa de inibição superior a 100% indicam uma possível lise celular.

O cloranfenicol de concentração 30 $\mu\text{g/mL}$, usado como controlo negativo, inibiu o crescimento da bactéria ATCC 6638 em $84,54\% \pm 1,82$.

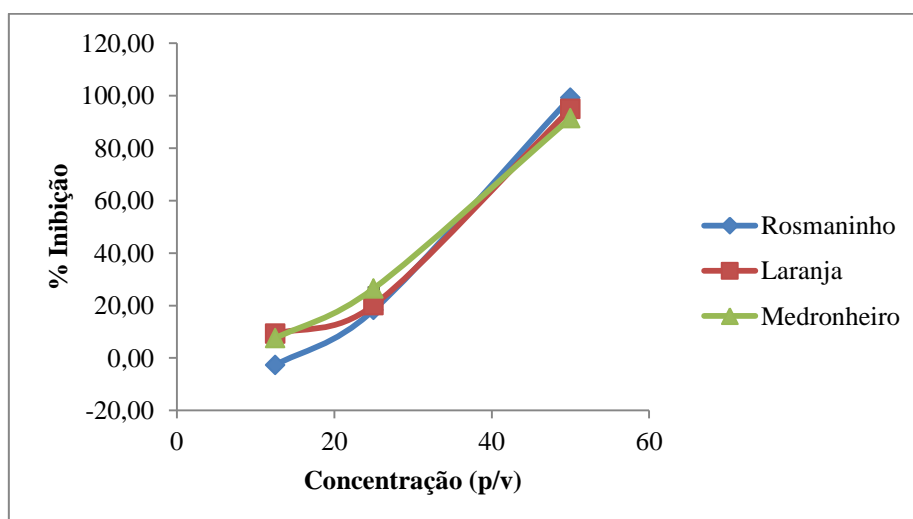


Figura 3.2.3- Suscetibilidade da bactéria *S. aureus* MRSA 4 aos méis de rosmaninho, laranja e medronheiro. Os dados são representativos de três réplicas. As barras de erro não são visíveis pois estão cobertas pelo símbolo devido ao seu pequeno tamanho.

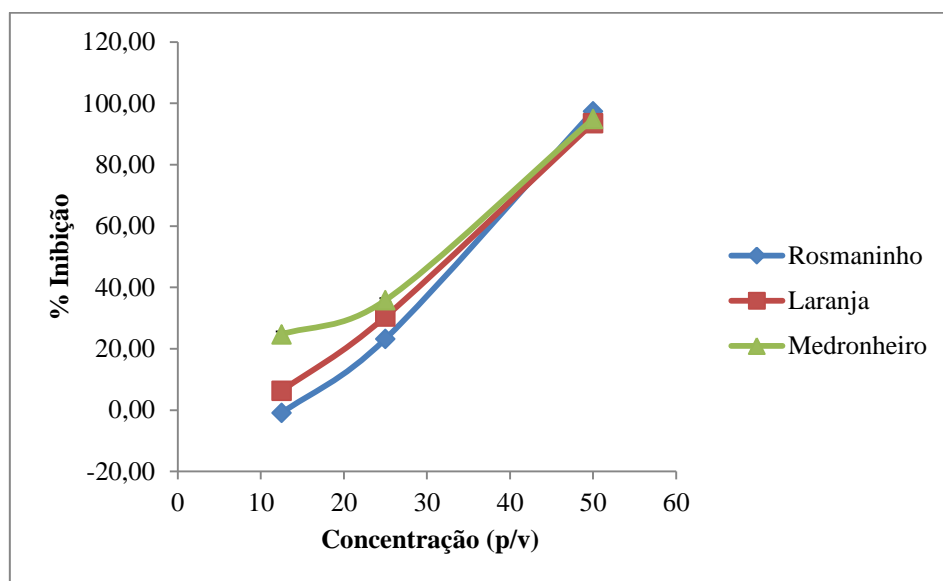


Figura 3.2.4- Suscetibilidade da bactéria *S. aureus* MRSA 4 aos méis de rosmaninho, laranja e medronheiro. Os dados são representativos de três réplicas. As barras de erro não são visíveis pois estão cobertas pelo símbolo devido ao seu pequeno tamanho.

Em relação às estirpes MRSA 4 e 12 podemos verificar que o mel de rosmaninho à concentração mais baixa, 12,5 % (p/v) teve um efeito promotor do crescimento (valores negativos de inibição) atingindo taxas de promoção do crescimento de $97,38 \pm 6,98$ % e de $103,05 \pm 1,98$ %, respectivamente. Enquanto à mesma concentração os méis de laranja e medronheiro provocaram uma ligeira inibição do crescimento; na estirpe MRSA 4 os valores de inibição foram $9,24 \pm 0,69$ % e $7,54 \pm 0,4680$ %, respectivamente e na estirpe MRSA 12 os valores observados foram $6,27 \pm 0,72$ % e $24,68 \pm 0,99$ %, respectivamente. Ficou evidente a maior eficácia ($P < 0,05$) do mel de medronheiro na concentração mais baixa sobre a estirpe MRSA 12.

Na concentração 25 % (p/v) o mel de medronheiro foi o mais eficaz ($P < 0,05$) para as duas estirpes de MRSA. A esta mesma concentração os méis de laranja e rosmaninho atingiram valores de inibição do crescimento semelhantes para a estirpe MRSA 4 ($20,17 \pm 1,06$ % e $20,17 \pm 1,06$ %, respectivamente; mas para a estirpe MRSA 12 a taxa de inibição atingida pelo mel de laranja foi de $30,45 \pm 1,59$ % significativamente superior ($P < 0,05$) ao do mel de rosmaninho que foi de $23,22 \pm 0,80$ %.

Na concentração de 50% (p/v) o mel com maior eficácia na inibição das duas estirpes de MRSA foi o mel de rosmaninho com valores de taxa de inibição de $99,19 \pm$

0,53 % para a estirpe MRSA 4 e de $97,37 \pm 0,18$ % para a estirpe MRSA 12. O mel de laranja a 50 % (p/v) atingiu taxas de inibição semelhantes ($P > 0,05$) para as duas estirpes e o mel de medronheiro foi mais eficaz ($P < 0,05$) contra a estirpe MRSA 12 com uma taxa de inibição de $94,40 \pm 0,56$ % do que para a estirpe MRSA 4 para a qual a taxa de inibição foi de $91,31 \pm 1,00$ %.

O agente controlo peróxido de hidrogénio a 0,5 % (v/v) causou taxas de inibição relativamente elevadas, para a estirpe *S. aureus* ATCC 6538 este valor foi de $105,60 \pm 0,12$ % ,para a estirpe MRSA 4 foi de $95,02 \pm 0,50$ % e para a estirpe MRSA 12 foi de $104,24 \pm 0,52$ %. Os valores de taxa de inibição superiores a 100% indicam a ocorrência de lise celular. O peróxido de hidrogénio é uma molécula hidrófila de baixo peso molecular capaz de entrar nas células através dos poros membranares (Price, Huddersman, Shen, & Walsh, 2012) e causador de stress oxidativo sendo considerado um dos agentes antimicrobianos do mel (Manyi-Loh et al., 2011).

O controlo positivo, cloranfenicol 30 $\mu\text{g/mL}$, teve uma taxa de inibição de $96,21 \pm 0,50$ e $84,09 \pm 0,85$ para as estirpes de MRSA 4 e MRSA 12, respetivamente.

No final do período de crescimento (48 h) a viabilidade das células submetidas ao tratamento com os diferentes méis foi avaliada por inoculação em meio BHI agar. Foi observado a recuperação da viabilidade para todas as estirpes nas concentrações de 12,5 e 25 % (p/v) para todos os méis, contudo a viabilidade não foi recuperada das culturas submetidas à concentração de 50% (p/v) para todos os méis o que indica uma ação bactericida dos méis a esta concentração. A viabilidade das culturas tratadas com H_2O_2 (0,5 % v/v) também foi nula.

Data de 1992 um dos primeiros estudos de avaliação da suscetibilidade de bactérias Gram-positivas, nomeadamente *S. aureus*. O grupo de investigadores coordenados por Willix D. J. verificou que o mel inibia de forma eficaz o crescimento desta bactéria. Estudos mais recentes vão de encontro ao reportado por Willix et al. (1992) sobre a influência da presença de mel no crescimento de bactérias Gram-positivas. (Mittal et al., 2012)

Em termos de suscetibilidade de estirpes de *S. aureus* resistentes e não resistentes e mediante a análise dos resultado obtidos no âmbito desta tese sobre a ação antibacteriana do mel pode-se afirmar que até mesmo as estirpes resistentes

demonstraram uma suscetibilidade aos diferentes méis testados, mesmo a diluições de 25% (p/v) e a sua viabilidade foi afetada pela diluição de 50% (p/v). Abd-El Aal, et al. (2007) avaliou a suscetibilidade de estirpes de *S. aureus* a um mel de origem Egípcia e verificou um efeito inibitório em todas as estirpes testadas comparado com antibióticos (por exemplo: vancomicina e meticilina). A diferença não significativa de suscetibilidade a méis do tipo monoflorais de origem Finlandesa entre estirpes resistentes e não resistentes foi também reportada por Huttunen et al., (2012).

O estudo de Huttunen et al., (2012) reportou uma atividade antibacteriana do mel monofloral de origem Finlandesa mais elevada a partir das concentrações de 40 e 60% (p/v), contudo tal como no presente estudo também observaram uma inibição do crescimento na concentração 20% (p/v). Basualdo et al., (2007) verificou que méis com origem de apiários e comerciais preservavam a capacidade antimicrobiana diluídos até 50% (p/v). Quando o mel utilizado era o Manuka o valor MIC era bastante inferior (2,9% [p/v]) (Henriques et al., 2010).

3.2.2. A suscetibilidade da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*

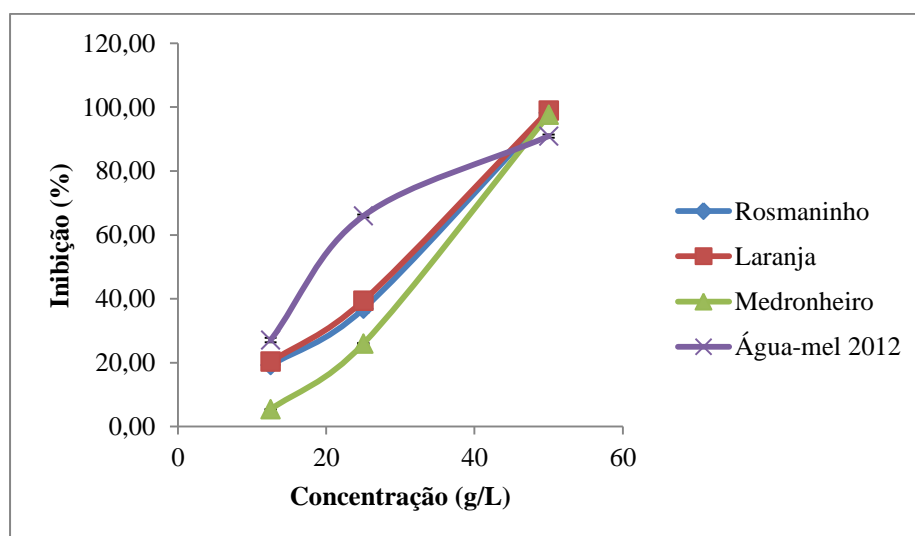


Figura 3.3.5- Suscetibilidade da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* aos méis de rosmaninho, laranja e medronheiro. Os dados são representativos de três réplicas. As barras de erro não são visíveis pois estão cobertas pelo símbolo devido ao seu pequeno tamanho.

A determinação da suscetibilidade da bactéria *P. aeruginosa* aos diferentes méis incluiu também a avaliação da atividade de água-mel, uma vez que este sub-produto do mel demonstrou num estudo anterior uma boa atividade contra bactérias negativas, como *E. coli* e *S. Typhimurium* (Miguel et al., 2013c). Os resultados estão ilustrados na Figura 3.3.5.

Em contraste com a promoção de crescimento observada nas estirpes de *S. aureus* quando os méis foram utilizados na concentração de 12,5% (p/v), no caso da bactéria *P. aeruginosa* observou-se uma inibição quer para os méis, quer para a água-mel. Esta última provocou um efeito inibitório significativamente mais elevado ($P < 0,05$) do que os restantes méis ($27,08 \pm 0,68\%$). Dentre os méis testados o mel de laranja foi o que atingiu uma taxa de inibição mais elevada ($20,32 \pm 0,17\%$), seguido do mel de rosmaninho ($19,20 \pm 0,44\%$) e por último o mel de medronheiro ($5,42 \pm 0,074\%$). Estes valores de inibição em termos estatísticos são diferentes, logo o mel de concentração 12,5% (p/v) com melhor efeito de inibição do crescimento é o mel de laranja.

A ação inibitória a 25% (p/v) foi mais eficaz para a água-mel ($P < 0,05$) cuja taxa de inibição foi de efeito $65,91 \pm 0,43\%$ comparando com os restantes méis. Os méis apresentaram capacidades inibitórias diferentes resultando em valores de taxas de inibição significativamente diferentes ($P < 0,05$); taxas de inibição para os méis laranja, rosmaninho e medronheiro foram de $39,41 \pm 0,39\%$, $36,83 \pm 1,10\%$ e $25,95 \pm 0,25\%$, respetivamente.

Os valores de inibição do crescimento bacteriano nas concentrações de 50% foram semelhantes ($P > 0,05$) para os méis testados; $98,17 \pm 0,77\%$ para o mel de rosmaninho, $98,90 \pm 0,16\%$ para o mel de laranja e $97,56 \pm 0,92\%$ para o mel de medronheiro. A atividade inibitória da água-mel foi significativamente inferior ($P < 0,05$) aos dos méis testados ($90,91 \pm 0,5400$).

O facto da água-mel nas concentrações de 25% e 12,5% (p/v) inibir mais eficazmente o crescimento de *P. aeruginosa* do que os méis nas mesmas concentrações, mas o mesmo não se verificar na concentração mais elevada pode sugerir a presença de um ou mais compostos na água-mel que pode exercer um efeito protetor cuja

concentração é crítica, isto é, quando a concentração desses compostos é superior a um determinado valor o efeito inibitório decresce. Este tipo de comportamento com a água-mel foi já reportado num estudo anterior (Miguel et al., 2013c).

O crescimento de *P. aeruginosa* foi inibido em $98,73\% \pm 2,59\%$ na presença de peróxido de hidrogénio a 0,5% (v/v) um valor semelhante ($P>0,05$) ao méis testados.

O cloranfenicol 30 µg/mL registou uma inibição do crescimento bacteriano de *P. aeruginosa* de $68,58 \pm 2,93$.

Apesar dos valores de inibição do crescimento de *P. aeruginosa* na concentração de 50% terem sido elevados a avaliação da viabilidade no final do período de crescimento revelou a recuperação das células a qualquer uma das concentrações testadas, incluindo a mais elevada. Esta recuperação da viabilidade sugere que ocorre um efeito bacteriostático e não um efeito bactericida.

A capacidade de inibição do mel Manuka em bactérias Gram-negativas, em particular *P. aeruginosa* foi reportada por (Willix et al., 1992). Recentemente foi também reportado que culturas bacterianas de *P. aeruginosa* em contato com o mel Manuka na concentração de 50% (p/v) cresciam significativamente menos, em comparação com a cultura na ausência de mel (Mittal et al., 2012).

Em termos de suscetibilidades aos méis das bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* na concentração de 50% (p/v) verificamos diferenças nas taxas de inibição dependendo do mel presente. No caso do mel de laranja há diferenças significativas entre as taxas de inibição obtidas para as estirpes MRSA 4, MRSA 12 e *P. aeruginosa*, sofrendo esta última a taxa de inibição mais elevada ($P<0,05$) mais. O mel de medronheiro teve uma ação bastante distinta para todas as estirpes de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, verificando-se uma maior suscetibilidade ($P<0,05$) para a cultura de *P. aeruginosa*. O mel de rosmaninho também evidenciou uma ação inibitória mais significativa ($p <0,05$) no crescimento de *P. aeruginosa* em comparação com o crescimento da estipe MRSA 4. Contudo não foi observada uma diferença significativa ($P>0,05$) entre a suscetibilidade ao mel de rosmaninho de *P. aeruginosa* e as duas estirpes de *S. aureus* ATCC 6538 e MRSA 12. Estes resultados vão de encontro ao verificado por Abd-El et al., (2007) sobre a melhor ação do mel de origem Egípcia em bactérias Gram-negativas.

Em estudos onde o mel testado foi o Manuka o valor de MIC para *P. aeruginosa* foi de 9,5% (p/v) (Henriques et al., 2011).

O mecanismo responsável pela capacidade antibacteriana do mel não foi ainda esclarecido, contudo entre os fatores que podem contribuir para a diferente ação dos méis estão as diferentes fontes de néctar. Não há um consenso entre estudos reportados nos valores de MICs ou suscetibilidade de um microrganismo para o mesmo mel; a sua composição bastante complexa e variada, influenciando a sua ação, bem como a espécie e estirpe utilizada é outro fator de variedade na ação antibacteriana do mel (Lu et al., 2013).

3.2.3. A suscetibilidade da bactéria *Mycobacterium bovis*

A estirpe *Mycobacterium bovis* DSM 43990 (BCG) foi utilizada como modelo para a determinação da possível atividade antimicobacteriana dos méis e da água-mel em estudo. Os resultados estão sumarizados na Tabela 3.2.9.

Tabela 3.2. 9- Inibição do crescimento de *M. bovis* na presença de diferentes méis e água-mel determinada ao fim de 7 e 14 dias de incubação.

| Mel | Concentração (p/v) | % Inibição ± DP | |
|---------------|--------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | 7 dias | 14 dias |
| Rosmaninho | 50 | 77,29 ± 1,04 ^b | 79,05 ± 0,57 ^b |
| | 25 | 109,04 ± 2,37 ^a | 104,38 ± 1,71 ^a |
| | 12,5 | 81,45 ± 2,46 ^b | 85,78 ± 2,97 ^b |
| Laranja | 50 | 89,51 ± 2,19 ^a | 105,81 ± 1,33 ^b |
| | 25 | 105,20 ± 1,95 ^b | 111,89 ± 2,10 ^a |
| | 12,5 | 66,68 ± 1,86 ^c | 113,06 ± 0,36 ^a |
| Medronheiro | 50 | 149,11 ± 2,07 ^a | 133,24 ± 0,57 ^a |
| | 25 | 111,21 ± 2,76 ^b | 117,10 ± 0,22 ^b |
| | 12,5 | 100,04 ± 2,69 ^c | 130,61 ± 1,01 ^a |
| Água-mel 2011 | 50 | 93,70 ± 5,63 ^a | 84,98 ± 0,39 ^a |
| | 25 | 91,74 ± 0,78 ^a | 73,59 ± 1,72 ^b |
| | 12,5 | 114,22* ± 1,68 | 119,96 * ± 0,61 |

| | | | |
|------------------------|------------|----------------------------|-----------------------------|
| | 50 | 131,08 ± 0,43 ^a | 114,21 ± 1,41 ^a |
| Água-mel 2012 | 25 | 105,20 ± 0,25 ^b | 111,23 ± 6,36 ^a |
| | 12,5 | 60,94 ± 2,97 ^c | 108,21 ± 0,74 ^a |
| Cloranfenicol | 30 µg/mL | 107,40 ± 0,11 ^b | 128,61 ± 3,20 ^b |
| Peróxido de hidrogénio | 0,5% (v/v) | 256,57 ± 1,89 ^d | 123,89 ± 10,40 ^a |

* Taxa de promoção do crescimento. Em cada coluna para cada mel, os valores assinalados com diferentes letras são significativamente diferentes (P<0,05).

Contrariamente ao verificado para as estirpes de *S. aureus* e a bactéria *P. aeruginosa*, onde a ação dos méis e da água-mel foi dependente da concentração, na bactéria *M. bovis* este efeito não se registou em todas as amostras, o exemplo é o mel de rosmaninho onde ao fim de 7 dias de crescimento a concentração de 25% atingiu a taxa de inibição mais elevada (P<0,05) e não se registou diferenças significativas (P>0,05) nas concentrações de 12,5 % e 50% (p/v). Aos 14 dias de crescimento estas diferenças foram igualmente observadas, o mel de rosmaninho na concentração de 25% (p/v) teve um efeito inibitório superior (P<0,05) em comparação com as restantes concentrações. O valor de inibição superior a 100% é indicador da ocorrência de lise celular. Tal como foi referido atrás estas diferenças podem estar associadas à concentração de componentes que são críticos para a proteção das células microbianas.

Para os restantes méis para o intervalo de 7 dias de crescimento a ação inibitória foi dependente da concentração. A atividade da água-mel foi diferente de acordo com o ano de produção. A água-mel de 2011 teve um efeito de promoção do crescimento na concentração de 12,5% (p/v) e as concentrações de 25% e 50% (p/v) atingiram valores de inibição semelhantes (P>0,05). Em contraste a ação da água-mel do ano de 2012 foi dependente da concentração.

Ao fim de 14 dias de crescimento foi ainda mais evidente a ausência de associação da ação inibitória com a concentração, uma vez que este comportamento foi não só observado no mel de rosmaninho, mas também nos méis de laranja e medronheiro (Tabela 3.2.9). No mel de laranja as concentrações de 12, 5% e 25 % (p/v) (113,06 ± 0,36 e 111,89 ± 2,10, respetivamente) foram mais eficazes que a concentração de 50% (p/v) (105,81 ± 1,33). No mel de medronheiro a concentração de 25 % (p/v)

causou o menor valor de inibição ($P < 0,05$), enquanto que as concentrações de 12,5% e 50% (p/v) atingiram valores semelhantes ($P > 0,05$).

A ação antimicobacteriana da água-mel de 2011 ao fim de 14 dias de crescimento evidenciou uma ação de promoção do crescimento pela concentração de 12,5% (p/v) e as concentrações de 25% e 50% (p/v) atingiram valores de inibição semelhantes ($P > 0,05$). A ação da água-mel 2012 foi semelhante ($P > 0,05$) a qualquer concentração testada. Contudo é de realçar que os valores observados foram superiores a 100% de inibição o que indica a possibilidade de ocorrência de lise celular.

O crescimento de *M. bovis* foi inibido de modo muito acentuado pelo peróxido de hidrogénio (0,5% [v/v]) ao fim de 7 dias ($256,57 \pm 1,89\%$). É, pois possível que uma elevada percentagem de células bacterianas tenham sofrido lise. No entanto, as células parecem recuperar do dano, uma vez que o valor de inibição ao fim de 14 dias de crescimento diminui de forma drástica ($123,89 \pm 10,40$).

A ação inibitória do antibiótico cloranfenicol ao fim de 7 dias de crescimento foi elevada registando um valor de inibição de $116,11 \pm 7,61$. Ao fim de 14 dias o valor de inibição sofreu um aumento significativo ($P < 0,05$) registando uma percentagem de inibição igual a $128,61 \pm 3,20$ e foi semelhante ao do mel de medronheiro nas concentrações de 12,5 e 50% (p/v).

A suscetibilidade da bactéria *M. bovis* ao mel floral foi também recentemente reportada por Eteraf-Oskouei et al., (2012). No caso da avaliação do efeito do mel floral na bactéria *M. tuberculosis* as concentrações de méis utilizadas foram muito inferiores às utilizadas no presente estudo; 2,5 , 5, 10 e 20% (p/v). Verificou-se que as estirpes eram sensíveis ao mel a concentrações de 5, 10 e 20% (p/v) (Sethi et al., 2012).

Foi também avaliada a possível relação tempo/concentração, isto é, se o tempo de incubação na presença dos diferentes méis influenciava a ação aumentando ou diminuindo a percentagem de inibição de crescimento. Em todos os méis e água-mel verificou-se uma diferença significativa ($P < 0,05$) entre as percentagens de inibição decorridos 7 e 14 dias de incubação, visível nos *Profile Plots* (Figuras 3.2.6 - 3.2.12).

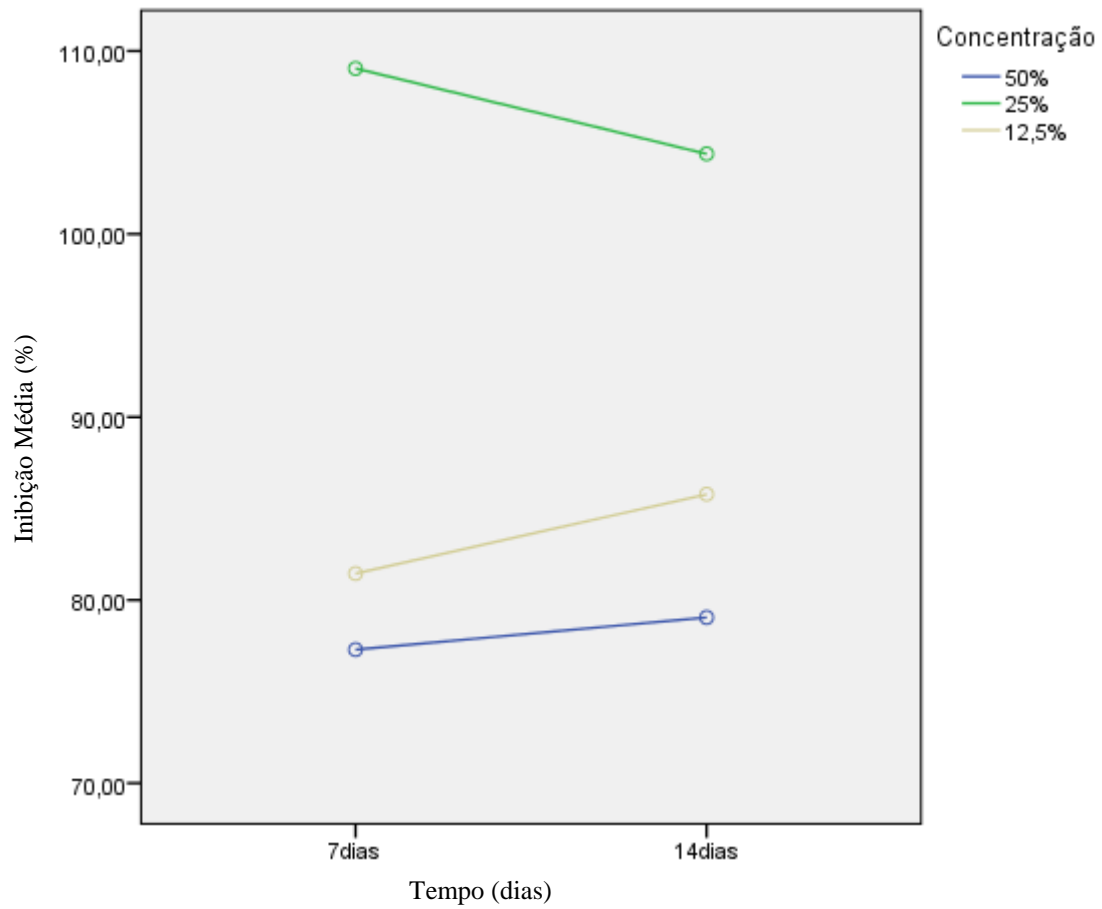


Figura 3.2.6- Variação da percentagem de inibição do mel de rosmaninho de concentração 50, 25 e 12,5% (p/v) decorridos 7 e 14 dias de crescimento.

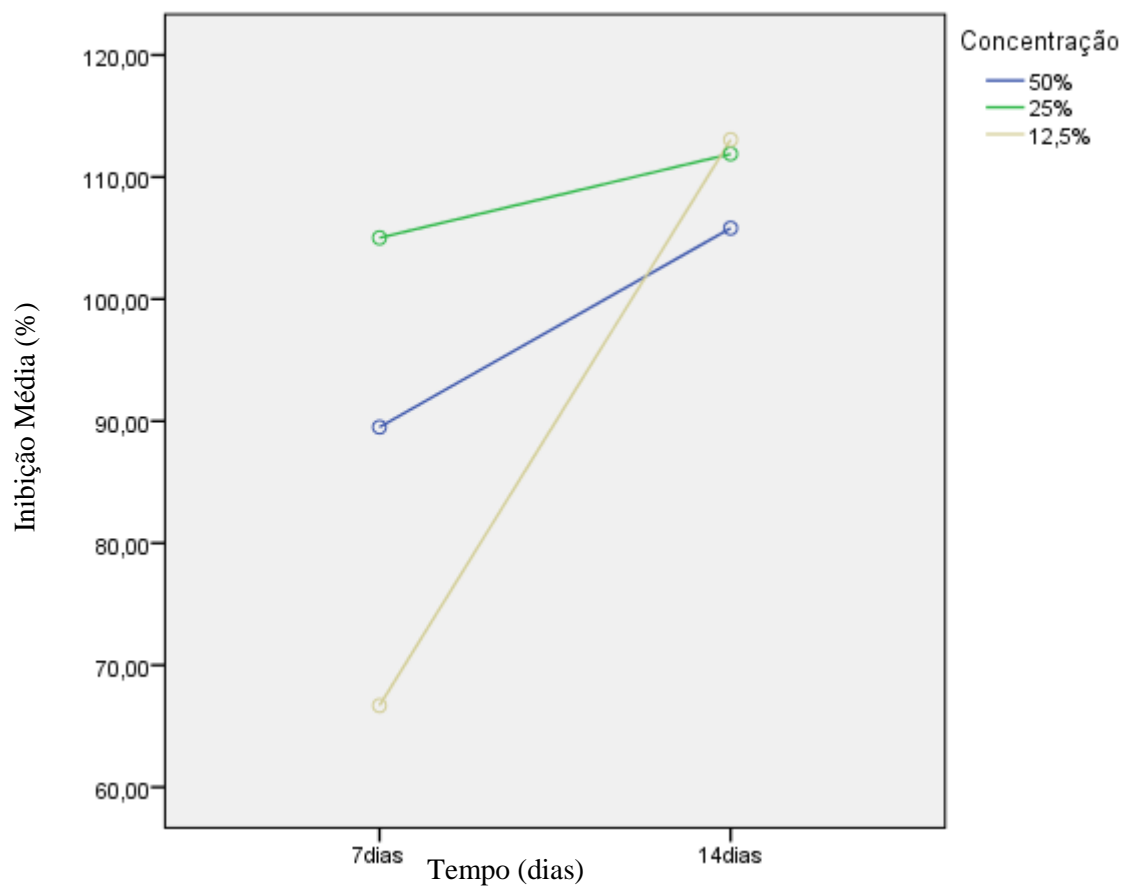


Figura 3.2. 7- Variação da percentagem de inibição do mel de laranja de concentração 50, 25 e 12,5% (p/v) decorridos 7 e 14 dias de crescimento.

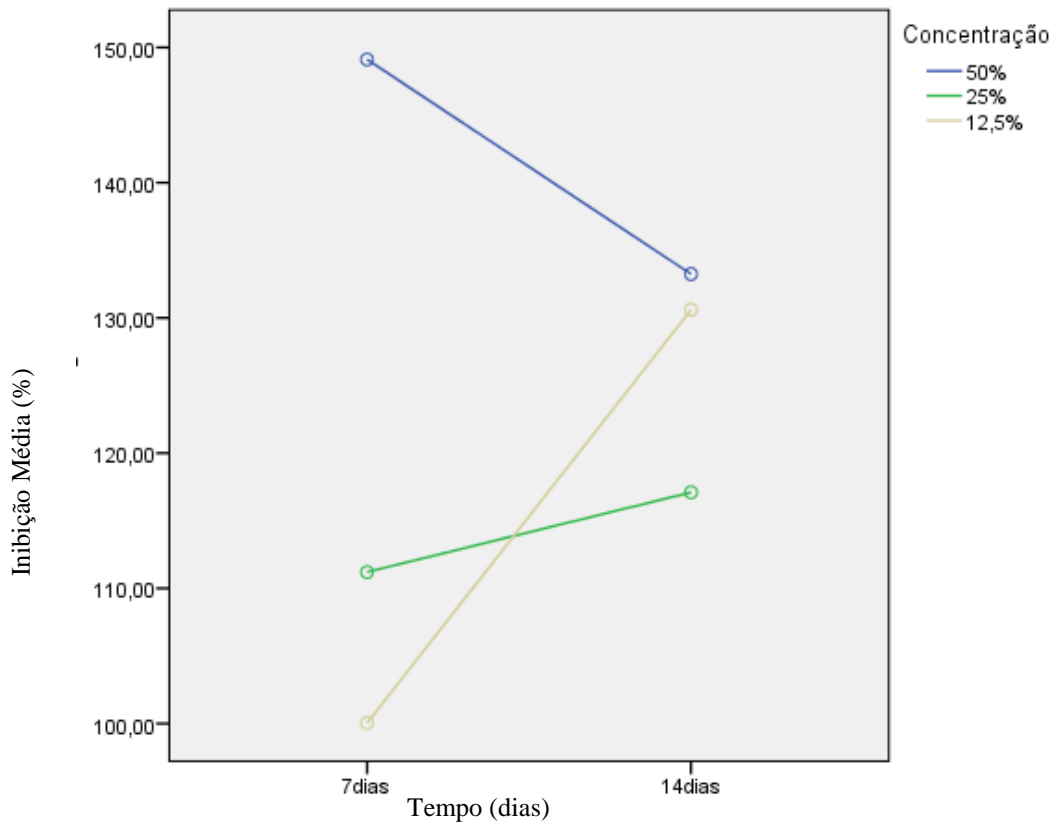


Figura 3.2.8- Variação da percentagem de inibição do mel de medronheiro de concentração 50, 25 e 12,5% (p/v) decorridos 7 e 14 dias de crescimento.

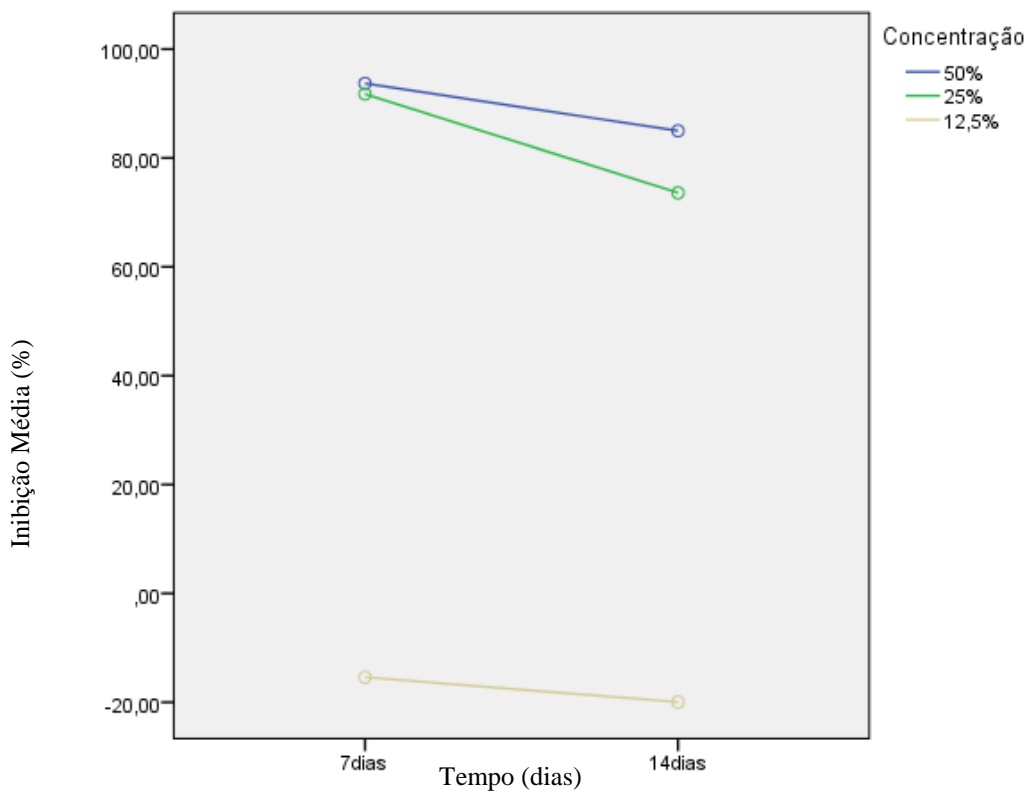


Figura 3.2.9 - Variação da percentagem de inibição da água-mel 2011 de concentração 50, 25 e 12,5% (p/v) decorridos 7 e 14 dias de incubação.

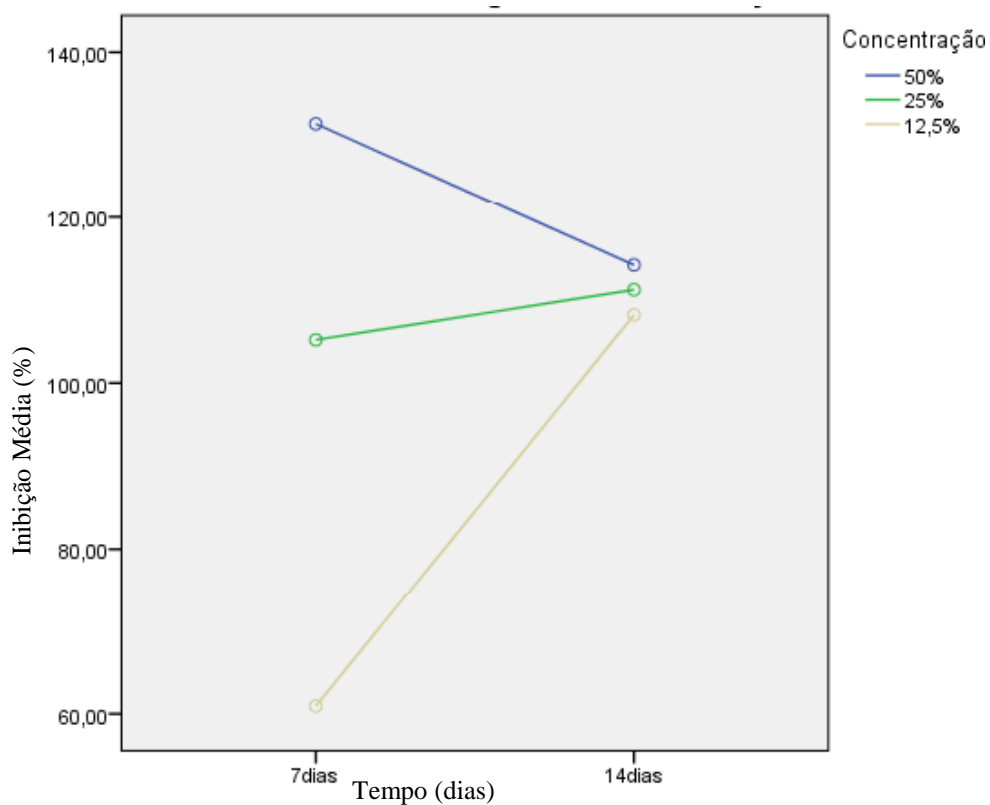


Figura 3.3.10- Variação da percentagem de inibição da água-mel 2012 de concentração 50, 25 e 12,5% (p/v) decorridos 7 e 14 dias de crescimento.

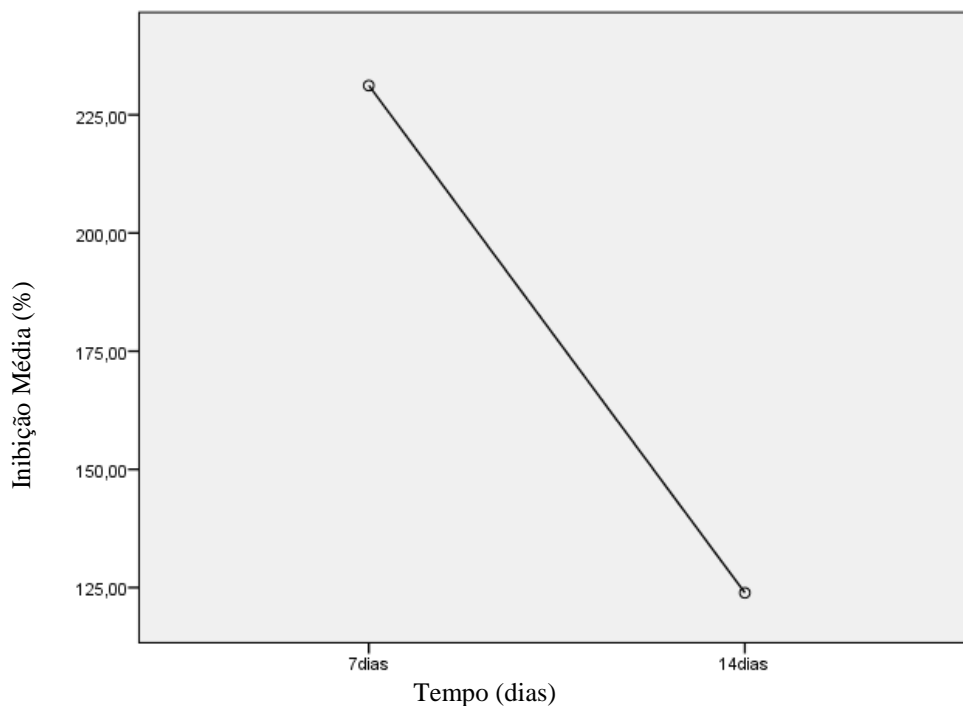


Figura 3.2.11- Variação da percentagem de inibição do peróxido de hidrogénio 0,5% (v/v) decorridos 7 e 14 dias de crescimento.

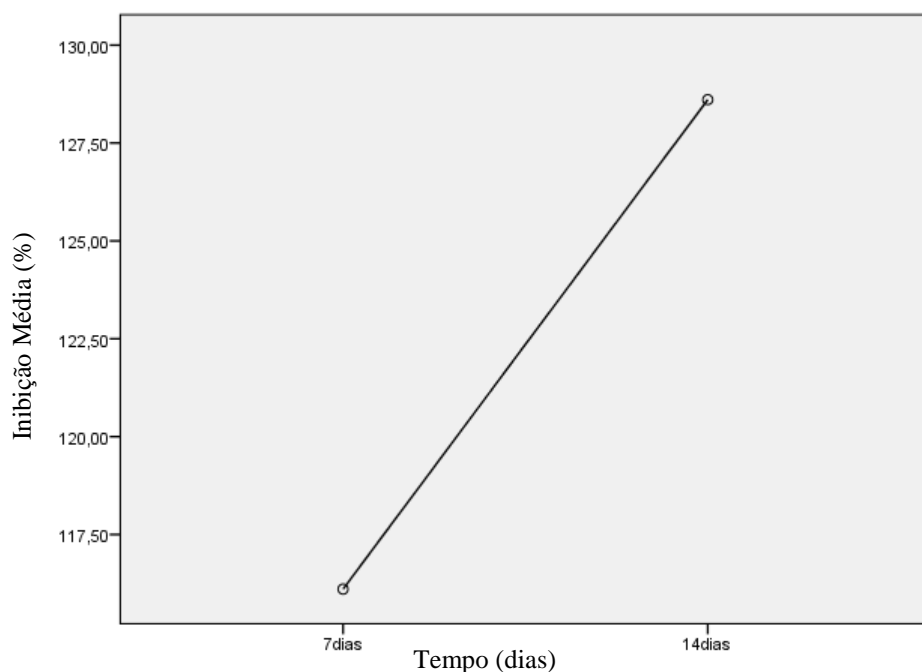


Figura 3.2.12. Variação da porcentagem de inibição de cloranfenicol 30µg/mL decorridos 7 e 14 dias de crescimento.

3.3. Avaliação da perda de constituintes em *Mycobacterium bovis*

A lise celular leva à libertação de material intracelular e conseqüentemente ao aumento da DO_{280nm} por comparação com a cultura controle. Os valores de perda de constituintes estão indicados na Tabela 3.3.10. Para os três méis estudados foi observado que à concentração de 25% (p/v) as porcentagens de inibição eram indicativas de lise celular, pelo que se selecionou apenas esta concentração para avaliar a capacidade de lise dos méis em estudo. Aos 7 dias de crescimento observou-se que a maior perda de constituintes ($P < 0,05$) ocorreu na presença de H_2O_2 , o que valida o valor de inibição observado. Os méis com maior influência ($P < 0,05$) na perda de constituintes foram os méis de rosmaninho e medronheiro, seguidos do mel de laranja e água-mel de 2012. A água-mel de 2011 foi a que causou menor ($P < 0,05$) perda de constituintes (Tabela X). Obteve-se uma correlação de $R^2 = 0,707$ entre os valores de perda de constituintes e os valores de % de inibição validando a hipótese de que valores superiores a 100% de inibição correspondem à ocorrência de lise celular.

Aos 14 dias o mel de medronheiro é o que induz o valor de perda de constituintes mais elevado ($P < 0,05$) seguido do mel de laranja, água-mel de 2012,

rosmaninho e H₂O₂. A água-mel 2011 neste intervalo de tempo também foi a que apresentou a menor capacidade (P<0,05) de indução de lise. O valor da correlação (R²= 0,580) entre os valores de perda de constituintes e os valores de % de inibição foi menor do que o registado para os 7 dias de crescimento, contudo pode-se inferir positivamente sobre a possibilidade de um dos mecanismos de ação dos méis ser a indução de lise, Os fenómenos de lise associados à ação de méis não tem sido reportado à exceção do estudo conduzido por Henriques et al., (2010) onde foi observado que o tratamento de *Ps. aeruginosa* com o mel Manuka provocava uma perda da integridade estrutural.

O mecanismo de lise induzido pelos méis necessita, pois de um maior aprofundamento.

Tabela 3.3.10- Perda de constituintes (DO_{280nm}) da bactéria *Mycobacterium bovis* na presença de diferentes méis e água-mel.

| Mel | Concentração (p/v) | Perda de constituintes DO _{280nm} | |
|-------------------------------|-----------------------|---|------------------------------|
| | | 7 dias | 14 dias |
| Rosmaninho | 25 | 0,0334 ± 0,0024 ^b | 0,0210 ± 0,0020 ^d |
| Laranja | 25 | 0,0230 ± 0,0020 ^c | 0,0320 ± 0,0019 ^b |
| Medronheiro | 25 | 0,0308 ± 0,0011 ^b | 0,0366 ± 0,0018 ^a |
| Água-mel 2011 | 25 | 0,0035 ± 0,0005 ^d | 0,0013 ± 0,0008 ^f |
| Água-mel 2012 | 25 | 0,0244 ± 0,0032 ^c | 0,0246 ± 0,0025 ^c |
| Peróxido de hidrogénio | 0,5% (v/v) | 0,0546 ± 0,0020 ^a | 0,0178 ± 0,0018 ^e |
| Controlo Cultura | - | 0 | 0 |

Os valores são representativos de três determinações ± desvio-padrão. Na mesma coluna os valores assinados com diferentes letras são significativamente diferentes.

3.4. Inibição da aderência

O processo de aderência é crucial no processo de colonização de superfícies bióticas como superfícies abióticas pelo que a capacidade de inibição da aderência das bactérias *S. aureus* ATCC 6538, MRSA 4 , MRSA 12 e *P. aeruginosa* pelos diferentes

méis e da água-mel foi determinada. O ensaio decorreu em microplacas de poliestireno (96 poços) utilizado a concentração de 25% (p/v) para os méis e para a água-mel foi também testada a concentração de 12,5% (p/v) com um tempo de atuação de 30 minutos à temperatura ambiente. A solução antisséptica de cloro-hexidina (0,2% p/v) foi utilizada como agente antibacteriano de referência por ser um agente comercial largamente utilizado. Os resultados estão ilustrados nas Figuras 3.4.13 - 3.4.17.

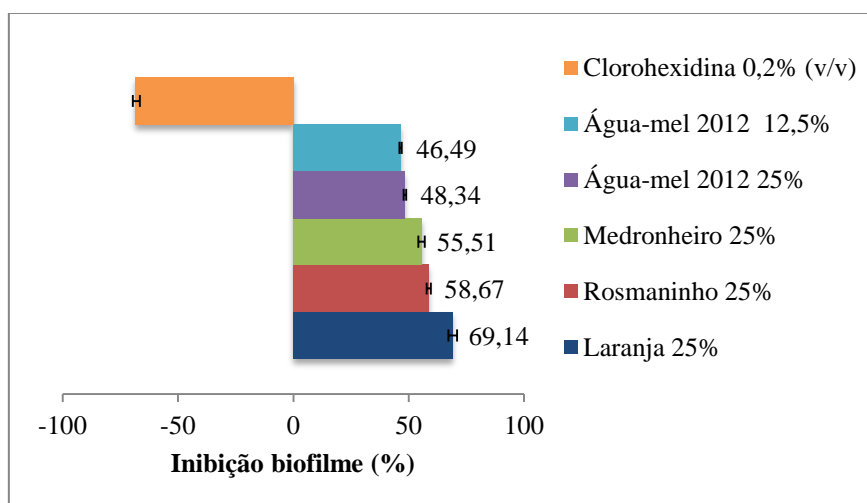


Figura 3.4.13- Percentagens de inibição da capacidade de aderência da bactéria *S. aureus* ATCC 6538 na presença dos diferentes méis e água-mel. Os dados são representativos de três réplicas. As barras de erro representam o desvio-padrão.

Os dados são representativos de três réplicas. As barras de erro representam o desvio-padrão.

Para a estirpe *S. aureus* ATCC 6538 o mel de laranja 25% (p/v) foi o mel que apresentou o maior valor inibição da aderência ($P < 0,05$). Em contraste, a amostra de água-mel 2012 na concentração de 12,5% (p/v) teve o menor efeito na inibição de aderência ($P < 0,05$).

Os outros dois méis, rosmaninho e medronheiro atingiram valores de inibição de aderência semelhantes ($P > 0,05$).

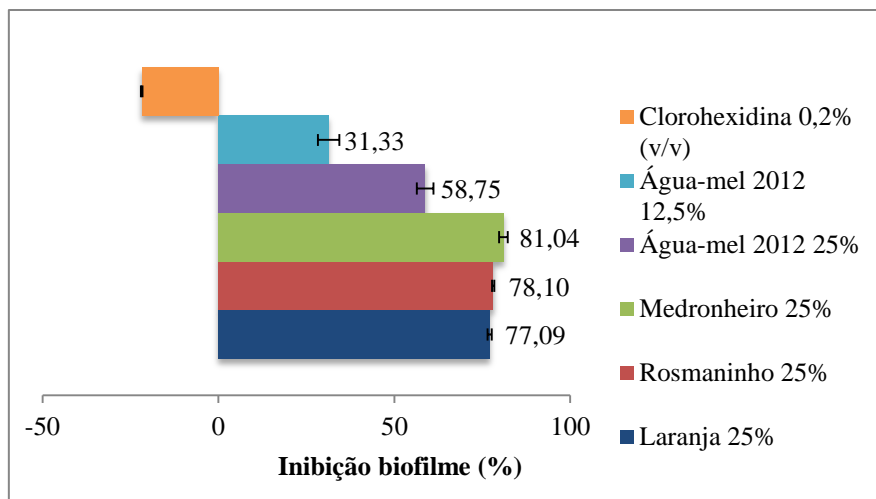


Figura 3.4.14- Percentagens de inibição da capacidade de aderência da bactéria *S. aureus* MRSA 4 na presença dos diferentes méis e água-mel. Os dados são representativos de três réplicas. As barras de erro representam o desvio-padrão.

No caso da estirpe MRSA 4 os três méis apresentaram valores de inibição semelhantes ($P > 0,05$) e inibiram de forma mais eficiente a formação de biofilme ($P < 0,05$) que a amostra de água-mel de 2012 a 12,5 % e 25% (p/v).

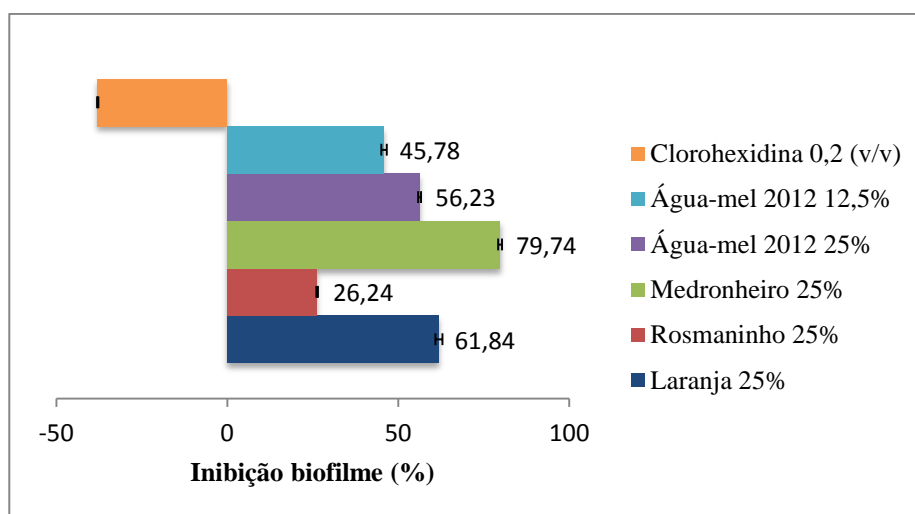


Figura 3.4.15- Percentagens de inibição da capacidade de aderência da bactéria *S. aureus* MRSA 12 na presença dos diferentes méis e água-mel. Os dados são representativos de três réplicas. As barras de erro representam o desvio-padrão.

Para a estirpe MRSA 12 todos os méis e água-mel de concentração 25% (p/v) tiveram ações bastante distintas ($P < 0,05$). O mel de medronheiro atingiu um valor de inibição de aderência mais elevado que os restantes ($P < 0,05$). O mel de rosmaninho foi dos três méis o que inibiu menos a aderência da estirpe MRSA 12 ($P < 0,05$) seguido do mel de laranja.

À semelhança do observado para a estirpe MRSA 4, a água-mel de 2012 em comparação com os méis de medronheiro e laranja registou valores de inibição da aderência inferiores ($P < 0,05$). Os valores de inibição para as estirpes MRSA 4 e MRSA 12 na presença de água-mel a 25% (p/v) são similares ($P > 0,05$). Contudo, a água-mel a 12,5% (p/v) teve uma ação inibitória mais elevada na estirpe MRSA 12 do que na MRSA 4 ($P < 0,05$).

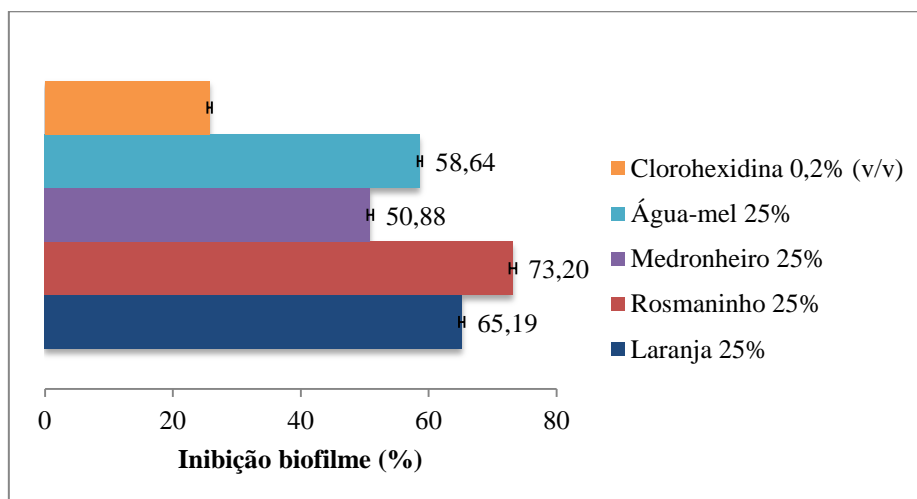


Figura 3.4.16- Percentagens de inibição da capacidade de aderência da bactéria *P. aeruginosa* 12 na presença dos diferentes méis e água-mel de concentração 25% (p/v). Os dados são representativos de três réplicas. As barras de erro representam o desvio-padrão.

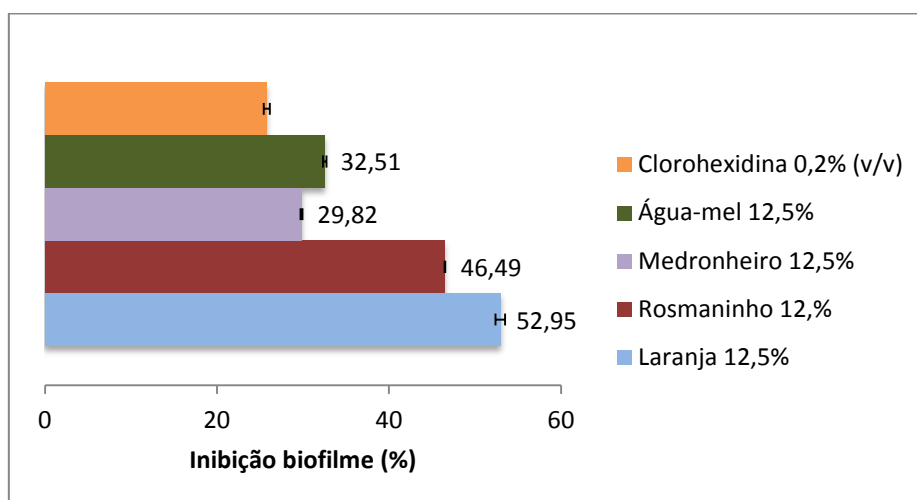


Figura 3.4.17- Percentagens de inibição da capacidade de aderência da bactéria *P. aeruginosa* 12 na presença dos diferentes méis e água-mel de concentração 12,5% (p/v). Os dados são representativos de três réplicas. As barras de erro representam o desvio-padrão.

A variação na ação inibitória de aderência entre méis para uma mesma concentração (12,5% e 25% [p/v]) foi significativa.

Quando se considera a de concentração 12,5% (p/v) que o mel de laranja foi o mais eficaz ($P < 0,05$) na inibição da aderência da bactéria *P. aeruginosa* seguido do mel de rosmaninho e água-mel. O mel de medronheiro foi o que a esta concentração inibiu em menor grau ($P < 0,05$) a aderência de *P. aeruginosa*.

Na concentração de 25% (p/v) foi o mel de rosmaninho que apresentou a maior capacidade de inibição de aderência de *P. aeruginosa* ($P < 0,05$) e o mel de medronheiro foi o que apresentou menor capacidade inibitória ($P < 0,05$).

Como agente de referência foi utilizada uma solução comercial de cloro-hexidina a 0,2 % (p/v). Esta solução desinfetante é largamente utilizada. Foi observado que a solução de cloro-hexidina teve um efeito de promoção da aderência nas estirpes de *S. aureus* ATCC 6538, MRSA 4 e MRSA 12. O efeito de inibição da aderência foi observado na bactéria *P. aeruginosa*, mas o valor foi muito inferior ($P < 0,05$) ($25,77 \pm 0,34$ %) em relação aos méis e água-mel testados.

Os resultados de inibição da aderência pelos méis e pela água-mel testados no presente estudo são promissores. Estes resultados estão de acordo com os reportados por Alendaji et al., (2009) onde observaram que o mel Manuka inibia não só o crescimento bacteriano de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, bem como a capacidade destas formarem biofilme.

Para se iniciar o processo de adesão e formação de biofilme tem que ocorrer um “reconhecimento” da superfície pela bactéria, sendo ativadas cascatas de sinais moleculares. Por observação direta de células vivas através de microscopia confocal e de contraste Costerton (1999) verificou que havia uma atração da bactéria pela superfície onde se iniciará a matriz bacteriana. A interação bactéria-bactéria e bactéria-superfície é possível devido à libertação de moléculas e protões sinalizadores. Costerton (1999) especulou que uma maior concentração tanto de protões como de moléculas de sinalização ao lado da célula bacteriana junto a uma superfície ou interface permite que a célula detete que está perto de uma superfície.

Na primeira etapa de formação do biofilme há uma super-ativação de genes responsáveis pela produção de adesinas e exopolissacarídeos (EPS) pouco minutos após a ligação à superfície fundamentais na formação de uma matriz resistente e a ligação entre bactérias ou bactéria-superfície (Costerton, 1999).

Em contato com o mel a aderência é comprometida, o que poderá estar ligado a uma menor produção ou uma redução na qualidade dos exopolímeros que são essenciais no processo de adesão, bem como proteínas de superfície que interagem com as superfícies bióticas e abióticas (Otto, 2013).

3.5. Avaliação do impacto do tratamento com mel e água-mel na virulência bacteriana

Para além do efeito inibitório no crescimento e aderência outra ação importante que a agente antibacteriana pode exercer é afetar o potencial de virulência. Assim foi avaliada a ação dos méis e água-mel na capacidade de virulência das estirpes estudadas utilizando o modelo de *Galleria mellonella*. Os resultados são ilustrados nas Figuras 3.5.18 – 3.5.29 e sumarizados na Tabela 12 (anexo 2).

As larvas injetadas com PBS em todos os ensaios apresentaram uma sobrevivência de 100% durante os cinco dias de avaliação.

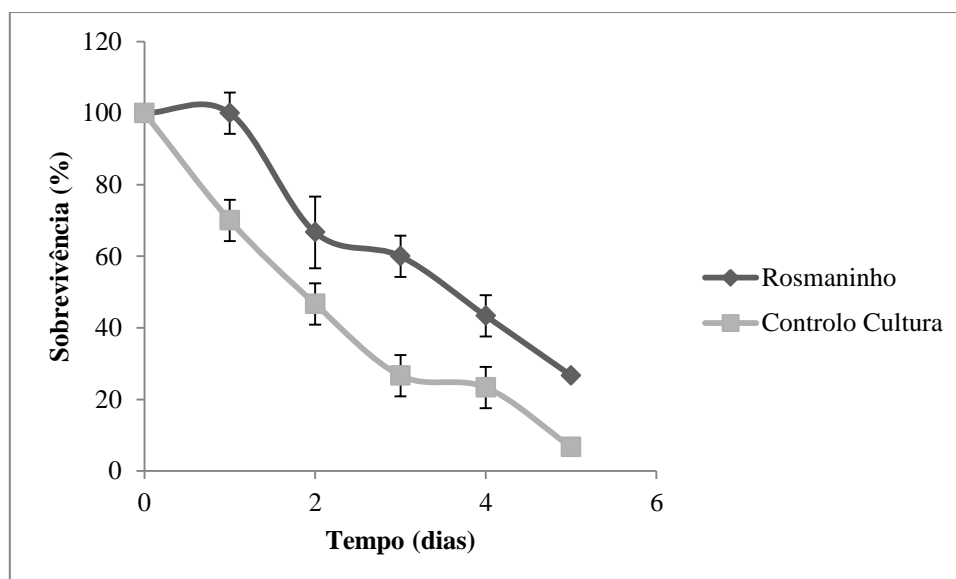


Figura 3.5.18- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe *S. aureus* ATCC 6538 tratadas (-◆-) com o mel de rosmaninho 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão.

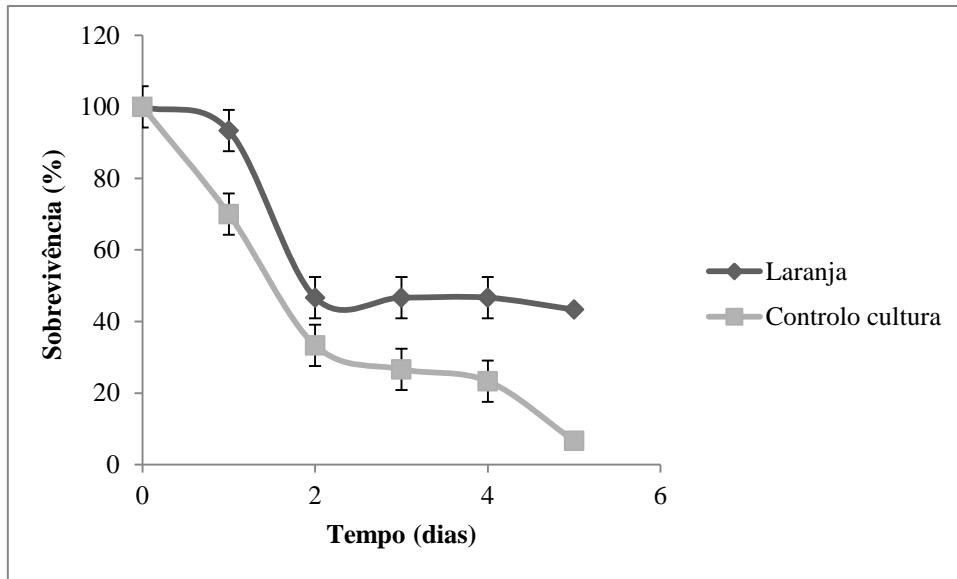


Figura 3.5.19- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe *S. aureus* ATCC 6538 tratadas (-◆-) com o mel de laranja 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão.

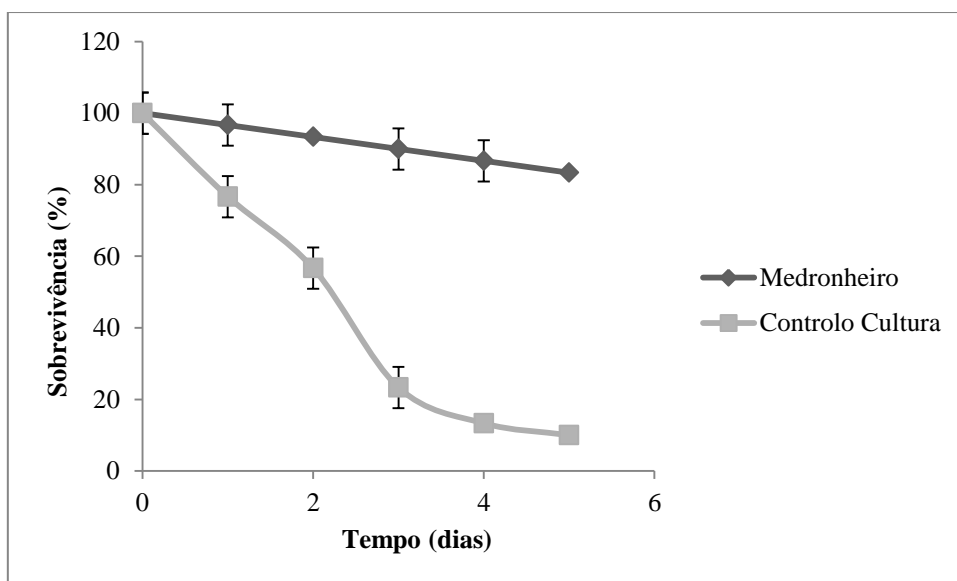


Figura 3.5.20- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe *S. aureus* ATCC 6538 tratadas (-◆-) com o mel de medronheiro 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão.

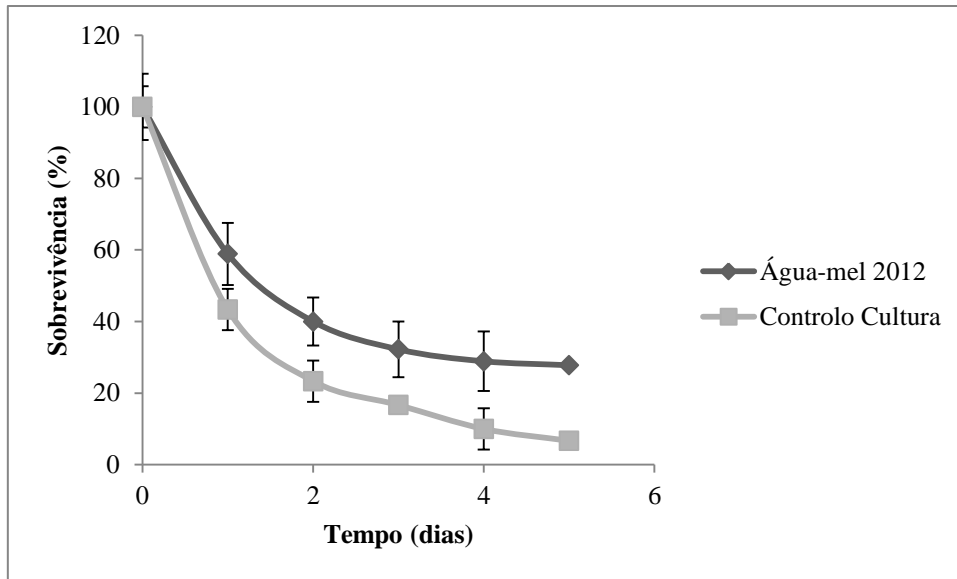


Figura 3.5.21- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe *S. aureus* ATCC 6538 tratadas (-◆-) com água-mel 2012 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão.

A sobrevivência das larvas injetadas com a suspensão de células de *S. aureus* ATCC 6538 tratadas com qualquer um dos méis ou água-mel de 2012 foi significativamente mais elevada ($P < 0,05$) quando comparada com as larvas injetadas com a suspensão bacteriana na ausência de qualquer agente; esta diferença na sobrevivência foi significativa ($P < 0,05$) para todos os 5 dias.

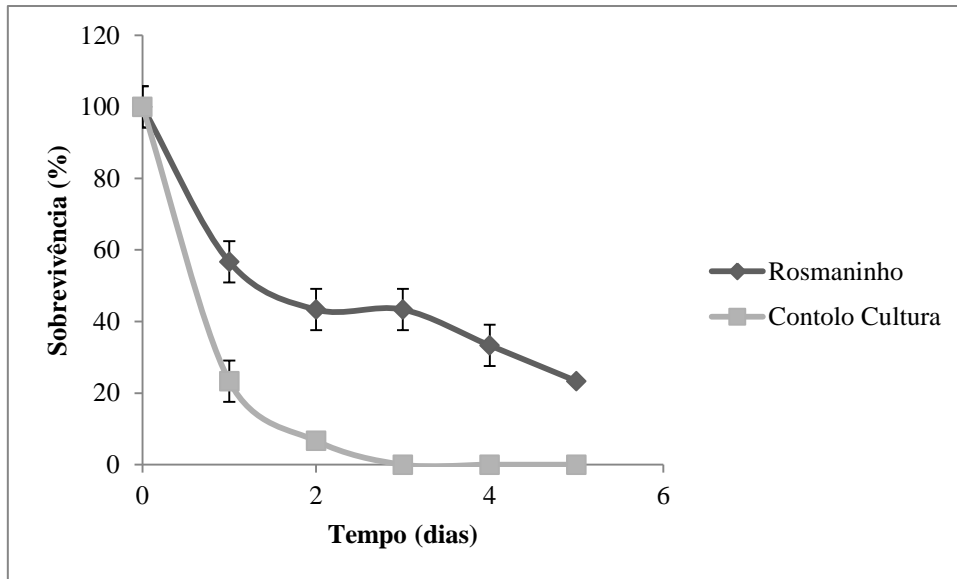


Figura 3.5.22- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe MRSA 4 tratadas (-◆-) com mel de rosmaninho 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão.

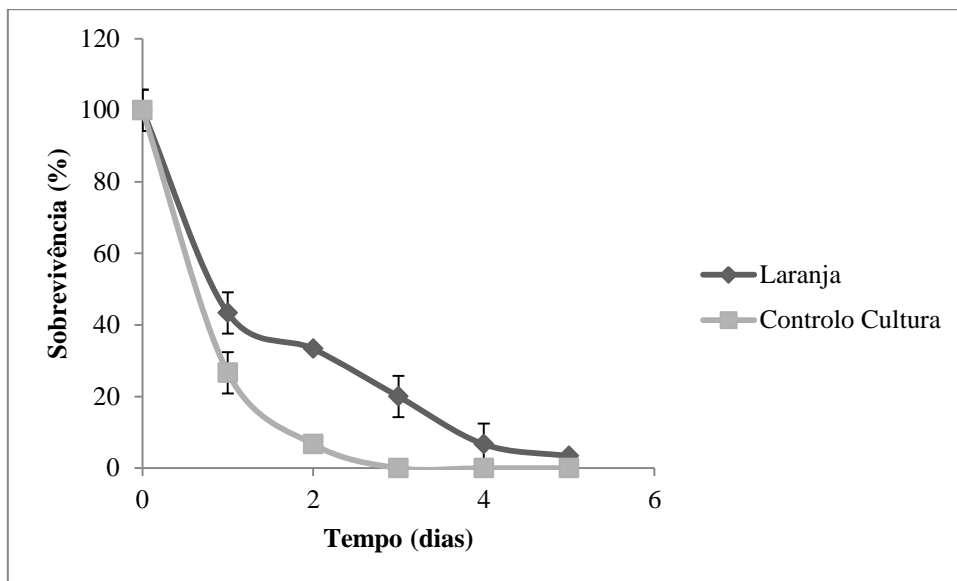


Figura 3.5.23- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe MRSA 4 tratadas (-◆-) com mel de laranja 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão.

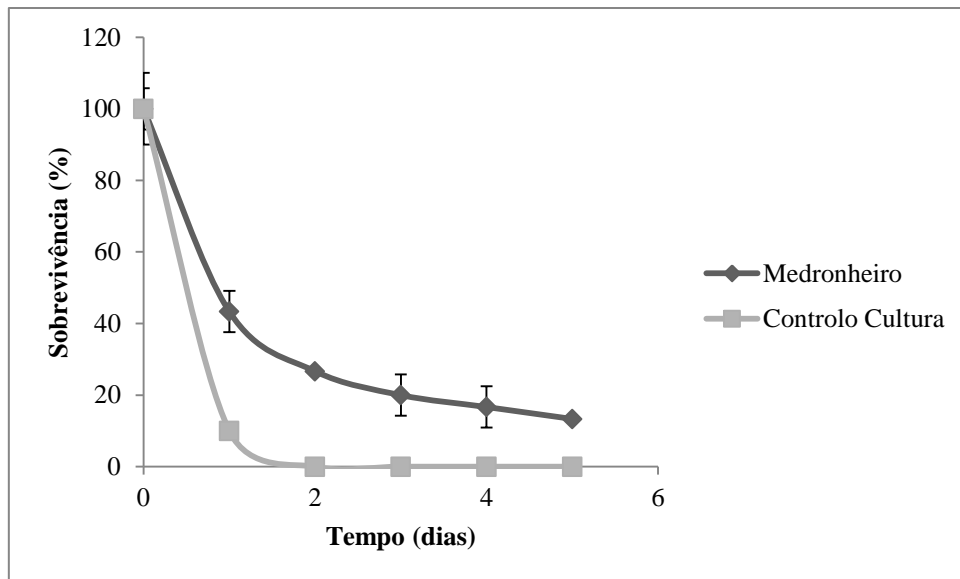


Figura 3.5.24- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe MRSA 4 tratadas (-◆-) com mel de medronheiro 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão.

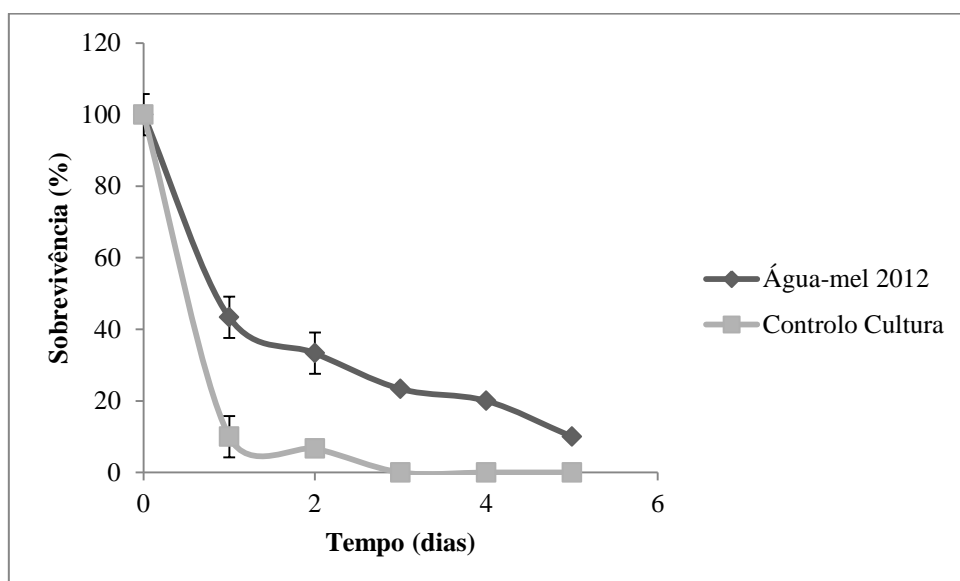


Figura 3.5.25- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe MRSA 4 tratadas (-◆-) com água-mel 2012 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão.

A sobrevivência das larvas injetadas com a suspensão de células de MRSA 4 tratadas com qualquer um dos méis ou água-mel de 2012 foi menor ($P < 0,05$) do que as larvas injetadas com a suspensão bacteriana na ausência de qualquer agente. Contudo,

na presença do mel de laranja a sobrevivência das larvas não foi significativamente diferente entre os dois grupos ($P>0,05$) nos dias 4 e 5.

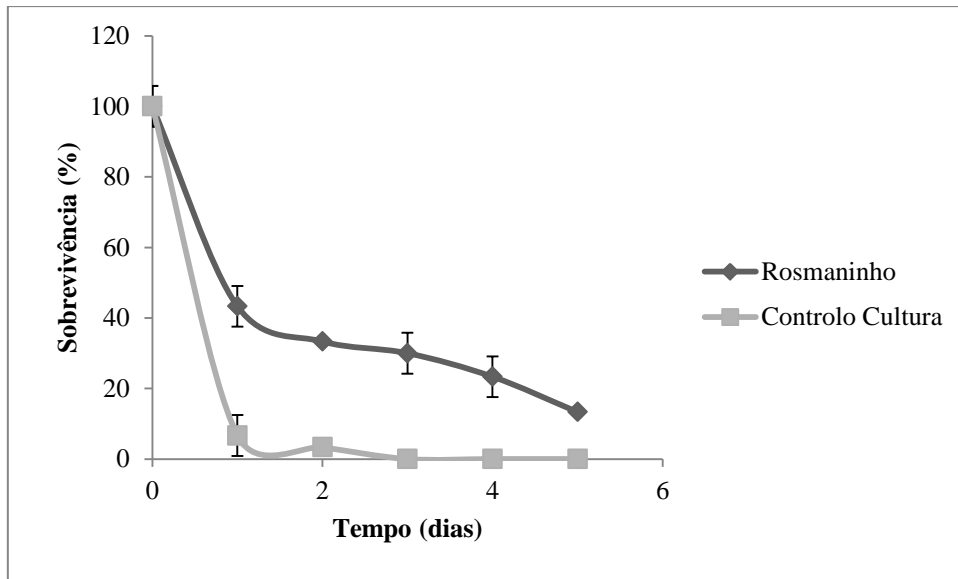


Figura 3.5.26- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe MRSA 12 tratadas (-◆-) com o mel de rosmaninho 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão.

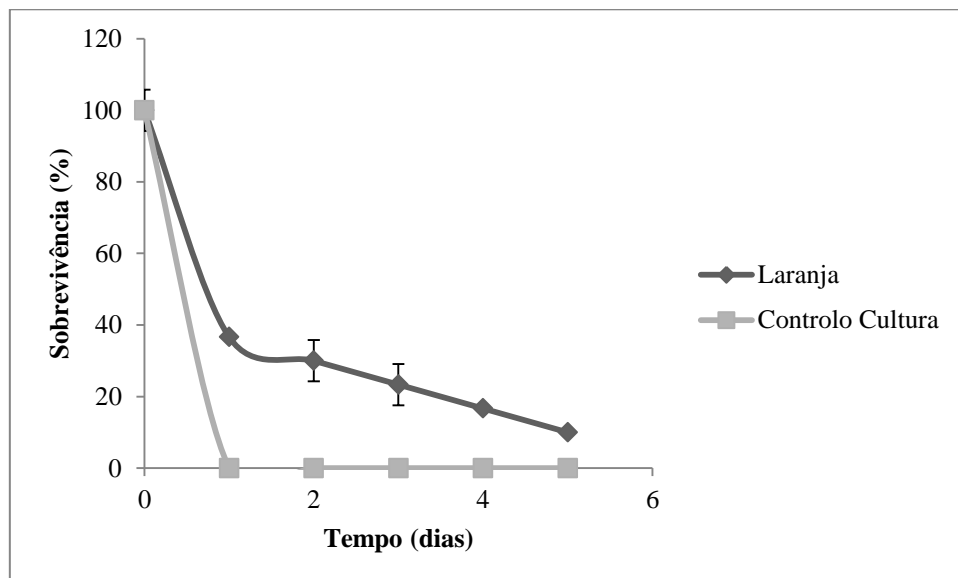


Figura 3.5.27- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe MRSA 12 tratadas (-◆-) com o mel de laranja 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão.

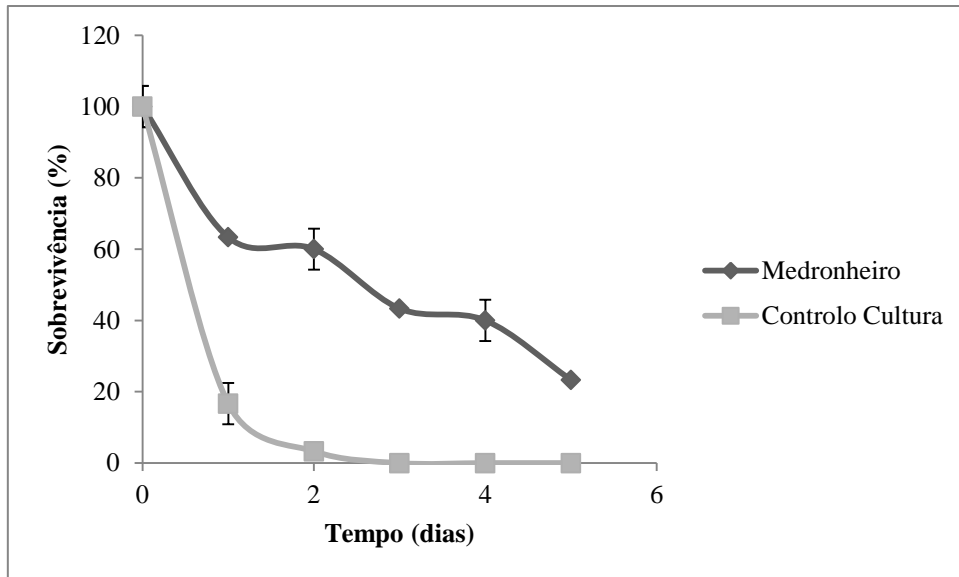


Figura 3.5.28- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe MRSA 12 tratadas (-◆-) com o mel de medronheiro 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão.

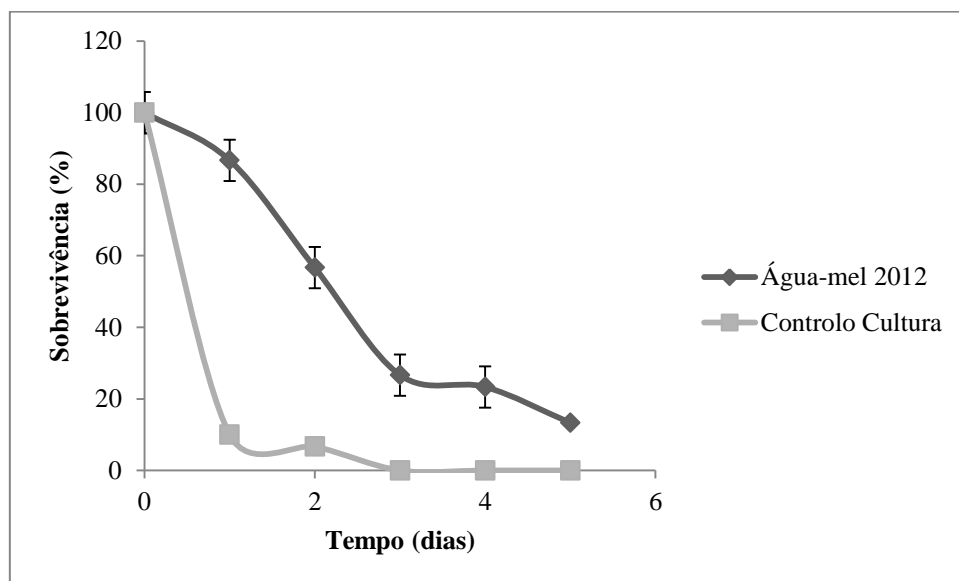


Figura 3.5.29- Sobrevivência das larvas injetadas com células da estirpe MRSA 12 tratadas (-◆-) com a água-mel 2012 25% (p/v) e células de cultura em meio BHI (-■-). Os dados são representativos de três ensaios. As barras de erro representam o desvio-padrão.

Tal como observado nas anteriores estirpes também a sobrevivência das larvas injetadas com a suspensão de células da estirpe MRSA 12 tratadas com qualquer um dos méis ou água-mel de 2012 foi significativamente maior ($P < 0,05$) quando comparada com a sobrevivência das larvas injetadas com a suspensão bacteriana na ausência de

qualquer agente. A diferença na sobrevivência foi significativa ($P < 0,05$) para todos os 5 dias.

Foi ainda possível observar que as larvas injetadas com as células controle das estirpes MRSA 4 e MRSA 12 sobreviveram significativamente menos ($P < 0,05$) que as larvas injetadas com as células controle da estirpe *S. aureus* ATCC 6538. O que indica uma maior virulência destas estirpes para além da sua maior resistência aos antibacterianos.

O modelo *Galleria mellonella* foi utilizado recentemente para testar a eficácia de agentes antibacterianos em estirpes de *S. aureus* resistentes e não resistentes à meticilina. Contudo, o mecanismo que causa a morte das larvas e a dinâmica da infecção por *S. aureus* neste modelo permanecem desconhecidos. Mesmo concentrações baixas de bactérias viáveis (10^5 ufc/mL) causam reduções significativas na sobrevivência das larvas; mas não é claro se a bactéria sujeita ao tratamento com o agente antibacteriano perde a capacidade de se dividir normalmente no hospedeiro durante a infecção ou se não produz os fatores de virulência necessários para causar a morte (Desbois et al., 2011).

Crê-se que a maioria das infeções causadas pela bactéria *S. aureus* envolvem mais que um fator de virulência, pelo que se torna relativamente difícil a identificação de um fator determinante na capacidade virulenta desta bactéria, muito em particular no presente modelo utilizado (Peacock et al., 2002). Este aspeto foi salientado num estudo anterior na avaliação da influência de uma matriz alimentar na capacidade de virulência de diferentes estirpes de *L. monocytogenes* utilizando o modelo *G. mellonella* (Schrama et al., 2013). O potencial de virulência não foi associado à maior expressão do gene *hly* que codifica a listeriolisina que foi identificada como o fator principal de virulência de *L. monocytogenes* no modelo *G. mellonella* (Joyce e Gahan, 2010).

A avaliação do impacto do tratamento com os diferentes méis e água-mel foi igualmente realizado para a bactéria *P. aeruginosa* nas concentrações de 12,5 %, 25 % e 50% (p/v). Após 16h da injeção a sobrevivência foi nula para qualquer grupo com exceção das larvas injetadas com PBS.

O tratamento com qualquer um dos méis mel ou água-mel afetou o crescimento e a capacidade de aderência de *P. aeruginosa*, contudo o potencial de virulência desta bactéria não foi afetado nas condições testadas. É possível que para diminuir ou impedir a expressão dos fatores de virulência o tempo de tratamento tenha que ser prolongado.

A avaliação do impacto do tratamento com mel e água-mel foi realizado para a bactéria *P. aeruginosa* nas concentrações de 12,5 , 25 e 50% (p/v). Após 16h da injeção todas as larvas haviam morrido, com exceção das larvas controlo PBS.

Verifica-se que esta bactéria é bastante mais virulenta quando comparada com as 3 estirpes de *S. aureus* testadas.

O tratamento com mel e/ou água-mel afeta significativamente o crescimento bacteriano e a formação de biofilme, contudo a virulência da bactéria continua elevada. Isto pode ser explicado pelo fato de o crescimento bacteriano ser afetado mas os fatores responsáveis pela virulência continuarem funcionais e a ser expressas toxinas (A e S) e outras enzimas necessárias ao processo de infeção.

3.6. Atividade anti-inflamatória

Sendo a inflamação uma resposta do organismo a uma infeção ou lesão tecidular revela-se interessante avaliar se além da influência do mel e água-mel sobre o microrganismo e sua infeção há a possibilidade destes terem uma ação benéfica quando o processo de infeção já está instalado.

3.6.1. Hialuronidase

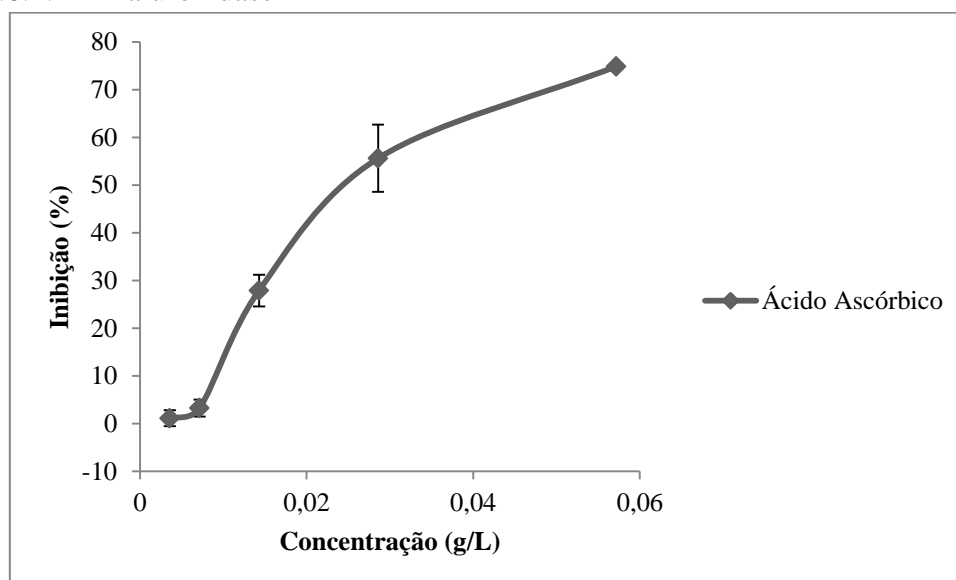


Figura 3.6.30- Percentagens de inibição das diferentes diluições da solução de ácido ascórbico (controlo).

Pela observação da curva obtida para as diluições 1:2 em série da solução de ácido ascórbico (1,2 mg/mL) verifica-se que a enzima está funcional uma vez que quando a concentração de ácido ascórbico é maior a enzima perde atividade (Fig. 3.6.30).

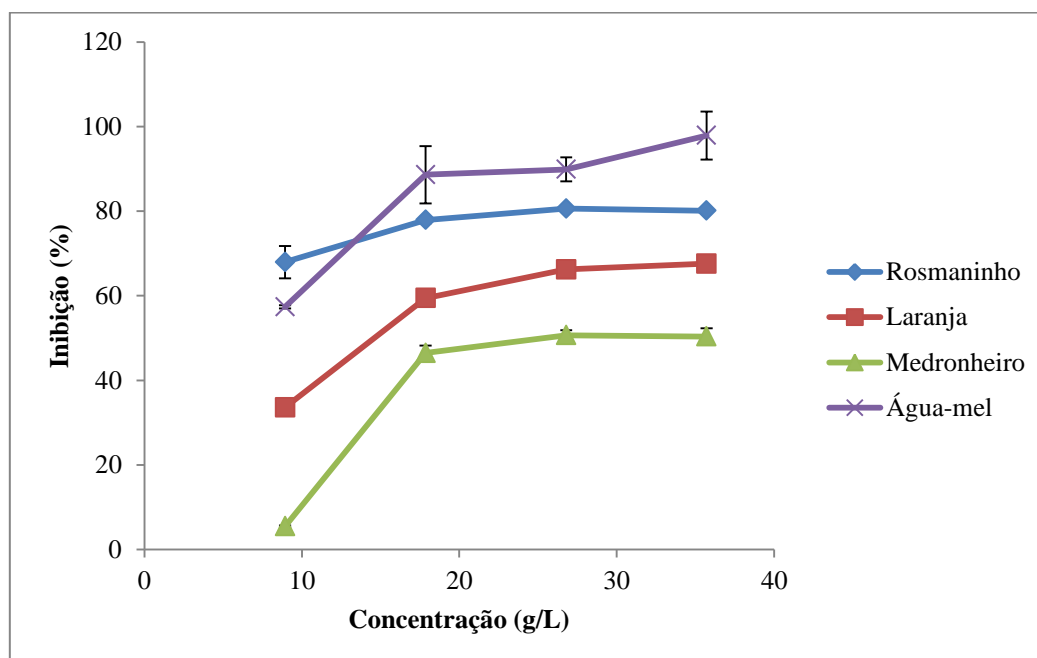


Figura 3.6.31- Percentagens de inibição da enzima hialuronidase na presença de diferentes méis e água-mel 2011.

Todas as amostras de mel e água-mel testadas possuem a capacidade de inibir a enzima hialuronidase (Fig. 3.6.31).

As percentagens de inibição enzimática ($80,43 \pm 0,30$, $77,88 \pm 0,66$ e $78,93 \pm 0,74$) encontradas para as concentrações 35,71, 26,79 e 17,86% (p/v) de mel de rosmaninho, respetivamente, não foram significativamente diferentes ($P > 0,05$). O mel de concentração 8,93% (p/v) teve uma inibição mais baixa que os restantes ($P < 0,05$), contudo registou uma taxa de inibição ainda elevada ($63,05 \pm 3,84$) (Fig. 3.6.30).

O mel de laranja nas duas concentrações mais elevadas provocou uma inibição enzimática semelhante ($p > 0,05$) com valores de inibição de $68,69 \pm 0,86$ para a concentração de 35,71% (p/v) e $66,39 \pm 1,05$ para a concentração de 26,79% (p/v). A concentração de 17,86% (p/v) registou um valor de inibição mais baixo que os anteriormente mencionados ($61,76 \pm 2,00$, $P < 0,05$). A menor influência na atividade

enzimática observou-se para a concentração mais baixa de mel e foi de $33,30 \pm 0,91$ ($P < 0,05$).

À semelhança do comportamento inibitório do mel de rosmaninho, os valores de inibição das 3 concentrações mais elevadas do mel de medronheiro não são estatisticamente diferentes ($P > 0,05$). As percentagens de inibição da hialuronidase para as concentrações de 35,71, 26,79 e 17,86% (p/v) foram de $47,93 \pm 1,93$, $48,94 \pm 1,21$ e $46,62 \pm 1,73$, respetivamente. A inibição da atividade enzimática foi mais fraca ($5,42 \pm 0,22$, $P < 0,05$) quando a concentração de mel era de 8,93% (p/v).

A inibição da atividade enzimática na presença de água-mel 2011 de concentrações de 35,71, 26,79 e 17,86% (p/v) foi quase completa (taxas de acima de 90%) e estatisticamente igual, com valores de inibição de $94,33 \pm 5,67$, $88,66 \pm 2,81$ e $93,27 \pm 6,75$, respetivamente ($p > 0,05$). A concentração de água-mel mais baixa provocou uma menor inibição da atividade da hialuronidase ($57,81 \pm 0,36$, $p < 0,05$).

Em termos estatísticos verificam-se diferenças significativas nas percentagens de inibição da hialuronidase em todas as diferentes concentrações de méis e água-mel ($p < 0,05$). O mel de medronheiro foi o que teve um menor impacto na atividade enzimática nas 4 concentrações testadas, registando menores valores de taxas de inibição. Nas concentrações de méis e água-mel de 35,71, 26,79 e 17,86% (p/v) a água-mel teve maior eficácia de inibição enzimática, seguida dos méis de rosmaninho e laranja. No caso da concentração mais baixa o mel de rosmaninho surtiu um maior impacto na inibição da hialuronidase, seguido da água-mel e mel de laranja.

A capacidade dos méis e água-mel inibir a ação da hialuronidase é de elevada importância uma vez que esta enzima catalisa a reação de hidrólise do ácido hialurónico existente nos espaços intercelular. As moléculas de ácido hialurónico presentes nos tecidos têm uma função estrutural garantindo a adesão entre as células. O ácido hialurónico ao ser degradado origina pequenos polímeros mais pequenos e consequentemente de menor viscosidade, facilitando a proliferação celular entre os tecidos, resultando da matriz extracelular (Granica et al., 2013) ; (Marchesan, et al., 2006).

3.6.2. Lipoxigenase

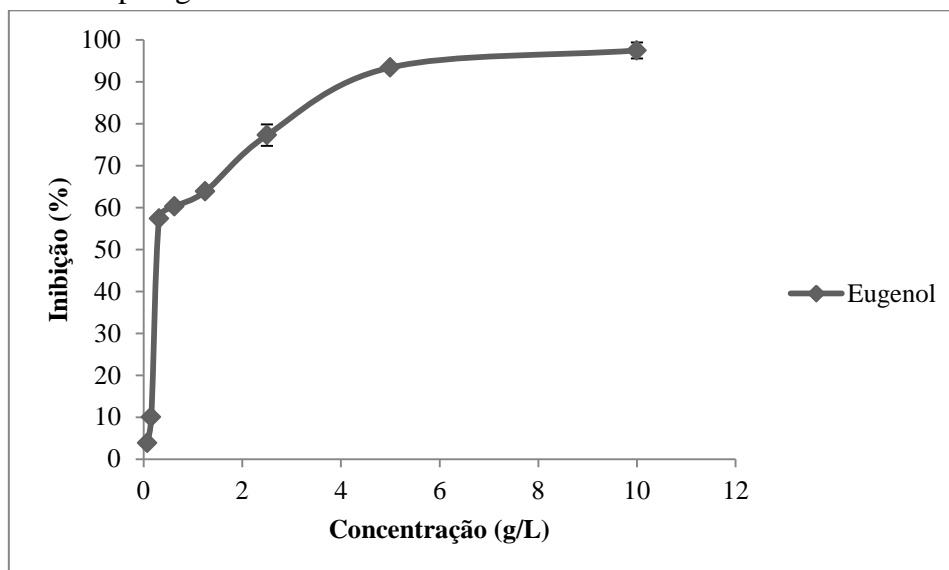


Figura 3.6.32- Percentagens de inibição das diferentes diluições da solução de eugenol (controle).

A partir da curva das diluições 1:2 em série da solução de eugenol, usada como controle, verificou-se que a enzima LOX está funcional uma vez que para concentrações de eugenol mais elevadas a inibição da enzima é maior (Fig. 3.6.32).

Tabela 3.6.11- Percentagem de inibição da enzima lipoxigenase na presença de méis e água-mel 2011 de concentração 15 g/L.

| Mel | Inibição \pm DP |
|-------------|-------------------|
| Rosmaninho | 55,76 \pm 1,20 |
| Laranja | 55,59 \pm 0,24 |
| Medronheiro | 66,07 \pm 0,62 |
| Água-mel | 96,57 \pm 0,77 |

A água-mel teve um efeito inibitório na atividade enzimática da LOX bastante superior aos méis de igual concentração testados ($P < 0,05$). Em relação aos méis, o que inibiu a atividade da enzima de forma mais elevada foi o de medronheiro ($P < 0,05$). Os méis de laranja e rosmaninho tiveram uma eficácia de inibição enzimática semelhante entre si ($P > 0,05$) e mais reduzida que os restantes.

As LOX são uma família de enzimas fundamentais na biossíntese de leucotrienos que têm um papel fundamental na fisiopatologia da inflamação (Nacoulma et al., 2012).

Os méis e água-mel testados apresentaram uma capacidade de inibição da LOX o que pode ser explicado pelo seu conteúdo em compostos fenólicos e flavonoides. A água-mel tida como mais rica neste tipo de compostos mostrou uma maior atividade anti-lipoxigenase. Vários produtos naturais que têm na sua composição compostos fenólicos e flavonoides têm sido descritos como capazes de inibir a atividade da LOX (Nacoulma et al., 2012).

Capítulo IV- Conclusões

4.1. Conclusões

Os méis monoflorais de rosmaninho, laranja e medronheiro e a água-mel possuem uma atividade antibacteriana elevada e diversa, reduzindo o crescimento bacteriano e provocando a morte bacteriana por lise. Na presença destes méis o crescimento de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e micobactérias é inibido.

A suscetibilidade das bactérias resistentes MRSA 4 e MRSA 12 à ação dos diferentes méis foi significativa, podendo ser explorada a possibilidade do uso do mel como agente terapêutico ou como adjuvante. Este estudo aponta a concentração como um fator importante para a ação do mel, uma vez que algumas concentrações promoveram o crescimento bacteriano e no caso da bactéria *Mycobacterium bovis* não foi encontrada uma dependência da ação antibacteriana com a concentração.

Verificou-se que além dos méis e água-mel inibirem o crescimento bacteriano das três estirpes *S. aureus* e da bactéria *P. aeruginosa*, influenciam também a capacidade destas bactérias aderirem a uma superfície de poliestireno. Uma vez que as bactérias em aderentes estão mais protegidas da ação de agentes antibacterianos estes resultados são de extrema importância.

Sabendo a composição rica em fenóis e flavonoides da generalidade dos méis a capacidade anti-inflamatória dos méis de rosmaninho, laranja e medronheiro e água-mel 2011 foram avaliadas. Concluiu-se que todos os méis e a água-mel inibem de forma significativa duas enzimas chave no processo inflamatório: hialuronidase e lipoxigenase. A influência do mel na ação anti-inflamatória deve ser destacada, uma vez que em alguns casos de infecção a inflamação pode ser excessiva, gerando consequências mais graves do que uma infecção ou lesão tecidual; a inflamação excessiva é um importante fator de doenças inflamatórias.

Este estudo sugere que o méis e água-mel da região do Algarve são potenciais agentes para o controlo bacteriano. Estes produtos podem ser usados com o objetivo de atrasar ou a progressão de uma infecção ou usados como barreira protetora (por exemplo: usar o mel em feridas da pele).

A ação dos diferentes méis na diminuição da capacidade de virulência de estirpes resistentes e não resistentes de *S. aureus* foi evidente com a utilização do

modelo *G. mellonella*. Em contraste a capacidade de virulência da bactéria *P. aeruginosa* não foi afetada.

4.2. Perspetivas futuras

Os fatores responsáveis pela variação da atividade antimicrobiana do mel são complexos e numerosos. Portanto estudos de investigação não só de méis mais reconhecidos pelas suas propriedades antibacterianas (mel Manuka) mas também em outros produzidos localmente, como o caso dos méis e água-mel usados no âmbito desta tese de mestrado tem elevado interesse.

Os resultados obtidos na utilização dos méis testados como agentes no controlo do crescimento bacteriano são muito promissores pelo que será interessante explorar a sinergia entre os méis e os antibióticos utilizados frequentemente na terapêutica, bem como observar o desenvolvimento de resistências em bactérias patogénicas resistentes e não resistentes, como aquelas que foram utilizadas no presente estudo.

Seria interessante igualmente estudar o mecanismo pelo qual o mel inibe o crescimento, aderência e virulência bacteriana.

Capítulo V- Bibliografía

(IWGSCC) International Working Group on the Classification of SCC elements (2009) Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec):guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 4961–4967.

Abate G., Aseffa A., Selassie A., Goshu S., Fekade B., WoldeMeska, D., Miörner H. (2004) Direct Colorimetric Assay for Rapid Detection of Rifampin-Resistant Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* **42**:871

Abd-El A.M., El-Hadidy M.R., El-Mashad N.B., El-Sebaie A.H. (2007) Antimicrobial effect of bee honey in comparasion to antibiotics on organisms isolated from infected burns. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 4961–4967

Adrião A., Vieira M., Fernandes I., Barbosa M., Sol M., Tenreiro R. P., Chambel L., Barata B., Zilhão I., Shama G., Perni S., Jordan S. J., Andrew P. W., Faleiro M. L. (2008) Marked intra-strain variation in response of Listeria monocytogenes dairy isolates to acid or salt stress and the effect of acid or salt adaptation on adherence to abiotic surfaces. *International Journal of Food Microbiology* **123**:142-150.

Alandejani T., Marsan J., Ferris W., Slinger R., Chan F. (2009) Effectiveness of honey on Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa biofilms. *American Academy of Otolaryngology–Head and Neck Surgery Foundation*.

Al-Jabri A. A. (2005) Honey, milk and antibiotics. *African Journal of Biotechnology*. **4**:1580-1587.

Alvarez-Saurez J.M., Tulipani S., Romandini S., Bertoli F. Battino M. (2010) Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Journal of Nutrition and Metabolism* **3**: 15-23

Alvarez-Suarez J.M., Sara Tulipani S., Díaz D., Estevez Y., Romandini S., Giampieri F., Damiani E., Astolfi P., Bompadre S., Battino M. (2010) Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food and Chemical Toxicology* **48**: 2490–2499.

Andrejko M. e Mizerska-Dudka M. (2012) Effect of Pseudomonas aeruginosa elastase B on level an activity of immune proteins/peptides of Galleria mellonella hemolymph. *Journal of Insect Science*.

Baltrusaityte V., Venskutonis P. R. , Ceksteryte V. (2007) Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry* **101**.

Basualdo C., Sgroy V., Finola M. S., Marioli J. M. (2007) Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Veterinary Microbiology* **124**: 375–381.

Bilsel Y., Bugra D., Yamaner S., Bulut T., Cevikbas U., Turkoglu U. (2002) Could honey have a place in colitis therapy? Effects of honey, prednisolone, and disulfiram on inflammation, nitric oxide, and free radical formation. *Digestive Surgery* **19**: 306-31.

Bogdanov S. (1997) Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Wiss.u.Technol.* **30**: 748-753.

- Bogdanov S. (2012) Honey in Medicine. In Book of Honey. *Bee Product Science*, www.bee-hexagon.net. 1-19.
- Bogdanov S. (1984) Characterization of antibacterial substances in honey. *Lebensm. Wiss.u.Technol* **17**:74-76.
- Bogdanov, S.; Tomislav J., Robert S., Peter G. (2008) Honey for nutrition and health: A review. *American College of Nutrition* **27**.
- Bogdanov S. (2009) *Book of honey*. Bee Product Science www.bee-hexagon.net Chap. 5 pp 1-8.
- Brackman G., Cos P., Maes L., Nelis H. J., Coenye T. (2011) Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo. *American Society for Microbiology*.
- Brudzynski, K, Abubaker, K e D., Miotto (2011) Unraveling a mechanism of honey antibacterial action: Polyphenol/H₂O₂-induced oxidative effect on bacterial cell growth and on DNA degradation. *Elsevier Ltd*.
- Carson C. F., Mee, Brian J. e Riley, Thomas V. (2002) Mechanism of action of melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill curve, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *American Society for Microbiology* **46**.
- Compaoréa M., Lamien C. E., Lamien-Meda A., Vlase L., Kiendrebeogo M., Ionescu C., Nacoulma O. G. (2012) Antioxidant, xanthine oxidase and lipoxygenase inhibitory activities and phenolics of Bauhinia rufescens Lam. (Caesalpinaceae). *Natural Product Research* **26**.
- Cooper R.A., Wigley P. , Burton N. F. (2000) Susceptibility of multiresistant strains of Burkholderia cepacia to honey. *Letters in Applied Microbiology* **31**: 20-24.
- Corner L. A. L., Murphy D., Gormley E. (2011) Mycobacterium bovis Infection in the Eurasian Badger (Meles meles): the Disease, Pathogenesis, Epidemiology and Control. *Elsevier Ltd*.
- Costerton J. W. (1999) Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*.
- Cross A. S. (2008) What is a virulence factor? *BioMed Central Ltd* **12**.
- Cucarella C., Tormo M. A., Knecht E., Amorena B., Lasa I. (2002) Expression of the Biofilm-Associated Protein Interferes with Host Protein Receptors of Staphylococcus aureus and Alters the Infective Process. *Infection and Immunity* **70**.
- D'Argenio D. A., Gallagher L. A., Berg C. A., Manoil C. (2001) Drosophila as a Model Host for Pseudomonas aeruginosa Infection. *American Society for Microbiology*.
- Desbois A. P. , Coote P. J. (2011) Wax moth larva (Galleria mellonella): an in vivo model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

- Donlan R. M., Costerton J. W. (2002) Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *American Society for Microbiology*.
- Eteraf-Oskouei T. , Najafi M. (2012) Traditional and Modern Uses of Natural Honey in Human Diseases: A Review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*.
- FAO (2012) faostat. Food and Agricultural Organization of the United Nations. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>, consultado em 25 de Setembro 2013.
- Ferreiro J., Reis P, Castanhinha S., Pereira L., Barreto C. (2010) Colonização por *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina: Que impacto na morbidade de doentes pediátricos com fibrose quística? *Revista Portuguesa de Pneumologia* **15**.
- Ferreira I. C.F.R., Edmur A., Barreira J. C.M., Estevinho, L. M. (2009) Antioxidant activity of portuguese honey samples: different contribution of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry* **114**: 1438-1443.
- Franzblau S. G., Witzig R. S., McLaughlin J. C., Torres, P. (1998) Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate alamar blue assay. *Journal of Clinical Microbiology* **36**.
- Gelatti L. C., Bonamigo R. R., Becker A. P., D'Azevedo P. A. (2009) *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina: disseminação emergente na comunidade. *Anais Brasileiros de Dermatologia*.
- Gheldof N., Wang X.H., Engeseth N. J. (2004) Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Glasser J. S., Guymon C. H., Mende K., Wolf S. E., Hospenthal D. R., Murray C. K. (2012) Activity of topical antimicrobial agents against multidrug-resistant bacteria recovered from burn patients. *Elsevier Ltd* **36**.
- GPP. (2010) Programa apícola nacional triénio 2011-2013. Versão Electrónica. Recuperado em 2013, Setembro 25 de www.gpp.pt/MA/apicultura/PAN_2011_13.pdf.
- Granica S., Czerwińska M. E., Piwowarski, J. P., Ziąja, M., Kiss A.K. (2013) Chemical composition, antioxidative and anti-inflammatory activity of extracts prepared from aerial parts of *Oenothera biennis* L. and *Oenothera paradoxa* Hudziok obtained after seeds cultivation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Henriques A. F., Jenkins R. E., Burton N. F., Cooper R. A. (2010) The effect of manuka honey on the structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *European journal of microbiology and infectious diseases*.
- Henriques A. F., Jenkins R. E., Burton N. F., Cooper R. A. (2011) The effect of manuka honey on the structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *European journal of microbiology and infectious diseases*.
- Huttunen S., Riihinen K., Kauhanen J., Tikkanen-kaukanen C. (2012) Antimicrobial activity of different Finnish monofloral honeys against human pathogenic bacteria. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*.

- Jander G., Rahme L. G., Ausubel F. M., (2000) Positive Correlation between Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Mutants in Mice and Insects. *American Society for Microbiology*.
- Jenkins R. E., Cooper R. (2012) Synergy between oxacillin and manuka honey sensitizes methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin. *Jour Antimicrob Chemother* **67**: 1405–1407.
- Lu J., Carter D. A., Turnbull L., Rosendale D., Hedderley D., Stephens J., Gannabathula S., Steinhorn G., Schlothauer R. C., Whitchurch C. B. (2013) The effect of New Zealand Kanuka, Manuka and Clover Honeys on bacterial growth dynamics and cellular morphology varies according to the species. *PLOS ONE* **8**.
- Lusby P. E., Coombes A., Wilkinson J. M. (2002) Honey : a potent agent for wound healing? *Journal of Wound, Ostomy and Continence Nurses Society* **29**.
- Lyon G.J., Novick R.P. (2004) Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides* **25**:1389–1403.
- Mahajan-Miklos S., Rahme L. G., Ausube F. M. (2000) Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts. *Blackwell Science Ltd*.
- Mandal M. D., Mandal S. (2011) Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Elsivier*.
- Manna A. C., Ray B. (2007) Regulation and characterization of rot transcription in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **153**.
- Manyi-Loh C.E., Clarke A. M., Ndip R. N. (2011) An overview of honey: therapeutic properties and contribution in nutrition and human health. *African Journal of Microbiology Research* **5**.
- Marchesan E. D., Ferronato R., Bednarski F., Alencar S. M., Onofre S. B. (2006) Ação dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* d.c. e *Baccharis uncinella* d.c. (asteraceae) sobre a atividade hialuronidase. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR* **10**.
- Miguel M.G., Antunes D., Aazza S., Duarte J., Faleiro M.L. (2013b) Honey-based “água-mel” chemical characterization and microbiological quality. *Italian Journal of Food Science* **3** (In press).
- Miguel M.G., Faleiro M.L., Antunes M.D., Aazza S., Duarte J., Silvério A. (2013c) Antimicrobial, antiviral and antioxidant activities of “água-mel” from Portugal. *Food and Chemical Toxicology* **56**: 136-144.
- Miguel M.G., Faleiro M.L., Antunes D., Aazza S. (2013^a) Água-Mel: Alterações físico-químicas durante o processo de fabrico. *OApicultor* **80**: 15-16.
- MILES A. A., MISRA S. S. (1938) The estimation of the bactericidal power of the blood. s.l. : *Journal of Hygiene* **38**.
- Milheiro C., Oliveira D.C., Lencastre H. (2007) Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**: 3374–3377.

- Mittal L., Kakkar P., Verma A., Dixit K. K., Mehrotra, M. (2012) Anti microbial activity of honey against various endodontic micro organisms- an in vitro study. *Journal of International Dental and Medical Research* **5**.
- Molan P.C. (1992) The antibacterial activity of honey: 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. *Bee World* **73**.
- Montoro, E., Lemus, D., Echemendia, M., Martin, A. (2005) Comparative evaluation of nitrate reduction assay, the MTT test, and the reazurin microtite assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium bovis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55**.
- Moussallem B. C., Kury C. M. H., Medina-Acosta, E. (2007) Detecção dos genes *mecA* e *femA*, marcadores moleculares de resistência a meticilina, em *Staphylococcus* spp. isolados de pacientes admitidos em uma Unidade Neonatal de Tratamento Intensivo. *Revista Científica da FMC*.
- Mshana R. N.; Tadesse G., Abate G., Miorner H. (1998) Use of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* **36**.
- Murray P. R., Rosenthal K. S., Pfaüer M. A. (2005). *Medical Microbiology*, 5th Edition. Elsevier Inc Chap IV.
- Nacoulma A. P., Compaore M., Lorenzi M., Kiendrebeogo M., Nacoulma O. G. (2012) In vitro Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Extracts from *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) Leafy Galls Induced by *Rhodococcus fascians*. *Journal of Phytopathology*.
- Namias N. (2003) Honey in the management of infections. *Surgical Infections* **4**.
- Nasir N. M., Halim A. S., Singh K. B., Dorai A. A., Haneef M. M. (2010) Antibacterial activity of tualang honey and its effect in burn wound management: a comparative study. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **10**.
- Nicolaas J. B., Sias R. G. (2008) Antimicrobial activity of two South African honeys produced from indigenous *Leucospermum cordifolium* and *Erica* species on selected micro-organisms. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **8**.
- Okuma K., Iwakawa K., Turnidge J.D., Grubb W.B., Bell J.M., O'Brien F.G., Coombs G.W., Pearman J.W., Tenover F.C., Kapi M., Tiensasitorn C., Ito T., Hiramatsu K. (2002) Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. *J Clin Microbiol* **40**.
- O'Reilly L. M., Daborn C. J. (1995) The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*.
- Ostrosky E.A.; Mizumoto M. K., Lima, M. E. L., Kaneko T. M. (2008) Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*.
- Pala F. S., Gürkan H. (2008) The role of free radicals in ethiopathogenesis of diseases. *Journal of Molecular Biology*.

- Patton T.; Barrett J., Brennan J., Moran N. (2006) Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. *Journal of Microbiological Methods* **64**.
- Peacock J. S., Moore C. E., Justice A., Kantzanou M., Story L., Mackie K., O'Neill G., Day N. P. J. (2002) Virulent Combinations of Adhesin and Toxin Genes in Natural Populations of *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* **70**.
- Pollock J. M., Neill S. D. (2002) *Mycobacterium bovis* Infection and Tuberculosis in Cattle. *Elsevier Science Ltd*.
- Price S.L., Huddersman K. D., Shen, J., Walsh S. E. (2012) Mycobactericidal activity of hydrogen peroxide activated by a novel heterogeneous Fentons-like catalyst system. *Letters in Applied Microbiology* **56**.
- Roberts A. E. L., Maddocks S. E, Cooper R. A. (2012) Manuka honey is bacterial against *Pseudomonas aeruginosa* and results in differential expression of *oprF* and *algD*. *Journal of Microbiology* **158**: 3005–3013.
- Sánchez B. G. J. , Kouznetsov V. V. (2010) Antimycobacterial susceptibility testing methods for natural products research. *Brazilian Journal of Microbiology* **41**.
- Sato T., Miyata G. (2000) The nutraceutical benefit, Part III: Honey. *Elsevier Science Inc*.
- Schrama D., Helliwell N., Neto L., Faleiro M.L. (2013) Adaptation of *Listeria monocytogenes* in a simulated cheese medium: effects on virulence using the *Galleria mellonella* infection model. *Letters in Applied Microbiology*.
- Sethi S., Medhi B., Kumar S., Puri A., Sharma M. (2012) Effect of Manuka Honey on MDR TB: an in Vitro Study. *J Rational Pharmacother Res*.
- Shu Z., Weigel K. M., Soelberg S. D., Lakely A., Cangelosi G. A. (2012) Cryopreservation of *Mycobacterium tuberculosis* complex cells. *Journal of Clinical Microbiology* **50**: 3575-3580.
- Spano N., Ciulu M., Floris I., Panzanelli A., Pilo M.I., Piu P.C., Scanu R., Sanna G. (2008) Chemical characterization of a traditional honey-based Sardinian product: Abbamele. *Food Chem*. **108**: 81–85.
- Subrahmanyam M. (2007) Topical application of honey for burn wound treatment - an overview. *Ann Burns Fire Disasters* **30**:137-139.
- Iglesias M. T., Lorenzo C., Polo M. C., Martin-Alvarez P. J., Pueyo E. (2004) Usefulness of amino acid composition to discriminate between honeydew and floral honeys. Application to honeys from a small geographic area. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**.
- Taormina P.J., Niemira B.A., Beuchat L.R., (2001) 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* **69**.
- Valdivia R. H., (2004) Modeling the Function of Bacterial Virulence Factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *American Society for Microbiology*.

Van den Berg A. J. , Van den Worm E. , Van Ufford H. C., Halkes S. B, Hoekstra M. J., Beukelman, C. J. (2008) An in vitro examination of the antioxidant and anti-inflammatory properties of buckwheat honey. *Journal of Wound Care* **17**: 172–178.

Willix D.J., Molan P. C. , Harfoot C. G. (1992) A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of Manka honey and other honey. *Journal of Applied Bacteriology* **73**.

Zumla A., Lulat A. (1989) Honey- a remedy rediscovered. *Journal of the Royal Society of Medicine* **82**.

Anexos

Anexo 1

Preparação soluções

Soluto de Ringer (Biokar Diagnostics, Beauvais, França)

- 1 Comprimido em 500 ml de água destilada. Cada comprimido contém:

- 2,25 g de cloreto de sódio (NaCl)
- 0.105 g de cloreto de potássio (KCl)
- 0.12 g de cloreto de cálcio (CaCl)
- 0.05 g de bicarbonato de sódio (NaHCO₃)

Tampão fosfato salino (PBS) – 1x

- 1,4 mM Fosfato de potássio, monobásico (KH₂PO₄)
- 4,3 mM Fosfato de sódio, dibásico (Na₂HPO₄)
- 2,7 mM Cloreto de potássio (KCl)
- 137 mM Cloreto de sódio (NaCl)

Anexo 2

Tabela 12- Sobrevivência das larvas tratadas com o mel e controle ± DP.

| Bac téri a/es tirp e | Mel | Sobrevivência (%) | | | | | |
|----------------------------------|----------------------|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | Tempo (dias) | | | | | |
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| AT CC 653 8 | Rosm aninh o | 100 ± 0 | 100 ± 0 | 66,67 ±5,77 | 60±10 | 43,33 ±5,77 | 26,6± 5,77 |
| | Contr olo | 100 ± 0 | 70±0 | 46,67 ±5,77 | 26,67 ±5,77 | 23,33 ±5,77 | 6,67± 5,77 |
| | Laran ja | 100 ± 0 | 93,33 ±5,77 | 46,67 ±5,77 | 46,6± 5,77 | 46,67 ±5,77 | 43,33 ±5,77 |
| | Contr olo | 100 ± 0 | 70±0 | 33,33 ±5,77 | 26,67 ±5,77 | 23,33 ±5,77 | 6,67± 5,77 |
| | Medr onheir o | 100 ± 0 | 96,67 ±5,77 | 93,33 ±5,77 | 90 ± 0 | 86,67 ±5,77 | 83,33 ±5,77 |
| | Contr olo | 100 ± 0 | 76,67 ±5,77 | 56,67 ±5,77 | 23,33 ±5,77 | 13,33 ±5,77 | 10±0 |
| | Água- mel 2012 | 100 ± 0 | 58,89 ±9,28 | 40,00 ±8,66 | 32,22 ±6,67 | 28,89 ±7,82 | 27,78 ±8,33 |

| | | | | | | | |
|-------------------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | Contr | 100 ± | 43,33 | 23,33 | 16,67 | 10±0 | 6,67± |
| | olo | 0 | ±5,77 | ±5,77 | ±5,77 | | 5,77 |
| MR SA 4 | Rosm | 100 ± | 56,67 | 43,33 | 43,33 | 33,33 | 23,33 |
| | aninh | 0 | ±5,77 | ±5,77 | ±5,77 | ±5,77 | ±5,77 |
| | o | | | | | | |
| | Contr | 100 ± | 23,33 | 6,67± | 0±0 | 0±0 | 0±0 |
| | olo | 0 | ±5,77 | 5,77 | | | |
| | Laran | | 43,33 | 33,33 | 20 ± 0 | 6,67± | 3,33± |
| | ja | | ±5,77 | ±5,77 | | 5,77 | 5,77 |
| Contr | 100 ± | 26,67 | 6,67± | 0±0 | 0±0 | 0±0 | |
| olo | 0 | ±5,77 | 5,77 | | | | |
| Medr | 100 ± | 43,33 | 26,67 | 20 ± 0 | 16,67 | 13,33 | |
| onheir | 0 | ±5,77 | ±5,77 | | ±5,77 | ±5,77 | |
| o | | | | | | | |
| Contr | 100 ± | 10±0 | 0±0 | 0±0 | 0±0 | 0±0 | |
| olo | 0 | | | | | | |
| Água- | 100 ± | 43,33 | 33,33 | 23,33 | 20 ± 0 | 10 ± 0 | |
| mel | 0 | ±5,77 | ±5,77 | ±5,77 | | | |
| 2012 | | | | | | | |
| Contr | 100 ± | 10±0 | 0±0 | 0±0 | 0±0 | 0±0 | |
| olo | 0 | | | | | | |
| MR SA 12 | Rosm | 100 ± | 43,33 | 33,33 | 30 ± 0 | 23,33 | 13,33 |
| | aninh | 0 | ±5,77 | ±5,77 | | ±5,77 | ±5,77 |
| | o | | | | | | |
| | Contr | 100 ± | 6,67± | 3,33± | 0±0 | 0±0 | 0±0 |
| | olo | 0 | 5,77 | 5,77 | | | |
| | Laran | 100 ± | 36,67 | 30 ± 0 | 23,33 | 16,67 | 10 ± 0 |
| | ja | 0 | ±5,77 | | ±5,77 | ±5,77 | |
| Contr | 100 ± | 0±0 | 0±0 | 0±0 | 0±0 | 0±0 | |
| olo | 0 | | | | | | |
| Medr | 100 ± | 63,33 | 60 ± 0 | 43,33 | 40 ± 0 | 23,33 | |
| onheir | 0 | ±5,77 | | ±5,77 | | ±5,77 | |
| o | | | | | | | |
| Contr | 100 ± | 16,67 | 3,33± | 0±0 | 0±0 | 0±0 | |
| olo | 0 | ±5,77 | 5,77 | | | | |
| Água- | 100 ± | 86,67 | 56,67 | 26,67 | | 13,33 | |
| mel | 0 | ±5,77 | ±5,77 | ±5,77 | | ±5,77 | |
| 2012 | | | | | | | |
| Contr | 100 ± | 10±10 | 6,67± | 0±0 | 0±0 | 0±0 | |
| olo | 0 | | 5,77 | | | | |