

# AÇÃO ANTIMICROBIANA DO MEL EM LEITE FERMENTADO

## RESUMO

O mel é uma substância que há muito tempo é utilizada como alimento pelo homem. Possui propriedades antimicrobianas devido à sua acidez, ação de enzimas, concentração de açúcares e flavonóides. O objetivo deste estudo foi verificar a ação antimicrobiana do mel em leite fermentado, determinando para tal a faixa de concentração ideal do composto em questão para inibição de bactérias mesófilas. Os resultados mostram que o mel possui efeito inibidor sobre os microorganismos do leite fermentado, sendo a concentração de mel ideal encontrada entre 1,5% e 2,5%.

**Palavras-chaves:** mel, propriedades antimicrobianas, leite fermentado

## SUMMARY

Honey is a substance that a long time ago has been used as food by man. It has antimicrobial properties due to its acidity, action of enzymes, sugar concentration and flavonoids. The objective of this study was to verify antimicrobial action of honey in fermented milk, determining for this the ideal concentration band of the mixture in question to inhibit the mesophile bacteria. The results shows honey has inhibited effect against fermented milk microorganisms, being the ideal concentration of honey found between 1,5% and 2,5%.

**Keywords:** honey, antimicrobial properties, fermented milk

## INTRODUÇÃO

O mel, que é usado como alimento pelo homem desde a pré-história, por vários séculos foi retirado dos enxames de forma extrativista e predatória, muitas vezes causando danos ao meio ambiente e matando as abelhas. Entretanto, com o tempo, o homem foi aprendendo a proteger seus enxames, instalá-los em colméias racionais e manejá-los de forma que houvesse maior produção de mel sem causar prejuízo para as abelhas. Nascia, assim, a apicultura (CAMARGO *et al.*, 2003).

Muitas das terapias milenares de civilizações antigas utilizaram os produtos das abelhas como valiosos recursos terapêuticos e/ou conservativos. As histórias das medicinas das civilizações tibetana, egípcia e também a greco-romana são muito ricas, todas contendo em seus escritos antigos, centenas de receitas onde entram principalmente mel, própolis, larvas de abelhas e às vezes as próprias abelhas, para curar ou prevenir enfermidades. Merece destaque a Bíblia Sagrada, oriunda da Civilização Hebraica, que em alguns textos enal-

tece ao mesmo tempo em que enobrece as propriedades alimentícias e medicinais do mel. (PARK *et al.*, 2003).

Na legislação brasileira (Instrução Normativa nº 11) “entende-se por mel o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou secreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colméia” (Brasil, Ministério da Agricultura e Abastecimento, 2000).

O mel, mesmo quando processado para uso comercial, é essencialmente um produto natural e bastante variável em coloração, aroma, teor de umidade, composição de açúcares, minerais e outros componentes. Estes atributos dependem do clima, da fonte floral e de práticas de apicultura individuais. (FELSNER, 2001).

*Ilana Racowski\*,  
Flávia Paulucci Cianga Silvas,  
Diana Tiemi Tanoue Takushi,  
Diego Willer Gomes da Silva e  
Priscila dos Santos Miranda*

\*Autora para correspondência:  
Faculdade de Tecnologia  
Termomecânica – FTT  
Departamento de Alimentos,  
Tecnologia em Alimentos  
Estrada dos Alvarengas, 4001  
CEP: 09850-550. São  
Bernardo do Campo. SP  
E-mail: ilmb@ig.com.br

No Estado de São Paulo são encontrados, com facilidade, três tipos de méis, principalmente o de flores silvestres, devido à vasta diversidade de espécies botânicas, que florescem o ano todo; os méis de flores de eucalipto (*Eucalyptus* spp), provenientes das grandes áreas de reflorestamento; e os méis de flores de laranjeira (*Citrus* spp), que possuem maior procura devido às suas características próprias obtidas a partir do néctar cítrico (KOMATSU *et al.*, 2002).

Embora o mel seja um alimento de alta qualidade, apenas o seu consumo, mesmo em grandes quantidades, não é suficiente para atender a todas as nossas necessidades nutricionais. Na Tabela I, apresenta-se os nutrientes do mel em relação aos requerimentos humanos. (CAMARGO, *et al.*, 2003).

Além de sua qualidade como alimento, esse produto único é dotado de inúmeras propriedades terapêuticas, sendo utilizado pela medicina popular sob diversas formas e associações como fitoterápicos. De maneira geral, destinam-se ao mel inúmeros efeitos benéficos em várias condições patológicas. (CAMARGO *et al.*, 2003).

Propriedades antissépticas, antibacterianas também são atribuídas ao mel, fazendo com que ele seja utilizado como coadjuvante na área terapêutica em diversos tratamentos profiláticos (STONOGA & FREITAS, 1991).

Sua propriedade antibacteriana foi tal estudada por diversos autores em seus trabalhos científicos, como: Adcock (1962); White & Subers (1963); White *et al.*, (1966); Dustmann (1979);

Molan & Russell (1988); Allen *et al.* (1991); Cortopassi-Laurino & Gelly (1991). Sua ação fungicida foi estudada por Efem *et al.* (1992), cicatrizante por Bergman *et al.* (1983), Efem, (1988), Green (1988), Gupta *et al.* (1993) e promotora da epitelização das extremidades de feridas por Efem (1988).

Popularmente, ao mel ainda se atribuem outras propriedades como antianêmica, emoliente, antiputrefante, digestiva, laxativa e diurética (VERÍSSIMO, 1987).

Atualmente, alguns países como a França e a Itália já vêm objetivando a produção de mel com propostas terapêuticas específicas, como nos tratamentos de úlceras e problemas respiratórios (YANIV & RUDICH, 1996).

O Brasil é, atualmente, o sexto maior produtor de mel, ficando atrás somente da China, Estados Unidos, Argentina, México e Canadá (CAMARGO *et al.*, 2003).

Baseando-se em estudos prévios sobre a ação antimicrobiana do mel, o presente trabalho tem por finalidade comprovar tal efeito bactericida sobre os microorganismos existentes em leite fermentado, determinando-se a faixa de concentração de mel ideal para atingir tal inibição.

Mais recentemente foi descoberto que o mel apresenta um efeito inibitório sobre aproximadamente 60 espécies de bactérias incluindo aeróbicas e anaeróbicas, gram-positivas e gram-negativas. Uma ação antifúngica foi também observada em algumas leveduras e espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (MOLAN, 1992).

**Tabela I.** Nutrientes do mel em relação aos requerimentos humanos

Nutriente	Unidade	Quantidade em 100 g de mel	Ingestão diária recomendada
Energia	Caloria	339	2800
<b>Vitaminas:</b>			
A	U.I	-	5000
B1	mg	0,004 - 0,006	1,5
<b>Complexo B2:</b>			
Riboflavina	mg	0,02 - 0,06	1,7
Niacina	mg	0,11 - 0,36	20
B6	mg	0,008 - 0,32	2
Ácido Pantotênico	mg	0,02 - 0,11	10
Ácido Fólico	mg	-	0,4
B12	mg	-	6
C	mg	2,2 - 2,4	60
D	U.I	-	400
E	U.I	-	30
BIOTINA	mg	-	0,330

Fonte: CAMARGO *et al.*, 2003.

Um estudo realizado com 27 diferentes fontes florais de mel e de diferentes localidades dos Estados Unidos analisou a capacidade do mel em inibir o crescimento de sete microorganismos deteriorantes (*Alcaligenes faecalis*, *Aspergillus niger*, *Bacillus stercorophilus*, *Geotrichum candidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Penicillium expansum*, *Pseudomonas fluorescens*) e cinco patógenos contaminantes (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus*) (MUNDO et al., 2004).

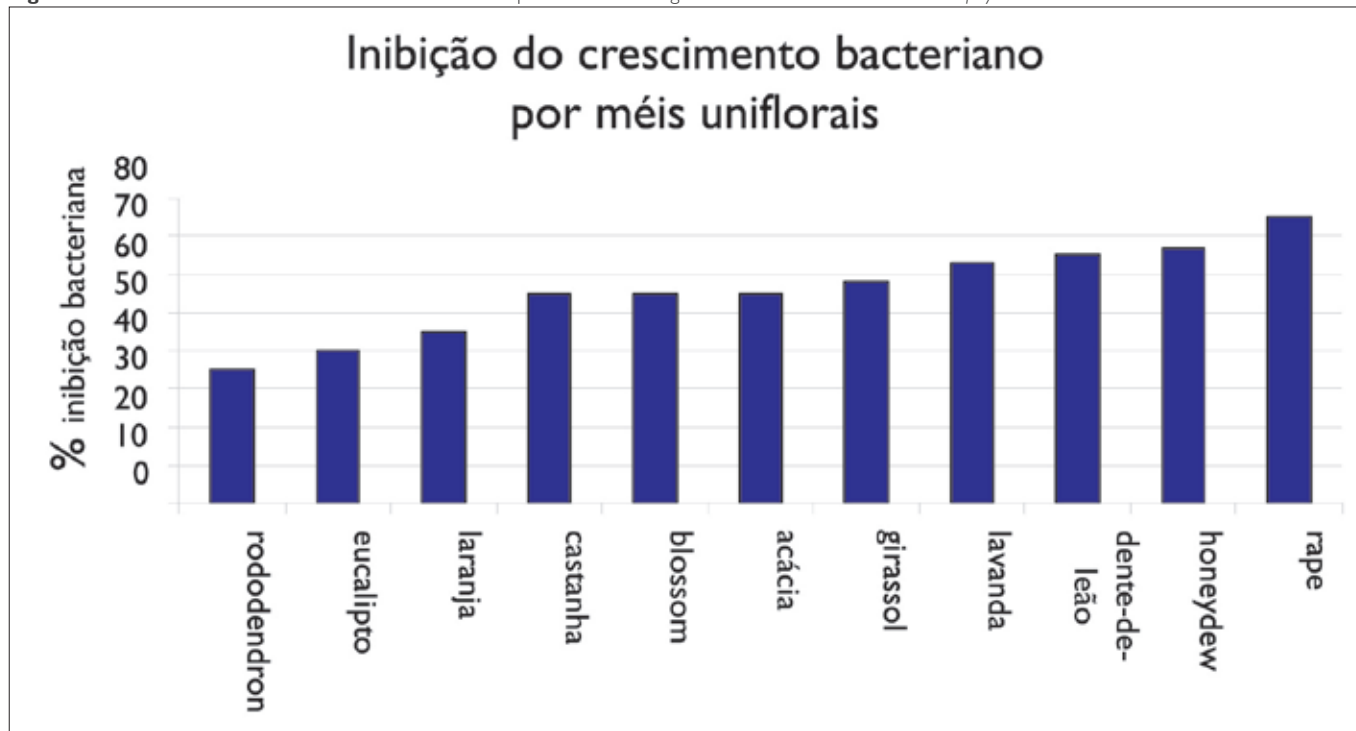
Segundo Bogdanov (1997), as substâncias bactericidas são originárias das plantas, por este motivo causam capacidade inibitória nos diferentes méis uniflorais, conforme pode ser visto na Figura 1.

A composição média do mel, em termos esquemáticos, pode ser resumida em três componentes principais: açúcares, água e diversos (CAMPOS, 1987), conforme apresentado na Tabela 2.

Segundo Molan (1992) e Wahdan (1998), os responsáveis por essa habilidade antimicrobiana são os fatores físicos, como sua alta osmolaridade e acidez, e os fatores químicos relacionados com a presença de substâncias inibidoras, como o peróxido de hidrogênio, e substâncias voláteis, como os flavonóides e ácidos fenólicos.

Mel, como outros xaropes saturados de açúcar e misturas de açúcares, tem uma osmolaridade suficiente para inibir o

Figura 1. Atividade Antimicrobiana não relacionada com o peróxido de hidrogênio de diferentes méis contra *Staphylococcus aureus*



Fonte: BOGDANOV, 1997

Tabela 2. Quantidades médias (%) de constituintes importantes do mel

Nutrientes	Resultado Médio (g em 100g de mel)	Faixa de variação(g/100g)
Água	17,1	(12,2 – 22,9)
Carboidratos Totais	82,4	
Frutose	38,5	(25,2 – 4,4)
Glicose	31,0	(24,6 – 36,9)
Sacarose	10	(1,0 – 10,0)
Maltose	7,2	(1,7 – 11,8)
Oligossacarídeos	1,5	(0,1 – 8,5)
Proteínas, Aminoácidos, Vitaminas e Minerais.	0,5	-

Fonte: Crane, 1975 e 1990; White, 1978; Estupiñán et al., 1998; Apama e Rajalakshmi, 1999.



## Tudo para laboratórios em um só lugar

A Expolabor é uma entidade que reúne as melhores empresas do mercado brasileiro de produtos para laboratórios, e tem como objetivo auxiliar os profissionais de pesquisa, indústria, ensino e saúde, no que diz respeito à área de laboratório, desde o projeto civil até a especificação e definição de equipamentos e suprimentos.

Fundada em 1980, a Expolabor tem sido conhecida pela variedade de informações que fornece aos clientes, além de oferecer a possibilidade de viabilização de seu projeto, por encontrar tudo o que precisa em um só lugar.

A Expolabor ministra uma extensa programação de Seminários Técnicos durante todo o ano, abordando os mais variados temas ligados a laboratórios.

Visite nosso portal, conheça as empresas associadas e informe-se sobre os Seminários Técnicos, além de descobrir os mais recentes lançamentos do mercado.

**EXPOLABOR**



Rodovia Regis Bittencourt, 3.370 • Taboão da Serra • SP • 06793-000  
Tel.: 11 4787.8973 • Fax: 11 4787.3399

[www.expolabor.com.br](http://www.expolabor.com.br)



crescimento microbiano (CHIRIFE *et al.*, 1983). Porém, a ação antimicrobiana não é diminuída com a diluição do mel. (CAMARGO *et al.*, 2003).

A mistura de açúcares do mel é composta principalmente por frutose e glicose que, juntas, representam 85% a 95% do conteúdo total de carboidratos. A frutose apresenta-se normalmente em maior quantidade que a glicose, havendo uma proporção média entre elas de 1,2:1. Além desses carboidratos, a sacarose, os dissacarídeos redutores e os oligossacarídeos maiores representam 1,5%, 6,5% e 1,5%, respectivamente. (CRANE, 1975).

A alta concentração de diferentes tipos de açúcar é responsável pelas diversas propriedades físicas do mel, tais como: viscosidade, densidade, higroscopicidade, capacidade de granulação (cristalização) e valores calóricos (CAMPOS, 1987).

A água presente no mel apresenta forte interação com as moléculas dos açúcares, deixando poucas moléculas de água disponíveis para os microorganismos (VERÍSSIMO, 1987).

Além de açúcares, o mel contém também uma quantidade de água que varia entre 13% a 25% de acordo com a origem da qual ele provém. A quantidade de água presente é decisiva para a sua conservação e intervém também na coloração, viscosidade, palatibilidade, sabor, peso específico, solubilidade e valor comercial. (CRANE, 1975 e 1990; WHITE, 1978; ESTUPIÑÁN *et al.*, 1998; APARNA & RAJALAKSHMI, 1999).

Um alto teor de umidade no mel favorece a fermentação. A fermentação é causada pela ação de leveduras tolerantes a açúcares com atuação sobre a glicose e a frutose, resultando na formação de álcool etílico e dióxido de carbono. O álcool em presença de oxigênio pode ser quebrado em ácido acético e água. Como resultado, o mel fermentado apresenta sabor azedo (CRANE, 1975 e 1990).

Outros fatores associados ao processo de fermentação estão relacionados com a má assepsia durante a extração, manipulação, envase e acondicionamento em local não-apropriado (FARIA, 1983).

Em concentrações bem menores, encontram-se as proteínas ocorrendo apenas em traços. A proteína do mel tem duas origens, vegetal e animal. (CAMARGO *et al.*, 2003).

Sua origem vegetal advém do néctar e do pólen; já sua origem animal é proveniente da própria abelha (WHITE & RUDY, 1978). No segundo caso, trata-se de constituintes das secreções das glândulas salivares, juntamente com produtos recolhidos no decurso da colheita do néctar ou da maturação do mel (CAMPOS, 1987).

As enzimas comumente encontradas nos méis são  $\alpha$ -glicosidase (invertase),  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase (diastase), glicose-oxidase e, em menores concentrações, a catalase e a fosfatase (BARHATE *et al.*, 2003; VORLOVA & CELECHOVSKA, 2002). As enzimas são muito importantes no processo de maturação do mel, principalmente quando realizada pela ação

da invertase, produzida nas glândulas hipofaríngeas das abelhas (MORAES & TEIXEIRA, 1998).

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

A enzima invertase irá permanecer no mel conservando sua atividade por algum tempo, a menos que seja inativada pelo aquecimento; mesmo assim, o conteúdo da sacarose do mel nunca chega a zero. Essa inversão de sacarose em glicose e frutose produz uma solução mais concentrada de açúcares, aumentando a resistência desse material à deterioração por fermentação e promovendo assim o armazenamento de um alimento altamente energético em um espaço mínimo. (CAMARGO *et al.*, 2003).

A diastase apresenta alto grau de instabilidade em frente às temperaturas elevadas, sua presença ou não se faz importante na tentativa de detectar possíveis aquecimentos do mel comercialmente vendido, apesar de que também em temperaturas ambientes ela pode vir a deteriorar-se quando o armazenamento for prolongado. (CAMARGO *et al.*, 2003).

A catalase e a fosfatase são enzimas que facilitam a associação açúcar-álcool, sendo um dos fatores que auxiliam na desintoxicação alcoólica pelo mel (SERRANO *et al.*, 1994). Entretanto, segundo Weston (2000), a catalase presente no mel se origina do pólen da flor e sua quantidade no mel depende da fonte floral e da quantidade de pólen coletado pelas abelhas.

A glicose-oxidase, que em soluções diluídas é mais ativa (WHITE, 1975), reage com a glicose formando ácido glucônico (principal composto ácido do mel) e peróxido de hidrogênio, esse último capaz de proteger o mel contra a decomposição bacteriana até que seu conteúdo de açúcares esteja alto o suficiente para fazê-lo (MENDES & COELHO, 1983).

A principal substância antibacteriana do mel é o peróxido de hidrogênio, cuja quantidade presente no mel é dependente tanto dos níveis de glicose-oxidase, quanto de catalase, uma vez que a catalase destrói o peróxido de hidrogênio (WHITE *et al.*, 1963; WESTON *et al.*, 2000).

Peróxido de hidrogênio é um agente antimicrobiano muito conhecido, inicialmente aclamado por suas propriedades bactericidas e desinfetantes quando foi utilizado pela primeira vez em atividades clínicas (TURNER, 1983). A concentração de peróxido de hidrogênio produzida no mel ativada pela diluição é geralmente em torno de 1 mmol/l. (MOLAN, 1992).

Apesar da concentração de peróxido de hidrogênio no mel ser muito baixa ele é ainda eficaz como um agente antimicrobia-

no. Foi comprovado que hidrogênio de peróxido é mais eficaz quando produzido pelo ciclo contínuo através da glicose oxidase do que quando adicionado separadamente (PRUITT, 1985).

O mel contém ácidos (o pH médio é cerca de 3,9 e varia entre 3,1 a 4,5) que contribuem para a sua resistência a danos causados por microorganismos. A acidez que estes ácidos produzem também realça o seu sabor. O mel contém muito mais ácido glicônico do que qualquer outro ácido; ele é produzido pela ação, sobre a glicose, da enzima glicose-oxidase, proveniente das glândulas hipofaríngeas das abelhas e está em equilíbrio com a glicolactona. Este tipo de equilíbrio caracteriza a acidez lactônica (CRANE, 1975 e 1990; WHITE, 1978).

Em menor quantidade, pode-se encontrar outros ácidos como: acético, butírico, láctico, oxálico, fórmico, málico, succínico, pirúvico, glicólico, cítrico, butiricolático, tartárico, maléico, piroglutâmico, alfa-cetoglutárico, 2- ou 3-fosfoglicérico, alfa- ou beta-glicerofosfato e vínico (WHITE, 1975; MENDES & COELHO, 1983).

Conforme a Tabela 3, a inibição bacteriana está relacionada significativamente com a acidez livre e total, mas não com o pH do mel. Como os ácidos são originários da abelha, estes resultados podem ser interpretados como se uma parte da atividade antimicrobiana tem origem na abelha (BOGDANOV, 1997).

**Tabela 3.** Quantidades médias (%) de constituintes importantes do mel

Parâmetros	pH vs. inibição	Acidez livre vs. Inibição	Acidez total vs. Inibição
r	0,06	0,35	0,31
P	0,58	0,001	0,005

r – coeficiente de relação

P – probabilidade

Parâmetros foram calculados para n = 82 méis de diferentes origens.

Fonte: BOGDANOV, 1997.

Uma série de minerais está presente no mel (WHITE, 1975) em pequenas quantidades são: cálcio, magnésio, ferro, cobre, cádmio e zinco, nas formas de sulfato e cloreto (AZEREDO *et al.*, 1998).

Embora em concentrações ínfimas, vitaminas, tais como: B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, C e D também são encontradas no mel, sendo facilmente assimiláveis pela associação a outras substâncias como o hidrato de carbono, sais minerais, oligoelementos, ácidos orgânicos e outros. (CAMARGO *et al.*, 2003).

Os componentes menores do mel, como os materiais “flavorizantes” (aldeídos e álcoois), pigmentos, ácidos e minerais, influenciam consideravelmente nas diferenças entre tipos de mel. Sabatier *et al.* (1992) detectaram alguns flavonóides presentes no mel de girassol (conhecidamente rico em flavonóides). Em maiores concentrações, foram encontrados os seguintes flavonóides: pinocebrina (5,7-dihidroxi-flavona), pinobanksina (3,5,7-trihidroxi-flavonona), crisina (5,7-dihidroxi-flavona), galangina (3,5,7-trihidroxi-flavona) e quercetina (3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavona). Em menores concentrações: tectocrisina (5-hidroxi-7metoxiflavona) e quenferol (3,5,7,4'-tetrahidroxi-flavona).

Os flavonóides são estruturas polifenólicas de baixo peso molecular encontradas naturalmente nas plantas. Esses metabólitos secundários são de grande importância na manutenção da saúde de muitos animais herbívoros, incluindo o homem. (KANASHIRO, 2001)

Ferreres *et al.*, (1991) e Amiot *et al.* (1989), mostraram claramente a presença de flavonóides em mel. Entre os flavonóides presentes no mel, a flavanona pinocebrina tem sido relatada e estudada por sua atividade antibacteriana (BERAHIA *et al.*, 1993). Outros estudos também demonstraram a presença dos flavonóides pinobanksina (RIBEIRO-CAMPOS *et al.*, 1990), galangina e crisina (SABATIER *et al.*, 1992), kanferol (FERRERES *et al.*, 1998) e ácido benzóico e cinâmico (WESTON *et al.*, 1999). De acordo com Martos *et al.* (2000a) e Tomás-Barberán *et al.* (2001), as análises de flavonóides e outros compostos fenólicos podem ser utilizadas para a determinação da origem botânica e autenticidade de cada tipo de mel.

De qualquer modo, e diferentemente da própolis, os compostos fenólicos presentes no mel podem ser originados do néctar das flores, da própolis (TOMÁS-BARBERÁN *et al.*, 1993) e pólen (FERRERES *et al.*, 1993).

A atividade antimicrobiana não proveniente do peróxido comum do mel de manuka (atividade próxima da média) foi analisada contra sete espécies de bactérias e comparada com um mel normal (atividade próxima da média) com atividade de peróxido de hidrogênio. A MIC (concentração inibitória mínima) dos méis foi determinada dentre a faixa de 1,8% a 10,8% (v/v), indicando que os méis tinham potencial bacteriano suficiente para parar o crescimento bacteriano se diluído no mínimo nove vezes, e até 56 vezes na presença de *Staphylococcus aureus* (WILLIX *et al.*, 1992), o patógeno mais comum em feridas. Em outro estudo com 58 cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* (COOPER *et al.*, 1999) a MIC variou de 2% a 4% (v/v). Em um estudo com 20 cepas de *Pseudomonas* de feridas infectadas (COOPER & MOLAN, 1999) a MIC destes dois méis foi determinada variando de 5,5% a 9,0%.

A atividade antimicrobiana não proveniente do peróxido comum do mel de manuka (atividade próxima da média) foi analisada contra sete espécies de bactérias e comparada com um mel normal (atividade próxima da média) com atividade de peróxido de hidrogênio. A MIC (concentração inibitória mínima) dos méis foi determinada dentre a faixa de 1,8% a 10,8% (v/v), indicando que os méis tinham potencial bacteriano suficiente para parar o crescimento bacteriano se diluído no mínimo nove vezes, e até 56 vezes na presença de *Staphylococcus aureus* (WILLIX *et al.*, 1992), o patógeno mais comum em feridas. Em outro estudo com 58 cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* (COOPER *et al.*, 1999) a MIC variou de 2% a 4% (v/v). Em um estudo com 20 cepas de *Pseudomonas* de feridas infectadas (COOPER & MOLAN, 1999) a MIC destes dois méis foi determinada variando de 5,5% a 9,0%.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de Microbiologia, pertencente à Faculdade de Tecnologia Termomecânica.

As análises foram realizadas com leite fermentado desnatado adoçado sabor morango, servindo como fonte microbiana (*Lactobacillus* spp).

Na primeira análise, adicionou-se mel nas seguintes concentrações (0%, 2,5%, 5,0% e 7,5%). A amostra foi armazenada

da na geladeira à 10°C por 48 horas para que os compostos antimicrobianos do mel pudessem agir sobre os microorganismos do leite fermentado.

A seguir, foi diluída em solução salina 0,85% seis vezes na proporção 1:10 até 1:1000000. Inoculou-se 0,1ml de cada amostra diluída em placas de Petri com os meios “Plate Count Agar” (PCA) e “Potato Dextrose Agar” (PDA) em duplicata. As placas com meio PCA foram armazenadas na estufa a 32°C por 24-48 horas. Tal temperatura deve-se ao fato do crescimento ótimo das bactérias mesófilas ocorrer entre 28-37°C. Já as placas que continham meio PDA foram armazenadas a temperatura ambiente por cinco dias (TRABULSI *et al.*, 2002).

Na segunda e terceira análises, as amostras inoculadas possuíam as seguintes concentrações de mel: 0%, 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, para a determinação da faixa ideal de concentração, sendo o procedimento igual ao da primeira análise, exceto o plaqueamento em meio PDA, que não foi realizado devido aos resultados obtidos na primeira análise.

Utilizando a técnica de RIBEIRO & SOARES (2002) nas placas de PCA, após o crescimento, realizou-se a coloração de Gram para verificar o Gram das bactérias crescidas.

## RESULTADOS

### Parâmetros de concentração de mel inibitória

Os resultados da primeira análise, que foram usadas as seguintes concentrações de mel 0%, 2,5%, 5,0% e 7,5%, serviram como parâmetro de concentrações inibitórias, visto que segundo WILLIX *et al.* (1992) esta concentração se encontrava em torno de 1,8 a 10,8%.

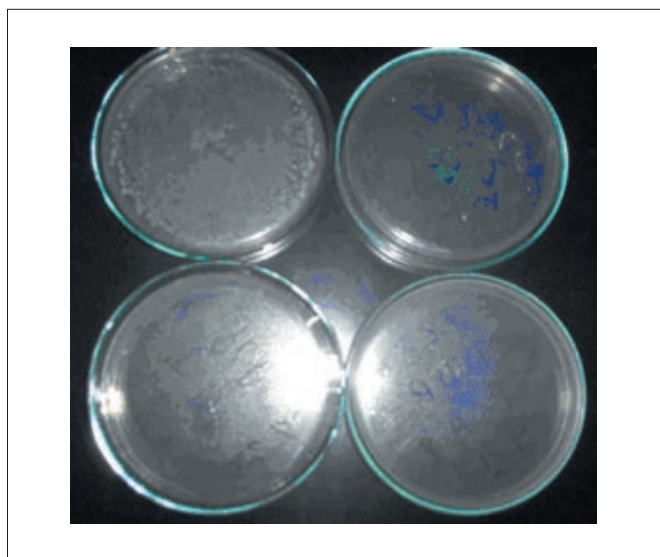


Figura 2. Parte Superior, da esquerda para direita: 0% e 2,5% de mel adicionado. Parte inferior, da esquerda para direita: 5% e 7,5%

Depois da incubação, as placas mostraram uma nítida diminuição da quantidade de colônias de microorganismos, assim que a porcentagem de mel aumentava, sendo que na de 5% houve a redução máxima de microorganismos, resultado tal que se repetiu na placa de 7,5% (Figuras 2 e 3).

### Concentração inibitória de mel em fungos

Quanto às placas de PDA, ocorreu um vasto crescimento de bolores e leveduras em todas as placas de Petri acrescidas de mel, mostrando que o mel não possuiu ação inibitória sobre os fungos desenvolvidos, mesmo quando em diferentes concentrações, conforme pode ser observado na Figura 4. Podemos destacar também que a medida que a concentração aumentava, havia também uma multiplicação microbia-

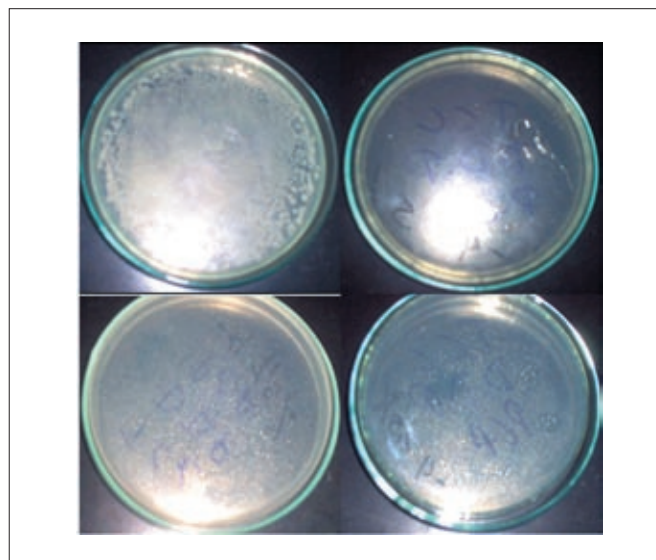


Figura 3. Ampliações das concentrações da 1ª análise (0%, 2,5%, 5%, 7,5%).

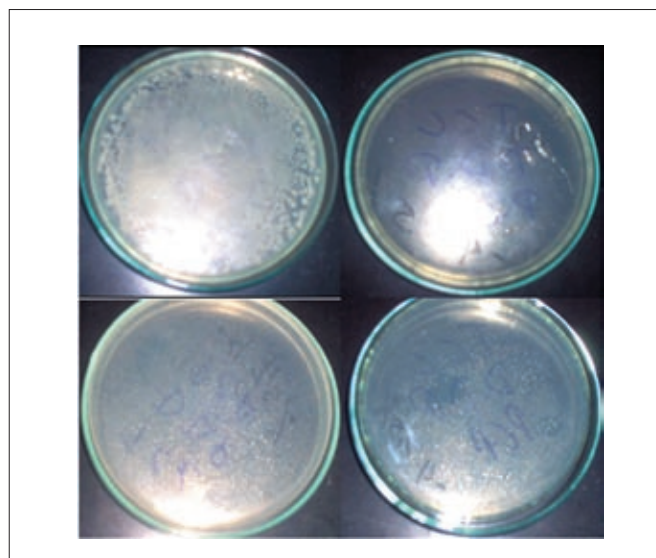


Figura 4. Desenvolvimento de leveduras e bolores

**Tabela 4.** Contagem de microorganismos mesófilos e taxa de redução microbiana

Concentração	Média de Contagem (UFC/ml)	Δredução (%) em relação à concentração anterior	Δredução (%) em relação à concentração inicial
0,0%	288000	0,00	0,00
0,5%	158000	54,86	45,14
1,0%	66000	41,77	77,08
1,5-2,5%	25000	37,88	91,32

na nas placas de Petri com meio PDA. Segundo MUNDO *et al.* (2004), o mel pode inibir o crescimento de alguns fungos dentre eles: *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium expansum*, isto significa que o alimento estudado não possuía tal microbiota mencionada pelo autor.

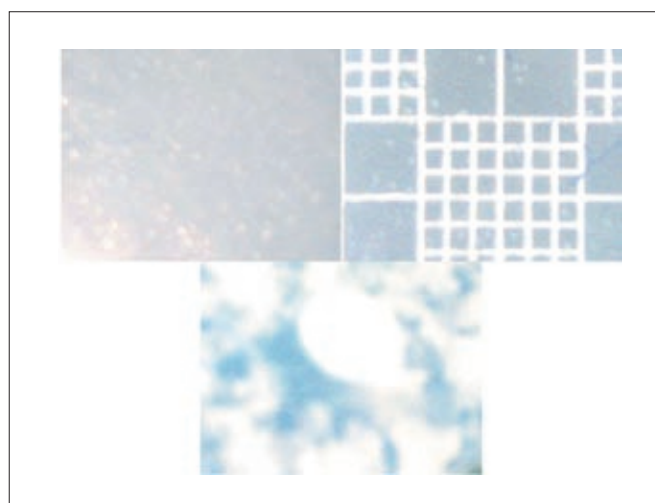
#### Definição da con ação inibitória

As segunda e terceira análises demonstraram que a faixa de concentração ideal de mel encontrava-se entre 1,5-2,5% conforme a contagem de microorganismos mesófilos em placas (Tabela 4 e Figura 5) pelo método de diluição (NEDER, 1992):

Verificamos pelos resultados acima, que a redução de carga microbiana para cada uma das concentrações é razoável, podendo, quando tomamos como base a concentração inicial, chegar a um valor próximo de 91% de redução de bactérias mesófilas.

A coloração de Gram realizada nas placas em que houve o crescimento de microorganismos, acima mencionadas, mostrou a existência tanto de cepas gram positivas e negativas, porém, com a redução da presença de bastonetes à medida que a concentração de mel aumentava. Isto confirma a redução dos lactobacilos existentes no produto analisado, já que, segundo Hammes & Vogel (1995), as bactérias do gênero *Lactobacillus* são geralmente identificadas como bastonetes Gram-positivos, microaerófilas, não esporuladas e sem flagelos. A Figura 6 mostra tal redução, que pode ser obser-

vada pelo aumento da vermelhidão das colorações. Deve-se ressaltar que a coloração foi feita com o conteúdo integral das placas de Petri, podendo assim, retirar uma conclusão do total e não do parcial, que no caso poderia gerar um erro, pois apesar de realizar o experimento em duplicata, as placas poderiam, mesmo que mínimo, ter diferenças de crescimento microbiano (em relação à quantidade e tipo de cepa).



**Figura 5.** Microorganismos mesófilos obtidos por plaqueamento (Visualização com progressão de aumento da zona de contagem)

**Tabela 5.** Atividade do peróxido de hidrogênio sobre microorganismos

Microrganismo	Grau de atividade
Bactérias	
Gram +	+++
Gram -	++-
Fungos e leveduras	++-
Vírus	++-
Esporos bacterianos	+++

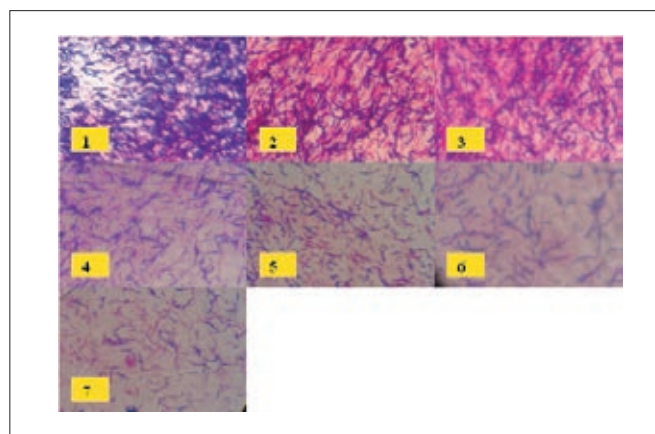
+++ Eficaz

++ Moderadamente Eficaz

+ Baixa eficácia

- Ineficaz

Fontes: ANDRADE; MACEDO, 1996.



**Figura 6.** Coloração de Gram das placas de Petri. 1 - adição de 0% de mel, 2 - adição de 0,5% de mel, 3 - adição de 1,0% de mel, 4 - adição de 1,5% de mel, 5 - adição de 2,0% de mel, 6 - adição de 2,5% de mel, 7 - adição de 3,0% de mel

O fato de a inibição ocorrer em bactérias do tipo Gram positivas, em maior concentração, pode ser explicado pela ação do peróxido de hidrogênio existente no mel. A inibição da microbiota procede mais por este mecanismo do que pela acidez e alta concentração de açúcares, já que os microorganismos toleram estes teores. Apesar da concentração de peróxido de hidrogênio no mel ser muito baixa ele é ainda eficaz como um agente antimicrobiano. (PRUITT, 1985).

O peróxido de hidrogênio é um forte oxidante devido a liberação do oxigênio, sendo há décadas usado como agente bactericida e esporicida. Em concentrações mais baixas, o peróxido de hidrogênio atua sobre células vegetativas por meio

de um processo de oxidação energética dos componentes celulares. A Tabela 5 mostra a atividade do peróxido de hidrogênio sobre microrganismos. O peróxido de hidrogênio é mais eficiente em condições mais ácidas, como pH em torno de 4, próximo ao pH do produto analisado.

## CONCLUSÃO

As análises realizadas mostram que o mel acusou ótimo efeito inibidor sobre os microorganismos do leite fermentado, na concentração de 1,5% e 2,5%, e esta inibição se deu melhor em bactérias Gram positivas.

## Referências

- ADCOCK, D. *The effect of catalase on the inhibine and peroxide values of various honeys.* **Journal of Apicultural Research**, v.1, p.38-40, 1962.
- ALLEN, K. L.; MOLAN, P. C.; REID, G. M. *The variability of the antibacterial activity of honey.* **Apiacta**, v.26, p.14-21, 1991(a).
- AMIOT, M.J.; AUBERT, S.; GONNET, M.; TACCHINI, M. *Les composés phénoliques des miels: étude préliminaire sur l'identification et la quantification par familles.* **Apidologie**, v.20, p.115-125, 1989.
- ANDRADE, N.J. & MACÊDO, J.A.B. **Higienização na indústria de alimentos.** São Paulo: Varela, 1966.
- APARNA, A.R. & RAJALAKSHMI, D. *Honey – its characteristics, sensory aspects, and applications.* **Food Rev. Int.** v.15, n.4, p.455-471, 1999.
- AZEREDO, M.A.A.; AZEREDO, L.C.; SOARES, J.C.A. *Determinação de potássio em méis após precipitação com tetrafenilborato de sódio e separação em coluna de troca iônica.* **Quim. Nova**, São Paulo, v.21, n.5, p.251-254, 1998.
- AZEVEDO, P.R.A.; MORAIS, M.V.T. *Os leites fermentados e a importância de seus microorganismos.* **Leites e derivados**, n°79, p. 36-41, 2004.
- BARHATE, R.S.; SUBRAMANIAN, R.; NANDINI, K.E.; HEBBER, H.U. *Processing of honey using polymeric microfiltration and ultrafiltration membranes.* **J. Food Eng.**, Oxford, v.60, n.1, p.1-6, 2003.
- BERAHIA, T.; CERRATI, C.; SABATIER, S.; AMIOT, M.J. *Gas chromatography-mass spectrometry analysis of flavonoids in honey.* **Sciences Des Aliments**, v.13, n.1, p.15-24, 1993.
- BERGMAN, A.; YANAI, J.; WEISS, J.; BELL, D.; DAVID, M. P. *Acceleration of wound healing by topical application of honey.* **American Journal of Surgery**, v.145, p. 374-6, 1983.
- BOGDANOV, S. *Characterisation of antibacterial substances in honey.* **Lebensmittel-Wissenschaft und – Technologie**, v.17;p.74-76, 1984.
- BOGDANOV, S. *Determination of pinocembrin in honey using HPLC.* **Journal of Apicultural Research**, v.28, p.55-57, 1989.
- BOGDANOV, S. *Antibacterial substances in honey.* Net. Bern, Switzerland: 1997. Disponível em: [http://www.apis.admin.ch/en/bienenprodukte/docs/honig/antibacterial\\_e.pdf](http://www.apis.admin.ch/en/bienenprodukte/docs/honig/antibacterial_e.pdf)>. Acesso em 15.10.2005.
- Brasil Ministério da Agricultura e do Abastecimento Instrução Normativa n.11, de 20 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.204, 23 out 2000. Seção I, p.16.
- CAMARGO, R.C.R.; LOPES, M.T.R.; PEREIRA, F.M.; VILELA, S.L.O. *Produção de Mel.* Net. Piauí: julho de 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/index.htm>>. Acesso em 05.09.2005.
- CAMPOS, R. G. M. *Contribuição para o estudo do mel, pólen, geléia real e própolis.* **Boletim da Faculdade de Farmacia de Coimbra**, vol.11, n.2, p.17-47, 1987.
- CHIRIFE, J.; HERSZAGE, L.; JOSEPH, A.; KOHN, E.S. *In vitro study of bacterial growth inhibition in concentrated sugar solutions: microbiological basis for the use of sugar in the treatment of infected wound.* **Antim. Agents Chemoth**, v.23, p.766-773, 1983.
- COOPER, R.A. & MOLAN, P.C. *The use of honey as an antiseptic in managing Pseudomonas infection.* **J. Wound Care**, 8(4), p. 161-164, 1999
- COOPER, R.A.; MOLAN, P.C.; HARDING, K.G. *Antibacterial activity of honey against strains of Staphylococcus aureus from infected wounds.* **J R Soc Med**, 92 (6): p. 238-245, 1999
- CORTOPASSI-LAURINO, M. & GELLY, D. S. *Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action antibactérienne des miels d'abelles africanisées Apis mellifera et de Méliponinés du Brésil.* **Apidology**, v.22, p. 61-73, 1991.
- CRANE, E. *Honey: A Comprehensive Survey.* 1ª. ed. Londres: Heinemann,p.608, 1975
- CRANE, E. *O livro do mel.* 2ª.ed. São Paulo: Nobel, p.226, 1987.
- CRANE, E. *Bees and Beeking: Sciences Practice and World Resources.* 1ª. ed. Nova Iorque: Cornell University Press,p.720, 1990
- DUSTMAN, J. H. *Antibacterial effect of honey.* **Apiacta**, 14(1), p. 7-11, 1979
- EFEM, S. E. E. *Clinical observations on the wound healing properties of honey.* **British Journal Surgery**, v.75, p. 679-81, 1988.
- EFEM, S. E. E.; UDOH, K. T.; IWARA, C. I. *The antimicrobial spectrum of honey and its clinical significance.* **Infection**, v. 20, n° 4, p. 227-9, 1992.
- ESTUPIÑÁN, S.; SANJUÁN, E.; MILLÁN, R.; GONZÁLEZ-CORTÉS, A. *Parametros de calidad de la miele.* Composición química. Revisión. **Alimentaria**,p.117-122, 1998.
- FARIA, J. A. F. *Embalagens e conservação de mel de abelhas.* **Informe Agropecuário**, v.9, n.106, p. 61-6, 1983.
- FELSNER, M.L. *Caracterização de méis monoflorais de eucalipto e de laranja do Estado de São Paulo por técnicas termoanalíticas.* Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, 2001.
- FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERAN, F.A.; GIL, M.I.; TOMÁS-LORENTE, F. *An HPLC technique for flavonoid analysis in honey.* **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.56,n.1.p.49-56,1991.

## Referências

31. FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; TOMÁS-LORENTE, F.; TOMÁS-BARBERAN, F. A. *Hesperetin: a marker of the floral origin of citrus honey*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.61, n.1, p.121-123, 1993.
32. FERRERES, F.; JUAN, T.P.; PEREZ-ARQUILLUE, C.; HERRERA-MARTEACHE, A.; GARCIA-VIGUERA, C.; TOMAS-BARBERAN, F.A. *Evaluation of pollen as a source of Kaempferol in rosemary honey*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.77, n.4, p.506-510, 1998.
33. FRAZIER, W.C., WESTHOFF, D.C. *Microbiología de los alimentos*, 4ª edición. Editorial Acxribia S.A., 1993, 681p.
34. GUPTA, S. K.; SINGH, H.; VARSHNEY, A. C.; PRAKASH, P.; SINGH, S. P. *Biochemical alterations during wound healing under influence of natural honey and ampicillin in buffaloes*. **Indian Veterinary Journal**, v. 70, p.45-7, 1993.
35. HAMMES, W.P. & VOGEL, R.F. *The genera of acid lactic bacteria*. London: Blackie Academic, p.54, 1995.
36. HOVE, H.; NORGAARD, H.; MORTENSEN, P.B. *Lactic acid bacterial and the human gastrointestinal tract*. **European Journal of Clinical Nutrition**, n.53, p.339-350, 1999.
37. KANASHIRO, A. *Efeito dos flavonóides no processo de produção de radicais de oxigênio por neutrófilos estimulado*, 2001. **Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo – USP, FCFRP, Ribeirão Preto, 2001.**
38. KOMATSU, S.S.; MARCHINI, L.C.; MORETI, A.C.C.C. *Análises físico-químicas de amostras de méis de flores silvestres, de eucalipto e de laranjeira, produzidos por Amis mellífera L., 1758 (HYMENOPTERA, APIDAE) no Estado de São Paulo. 2. Conteúdo de açúcares e de proteínas*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.22, n.2, p.143-146, 2002.
39. MARTOS, I.; FERRERES, F.; YAO, L. H.; D'ARCY, B.; CAFFIN, N.; TOMAS-BARBERAN, F. A. *Flavonoids in monospecific Eucalyptus honeys from Australia*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.10, p. 4744-4748, 2000a.
40. MENDES, B. A. & COELHO, E. M. *Considerações sobre características de mel de abelhas – Análises e critérios de inspeção*. **Informe Agropecuario**, v.9, n.106, p. 56-67, 1983.
41. MOLAN, P. C. & RUSSELL, K. M. *Non-peroxide antibacterial activity in some New Zealand honeys*. **Journal of Apicultural Research**, v.27, n.1, p. 62-7, 1988.
42. MOLAN, P. C. *The antibacterial activity of honey. The nature of the antibacterial activity*. **Bee World**, 73(1): p.5-28, 1992.
43. MORAES, R.M. & TEIXEIRA, E.W. **Análise de mel**. Pindamonhangaba: Centro de Apicultura Tropical, Secretaria de Agricultura, 1998. 41p.
44. MUNDO, M.A.; PADILLA-ZAKOUR, O.I.; WOROBO, R.W. *Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys*. **International Journal of Food Microbiology**, 2004; in press (Partially funded by the National Honey Board).
45. NEDER, R.N. *Microbiologia – Manual de Laboratório – São Paulo: Nobel, 1992*
46. PARK, Y. K. ; ALENCAR, S. M. ; AGUIAR, C. L. . *Estudo da composição fenólica de méis e própolis oriundos de mesma colmeia*. **Revista Mensagem Doce**, São Paulo - SP, p. 1 – 11, 2003.
47. PRUITT, K.M., Reiter B. *Biochemistry of peroxidase system: antimicrobial effects*. In: Pruitt, K.M., TENOVUO, J.O. editors. *The Lactoperoxidase System: Chemistry and Biological Significance*. New York: Marcel Dekker, p.144-78, 1985
48. RIBEIRO, M.C. & SOARES, M.M.S.R. *Microbiologia Prática – Roteiro e Manual – São Paulo: Editora Atheneu, 2002. p.5-6.*
49. RIBEIRO-CAMPOS, M.G.; SABATIER, S.; AMIOT, M.J.; AUBERT, S. *Characterization of flavonoids in three hiveproducts: bee pollen, própolis and honey*. **Planta Médica**, v.56, p. 580-581, 1990.
50. SABATIER, S. AMIOT, M.J. TACCHINI, M.; AUBERT, S. *Identification of flavonoids in sunflower honey*. **J. Food Sci. off. Publ. Inst. Food. Technol. Chicago. ILL. The Institute. 57: 773-4, 1992.**
51. SERRANO, R. B.; VILLANUEVA, M. T. O.; MARQUINA, A. D. *La miel. Edulcorante natural por excelência*. **Alimentaria**, n. 253, p.25-35, 1994.
52. STONOGA, V.I. & FREITAS, R.J.S.D. *Conteúdo de água e açúcares em mel de abelhas*. **Bd. Ceppa**, Curitiba, v.9, n.1, p.9-16, 1991.
53. TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; GARCÍA-VIGUERA, C.; VIT-OLIVIER, P.; FERRERES, F.; TOMÁS-LORENTE, F. *Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical propolis from Venezuela*. **Phytochemistry**, v.34, n.1, p.191-196, 1993.
54. TOMAS-BARBERAN, F. A.; MARTOS, I.; FERRERES, F.; RADOVIC, B. S.; ANKLAM, E. *HPLC flavonoid profiles as markers for the botanical origin of European unifloral honeys*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.81, n.5, p.485-496, 2001.
55. TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPertz, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. *Microbiologia – 3a ed. São Paulo: Atheneu, 2002.*
56. TURNER, F.J. *Hydrogen peroxide and Other Disinfectants – 3rd ed.* Philadelphia: Lea and Febiger, 1983.
57. VERISSIMO, M.T.L. *Porque o mel cristaliza*. **Apicultura no Brasil**, v.3, n.18, p.14, 1987.
58. VORLOVA, L. & CELECHOVSKA, O. *Activity of enzymes and trace element content in bee honey*. **Acta vet. Brno.**, Czech Republic, v.71, p.375-378, 2002.
59. WAHDAN HAL. *Causes of the antimicrobial activity of honey*. **Infection**, 26:26, 1998
60. WESTON, R.J.; MITCHELL, K.R.; ALLEN, K.L. *Antibacterial phenolic components of New Zealand manuka honey*. **Food Chemistry**, v.64, n.3, p.295-301, 1999.
61. WESTON, R. J.; BROCKLEBANK, K. L.; LU, Y. *Identification and quantitative levels of antibacterial components of some New Zealand honeys*. **Food Chemistry (70)**: p.427-35, 2000.
62. WHITE, J. W. & SUBERS, M.H. *Studies on honey inhibine. 3. Effect of heat*. **Journal of Apicultural Research**, v.2, n.2, p. 93-100, 1963.
63. WHITE, J. W. ;SUBERS, M.H.;SHEPARTZ, A.I. *The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose oxidase system*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.73, p. 57-70, 1963.
64. WHITE, J.W. *Physical characteristics of honey*. In: CRANE, E. *Honey a comprehensive survey*. London: Heinemann, 1975. Cap.6, p.207-39.
65. WHITE, J.W. & RUDY, O.N. *The protein content in honey*. **Journal of Apicultural Research**, 1784, 234-38, 1978.
66. WILLIX, D.J.; MOLAN, P.C.; HARFOOT, C.G. *A comparison of the sensitivity of wound-infecting species of bacteria to the antibacterial activity of manuka honey and the pther honey*. **J. Appl. Bacteriol.** v.73(5): p.388-94, 1992
67. YANIV, Z. & RUDICH, M. *Bee Products*. **Plenum Press**, New York. p.232, 1996