

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE**

**SUSAN CHRISTINA BRAGA DOMINGOS**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS MÉIS DE ABELHAS-SEM-FERRÃO  
DO GÊNERO *MELIPONA* DA AMAZÔNIA (APIDAE: MELIPONINA)**

**RIO BRANCO  
ACRE-BRASIL  
MARÇO-2019**

SUSAN CHRISTINA BRAGA DOMINGOS

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS MÉIS DE ABELHAS-SEM-FERÃO  
DO GÊNERO *MELIPONA* DA AMAZÔNIA (APIDAE: MELIPONINA)

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Acre, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-graduação em Sanidade e  
Produção Animal Sustentável na  
Amazônia Ocidental, para obtenção  
do título de Mestre em Ciência  
Animal.

RIO BRANCO  
ACRE-BRASIL  
MARÇO-2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

---

D671A Domingos, Susan Christina Braga, 1994-

Atividade antibacteriana dos méis de abelhas-sem-ferrão do gênero *Melipona* da Amazônia (Apidae: Meliponina) / Susan Christina Braga Domingos; orientadora: Dr<sup>a</sup>. Luciana dos Santos Medeiros e Co-orientador: Dr. Rui Carlos Peruquetti. – 2019.

36 f. : il. ; 30 cm.

Mestrado (Dissertação) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental, Rio Branco, 2019.

Inclui referências bibliográficas.

1. Mel de abelha sem ferrão. 2. *Melipona* sp. 3. Atividade antimicrobiana. I. Medeiros, Luciana dos Santos (orientadora). II. Peruquetti, Rui Carlos (Co-orientador). III. Título.

---

Bibliotecária: Nádia Batista Vieira CRB-11º/882.

CDD: 660

SUSAN CHRISTINA BRAGA DOMINGOS

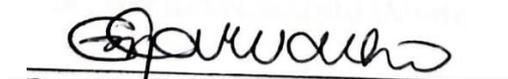
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS MÉIS DE ABELHAS-SEM-FERRÃO  
DO GÊNERO *MELIPONA* AMAZÔNIA (APIDAE: MELIPONINA)

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Acre, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-graduação em Sanidade e  
Produção Animal Sustentável na  
Amazônia Ocidental, para obtenção  
do título de Mestre em Ciência  
Animal.

APROVADA: 21 de Março de 2019.



Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Gerson Nakazato  
Universidade Estadual de Londrina  
UEL



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarice Maia Carvalho  
Universidade Federal do Acre  
UFAC



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana dos Santos Medeiros  
(Orientador)  
UFAC

À minha mãe, Maria Sílvia da Silva Braga.  
E ao meu pai, Raimundo Ronaldo Moura Domingos.

Dedico.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo presente que é a vida.

À Universidade Federal do Acre (UFAC) e ao Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental (PPGESPA) pelas oportunidades oferecidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa de estudo.

À Universidade Estadual de Londrina, em especial aos professores e pós-graduandos do setor de microbiologia pela receptividade e apoio nas análises.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana dos Santos Medeiros pelos conhecimentos transmitidos. Além de orientadora, é conselheira, parceira, paciente e generosa. A senhora me inspirou a dar meu melhor, mesmo quando achei que não pudesse.

Ao meu co-orientador, Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. Rui Carlos Peruquetti por todo auxílio com a análise dos dados, suas correções e seus conselhos.

À minha mãe, que é meu exemplo de ser humano. Por toda paciência, amor e por sempre acreditar em mim. Sinto-me sortuda em ser sua filha. Te amo.

Ao meu namorado, Lucas Barbosa, pelo seu apoio todos esses anos. Por sempre ser otimista e me incentivar nesse longo caminho. Seu amor foi fundamental para que eu pudesse seguir firme.

Ao pai, por todo apoio em minha busca por conhecimentos.

À tia, Maria Suely, por toda torcida, incentivo e por sempre acreditar que posso mais.

Às bolsistas de iniciação científica Cynthia e Tielly, que me acompanharam e ajudaram durante esses dois anos. Por todos os dias de correria, os fins de semana e feriados de muito trabalho. Sou grata, pois ganhei duas amigas queridas.

Às minhas amigas, Mayara e Mirlane, por todos esses anos de amizade, companheirismo, incentivo e por nossos momentos de diversão, agora menos frequentes, mas com a mesma sintonia.

À toda equipe do LabMivet, todos que de alguma forma me ajudaram durante o período de experimento.

À Cildomar Correa, por ter coletado e cedido as amostras de mel.

## RESUMO

DOMINGOS, Susan Christina Braga. Universidade Federal do Acre, março de 2019. **Atividade antibacteriana dos méis de abelhas-sem-ferrão do gênero *Melipona* da Amazônia (APIDAE: MELIPONINA)**. Orientador (a): Luciana dos Santos Medeiros, Co-orientador: Rui Carlos Peruquetti. O mel de abelhas-sem-ferrão possui grande potencial terapêutico, especialmente devido sua atividade antimicrobiana. O objetivo do presente estudo foi elucidar o potencial antibacteriano *in vitro* do mel de quatro espécies de gênero *Melipona* com ocorrência na Amazônia. Em Rio Branco, foram coletas amostradas das espécies *Melipona eburnea* (ME), *M. grandis* (MG) e *M. seminigra* (MS); em Xapuri, de *M. flavolineata* (MF). Nos testes de susceptibilidade a antimicrobianos foram utilizadas estirpes-padrão de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e duas estirpes isoladas de mastite subclínica bovina. No teste de difusão em ágar, foi observado que os quatro méis apresentaram atividade antibacteriana contra estirpes-padrão de *S. aureus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae* e isolados clínicos de mastite. Na Concentração Inibitória Mínima (CIM), os méis MF e MG promoveram inibição em concentrações inferiores a 3,12% (v/v). Os valores de Concentração Bactericida Mínima (CBM) foram maiores que a CIM para maioria dos microrganismos testados. Entretanto, o mel MF apresentou CIM e CBM de 6,25% para a estirpe *S. aureus*. No *time kill*, houve uma diminuição da viabilidade bacteriana de *S. aureus* de até  $2 \log^{10}$  após 6 horas de tratamento com o mel MF. O mel MF promoveu alterações na membrana de *S. aureus* observadas na microscopia eletrônica de varredura. Os resultados obtidos nos ensaios de atividade antibacteriana comprovam a ação dos méis de abelhas-sem-ferrão do gênero *Melipona* contra bactérias patogênicas de animais e humanos. O mel MF além de diminuir o crescimento de *S. aureus*, promove alterações celulares que culminam em morte bacteriana.

**Palavras-chaves:** Mel de abelha sem ferrão, *Melipona* sp., Atividade antimicrobiana, Amazônia Ocidental.

## ABSTRACT

DOMINGOS, Susan Christina Braga. Universidade Federal do Acre, march 2019. **Antibacterial activity of stingless bee honey of the *Melipona* genus of Amazon (APIDAE: MELIPONINA)**. Advisor: Luciana dos Santos Medeiros, Co-advisor: Rui Carlos Peruquetti. The stingless bee honey has great therapeutic potential, especially by antimicrobial activity. In this study, we elucidate the in vitro antibacterial potential of honey from four species of *Melipona* genus with occurrence in the Amazon. In Rio Branco, samples were collected from the species *Melipona eburnea* (ME), *M. grandis* (MG) and *M. seminigra* (MS); in Xapuri, from *M. flavolineata* (MF). For the antimicrobial susceptibility testes standard strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria and two strains isolated from bovine subclinical mastitis were used. In the agar diffusion test, it was observed that the four honeys presented antibacterial activity against standard strains of *S. aureus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae* and strain from bovine of mastitis. In the Minimal Inhibitory Concentration (MIC), MF and MG honeys promoted inhibition at concentrations lower than 3.12% (v/v). The Minimal Bactericidal Concentration (MBC) values were bigger than the MIC for most of the microorganisms tested. However, MF honey showed both MIC and MBC of 6.25% against *S. aureus*. At time kill assay, a decrease of up to  $2 \log^{10}$  against *S. aureus* was observed after 6 hours of treatment with the MF honey. The MF honey promoted changes in the *S. aureus* membrane observed in scanning electron microscopy. The results indicates that the stingless bee honey of the genus *Melipona* is effective against pathogenic bacteria isolated from animals and humans. MF honey, besides decreasing the growth of *S. aureus*, promotes cellular alterations that culminates in bacterial death.

**Keywords:** Singless bee honey, *Melipona* sp., Antimicrobial activity, Western Amazon.

## SUMÁRIO

	págs.
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Abelhas-sem-ferrão .....	3
2.2 Mel.....	4
2.2.1 Atividade antimicrobiana do mel .....	5
2.3 Ensaio antimicrobianos .....	6
2.3.1 Ensaio de Difusão em ágar .....	6
2.3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	7
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	9
3.1 Amostragem dos méis .....	9
3.2 Estirpes bacterianas .....	9
3.3 Testes de atividade antimicrobiana .....	9
3.3.1 Difusão em poço.....	10
3.3.2 Concentrações inibitória mínima e bactericida mínima .....	10
3.3.4 Ensaio <i>Time-Kill</i> .....	12
3.4 Efeito sobre a morfologia bacteriana.....	12
3.5 Análise estatística .....	13
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	14
5 CONCLUSÕES .....	22
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23

## 1 INTRODUÇÃO

O uso indiscriminado de antibióticos é uma prática comum e com graves implicações na saúde única (COETZEE et al., 2016). A falta de identificação prévia da susceptibilidade antimicrobiana, genes de resistência compartilhados entre espécies e resistência natural são alguns fatores que contribuem para a emergência de bactérias resistentes em todo o mundo (LIN, 2018).

O aumento da resistência a antimicrobianos impulsiona a busca por compostos naturais com potencial terapêutico que possam servir como adjuvantes, complementando a terapia tradicional (BOORN et al., 2010; KUMAR et al., 2018). Nesse sentido, o mel é visto como um produto promissor, pois além de ser um alimento nutritivo, possui propriedades medicinais amplamente apreciadas, incluindo atividades antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante (DUARTE et al., 2012; SILVA et al., 2013; VIT et al., 2015; RAO et al., 2016).

O grupo das abelhas-sem-ferrão possui pelo menos 522 espécies com distribuição pan-tropical (KERR et al., 1996). A característica morfológica mais marcante que as denomina é a ausência de um ferrão funcional. Os dois gêneros com maior número de espécies são *Melipona* e *Trigona*. As abelhas pertencentes ao gênero são Neotropicais e algumas espécies são boas produtoras de mel (RASMUSSEN; CAMERON, 2010; OLIVEIRA et al., 2012; VIT et al., 2013; SILVA, 2014).

O mel produzido por abelhas-sem-ferrão é armazenado em potes feitos com cerume (mistura de resina e cera) e possui maior teor de umidade do que o mel de *Apis mellifera* (ALMEIDA-MURADIAN et al., 2007). Para o mel de abelhas-sem-ferrão ainda não existe a padronização dos parâmetros físico-químicos como coloração, viscosidade, umidade e pH, que podem variar de acordo com a região, tornando-o um produto singular (LIRA et al., 2014; VIT et al., 2017).

A atividade antimicrobiana do mel das abelhas-sem-ferrão é devida principalmente ao peróxido de hidrogênio, entretanto, compostos fitoquímicos também exercem papel importante (BRUDZYNSKI et al., 2011; MANDAL; MANDAL, 2011; BUCEKOVA et al., 2014). O peróxido de hidrogênio pode atuar

como agente bactericida ou bacteriostático, isso depende de sua concentração no mel e da suscetibilidade da estirpe bacteriana ao peróxido (BRUDZYNSKI et al., 2011). Ele age causando lesões oxidativas na membrana da célula bacteriana, em proteínas essenciais e degradando o DNA. Os compostos fitoquímicos são flavonoides, compostos fenólicos e peptídeos antimicrobianos. A concentração de açúcares e o baixo pH também contribuem para redução de crescimento microbiano (HABIB et al., 2014; JALIL et al., 2017).

O alto potencial terapêutico do mel de abelhas-sem-ferrão desperta grande interesse no uso com aplicação clínica. Por se tratar de um produto com finalidade nutracêutica, os benefícios são inúmeros (MIGUEL; ANTUNES; FALEIRO, 2017). A atividade antimicrobiana *in vitro* do mel de abelhas-sem-ferrão foi comprovada em diversos estudos. Nishio et al. (2016), verificaram que os méis de *Scaptotrigona postica* e *S. bipunctata* foram eficazes contra diversas estirpes-padrão de bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Gonçalves et al. (2005), demonstraram excelente potencial terapêutico do mel de *Nannotrigona testaceicornis* frente a diferentes microrganismos isolados de focos infecciosos. Em estudo *in vitro*, o mel de *Trigona carbonaria* apresentou grande atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (BOORN, et al., 2010).

O uso tópico do mel de *Melipona subnitida* foi eficaz em feridas contaminadas de ratos. Segundo Alves et al. (2008), o mel estimulou a resposta imunológica dos animais, reduzindo a infecção e o tempo de cicatrização das lesões. Grajales-Conesa et al. (2018), avaliaram o uso tópico do mel de abelhas-sem-ferrão das espécies *M. beecheii* e *M. solani* em feridas de pacientes diabéticos, sendo observado que os méis conseguiram contribuir para a cicatrização das feridas contaminadas dos pacientes diabéticos, aumentando também a taxa de epitelização das lesões.

O presente estudo busca avaliar o potencial antibacteriano *in vitro* do mel de quatro espécies de gênero *Melipona* com ocorrência na Amazônia.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Abelhas-sem-ferrão

As abelhas-sem-ferrão são insetos pertencentes à Ordem Hymenoptera, assim como as formigas e diferentes tipos de vespas. Por se tratarem de excelentes polinizadoras, são indispensáveis para manutenção de diversas espécies vegetais, chegando a polinizarem até 90% da vegetação de uma região, além de terem importância cultural e econômica. Possuem distribuição comum e estão fortemente presentes em regiões neotropicais com florestas úmidas (SLAA et al., 2006).

As abelhas-sem-ferrão constituem um grupo com pelo menos 522 espécies que formam a subtribo Meliponina (SILVEIRA et al., 2002), dentro da família Apidae. São reconhecidos 22 gêneros (MICHENER, 2000), sendo *Melipona* e *Trigona* os que agrupam o maior número de espécies (RASMUSSEN; CAMERON, 2010; VIT et al., 2013). As abelhas-sem-ferrão são eussociais (sensu CHOE & CRESPI, 1997) cuja característica mais marcante é a ausência de um ferrão funcional (KERR et al., 1996; VIT et al., 2013).

As abelhas-sem-ferrão podem alcançar distâncias de até 2700m nas atividades de forrageamento para coleta de insumos para a colmeia (RODRIGUES, F. 2012; CORREIA, F.C.S. et al., 2018). Uma característica de suas colônias é a ausência de favos para armazenamento de mel e pólen, ambos são armazenados separadamente em compartimentos de cera e resina (potes) na colônia. As abelhas-sem-ferrão, como os demais representantes de Apidae, possuem uma corbícula, estrutura localizada nas pernas posteriores usada para o transporte do pólen coletado nas flores (KERR et al., 1996; VIT et al., 2013).

A Região Norte apresenta uma grande variedade de abelhas-sem-ferrão (QUADRO 1). As espécies mais comumente encontradas no estado do Acre são pertencentes aos gêneros *Melipona*, *Trigona*, *Partamona*, *Dolichotrigona* e *Scaptotrigona* (SILVEIRA et al., 2002; VILLAS-BÔAS, 2012; PERUQUETTI, R.C, 2019).

Quadro 1. Espécies mais comuns de abelhas-sem-ferrão encontradas na região Norte.

Nome Científico	Nome Popular	Estados
<i>M. amazonica</i>	-	AC, AP, AM, PA, RO.
<i>M. crinita</i>	Jandaira, Jandaira preta	AC, AM, RO.
<i>M. fasciculata</i>	Uruçu cinzenta	PA, TO.
<i>M. compressipes</i>	Jandaira, Jandaira preta	AC, AP, AM, PA, RO, RR e TO.
<i>M. eburnea</i>	Beijo	AC, AM.
<i>M. flavolineata</i>	Uruçu amarela	AC, AM, PA e TO.
<i>M. seminigra</i>	Uruçu-boca-de-renda	AC, AM, MT, PA, RO, RR, TO.
<i>M. grandis</i>	-	AC, RO.
<i>Scaptotrigona</i> sp.	Canudo	AC, AP, AM, PA, RO, RR e TO.
<i>T. albipennis</i>	-	AC, AM, PA, RO, TO
<i>T. amazonensis</i>	-	AC, AM, PA, RO.

O mel e o geoprópolis produzidos pelas abelhas-sem-ferrão possuem funções importantes e distintas dentro da colônia, servindo de fonte energética e de proteção da colmeia, respectivamente. O mel pode ser usado como alimento pelas pessoas, e tanto o mel quanto o geoprópolis têm importantes propriedades medicinais (VIT et al., 2013; JALIL et al., 2017).

## 2.2 Mel

O mel é um suplemento alimentar com diversas propriedades medicinais comprovadas (ALLEN et al., 1991). O mel produzido pelas abelhas-sem-ferrão é bastante utilizado, por povos tradicionais, como alimento ou como medicamento. Diversos estudos relatam o potencial do mel das abelhas-sem-ferrão frente a afecções oftálmicas (RAO et al., 2016), câncer (YAZAN et al., 2016), atividades anti-inflamatória (BORSATO et al., 2014), antimicrobiana (BOORN et al., 2010; PIMENTEL et al., 2013; CRUZ et al., 2014; MASSARO et al., 2014; NISHIO et al., 2016; MEDEIROS et al., 2016; SOUSA et al., 2016), cicatrizante (GRAJALES-CONESA et al., 2018) e antioxidante (DUARTE et al., 2012; SILVA et al., 2013).

Apesar de sua viabilidade econômica, o desenvolvimento da meliponicultura (a criação racional das abelhas-sem-ferrão) ainda depende de diferentes tipos de estudos sobre a biologia e a ecologia das abelhas-sem-ferrão (KOFFLER et al., 2015), além de mudanças na legislação para a comercialização do mel produzido (SOUZA et al., 2006). Há indicativos de mudança na legislação nesse sentido, já que a atualização do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

(RIISPOA; Decreto 9.013 de 29 de março de 2017) diferencia os produtos de *Apis mellifera*, dos das abelhas-sem-ferrão.

É importante ressaltar que o excesso de água no mel de abelhas-sem-ferrão prejudica seu tempo de prateleira, uma vez que quanto mais água, mais rápida a deterioração (VILLAS-BÔAS, 2012). A composição desse mel assemelha-se ao de *Apis*, embora haja maior quantidade de maltose, ácidos orgânicos e fenólicos, além de maior teor de nitrogênio livre e seu pH é normalmente menor (SOUZA et al., 2006; HABIB et al., 2014; ÁVILA et al, 2018).

### **2.2.1 Atividade antimicrobiana do mel**

A atividade antimicrobiana do mel pode ser atribuída a diversos componentes. O principal deles é o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), conhecido por sua ação bactericida (BRUDZYNSKY, 2006;). As enzimas responsáveis pela regulação desse componente são glicose oxidase e catalase. A glicose oxidase está presente nas glândulas hipofaríngeas das abelhas e é introduzida no mel durante a coleta do néctar (BUCEKOVA et al.,2014; JALIL et al., 2017).

A glicose oxidase é responsável por auxiliar na conversão da glicose em ácido glucônico e peróxido de hidrogênio (BRUDZYNSKY, 2006). Enquanto que a catalase de origem polínica atua destruindo o peróxido de hidrogênio. A glicose oxidase é facilmente inativada pelo excesso de exposição à luz e ao calor (WHITE & SUBERS, 1964; MOLAN, 2009; BUCEKOVA et al.,2014; JALIL et al., 2017).

Estudos confirmam que a concentração de peróxido de hidrogênio pode aumentar a medida que o mel é diluído. Uma explicação para tal fato é que a glicose oxidase encontra condições ótimas para atividade em diluições abaixo de 75% (v/v), mesmo havendo menor quantidade de enzima e substrato (MOLAN, 1992; BANG et al., 2003). O estudo de Bang et al. (2003) constatou que o acúmulo máximo de peróxido ocorre em um mel diluído de 30% a 50%. Segundo Brudzynsky (2006) o mel naturalmente pode apresentar diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio, sendo essa quantidade diretamente proporcional à sua atividade bactericida.

O peróxido de hidrogênio atua na degradação do DNA bacteriano. Mesmo que sua quantidade não tenha potencial bactericida efetivo, ainda assim, é possível observar atividade bacteriostática (afeta o crescimento bacteriano) mesmo em baixas concentrações (BRUDZYNSKI et al., 2011).

Os outros componentes que auxiliam na atividade antibacteriana do mel são os açúcares que conferem alta osmolaridade, o baixo pH que confere a acidez e os compostos fitoquímicos (flavonoides, compostos fenólicos e peptídeos antimicrobianos) (MANDAL; MANDAL, 2011; HABIB et al., 2014). A galangina é um dos flavonoides presente no mel que apresenta atividade antibacteriana. Esse flavonoide tem ação direta sobre a mureína hidrolase, enzima essencial para a divisão celular bacteriana (OUYANG et al., 2018). Cushnie e Lamb (2005) testaram a ação de galangina contra *S. aureus*. Os autores sugeriram que o flavonoide pode causar danos a membrana citoplasmática e debilitar a parede celular, resultando na desestabilização da pressão osmótica da bactéria.

Diferente do observado em alguns méis de abelha-sem-ferrão (NISHIO et al., 2016), existem méis que apresentam forte atividade antibacteriana independente do peróxido de hidrogênio (ALLEN et al., 1991; MOLAN, 1992). O mel de manuka é produzido por *A. mellifera* através da coleta do néctar da árvore de manuka (*Leptospermum scoparium*), nativa da Nova Zelândia (MOLAN, 2013). O principal mecanismo de ação desse mel contra bactérias é o metilglioxal (MgO), composto presente no néctar da flor da manuka (KWAKMAN et al., 2011).

### **2.3 Ensaio antimicrobianos**

Existem diversos métodos para mensurar a atividade antimicrobiana *in vitro* de compostos contra microrganismos (SILVEIRA et al., 2009). Atualmente, os métodos disponíveis mais utilizados para detecção da atividade antimicrobiana do mel são de difusão e diluição (NISHIO et al., 2016; MEDEIROS et al., 2016; SOUSA et al., 2016).

O ensaio de difusão em ágar trata-se de uma técnica qualitativa, uma vez que através deste método é possível afirmar somente a presença ou ausência de atividade antimicrobiana. Por outro lado, os ensaios de diluição são considerados quantitativos. A utilização de tais métodos permite determinar a concentração inibitória ou bactericida mínima do composto testado frente ao microrganismo de interesse (VALGAS et al., 2007).

#### **2.3.1 Ensaio de Difusão em ágar**

O ensaio de difusão em ágar é um método do qual um microrganismo sofre a ação de um composto, com concentração conhecida, em meio de cultura sólido. A leitura desse teste é feita através da mensuração da zona do halo de inibição do crescimento bacteriano ou fúngico (PINTO et al., 2003).

Para testar a difusão do composto em meio sólido, a preparação dos poços é feita por meio da remoção do meio de cultura com cilindros de 6-8mm de diâmetro (OSTROSKY et al., 2008). A difusão de algumas moléculas pode ser limitada quando se usa discos de papel filtro impregnados com o composto teste. Sendo assim, o ensaio de difusão em poço permite haja uma menor interferência do antimicrobiano no ágar (HOLETZ et al., 2002).

Foi constatado previamente que o teste de difusão em poço também pode apresentar algumas limitações (BOORN et al., 2010; NISHIO et al., 2016). Variáveis como a espessura do meio de cultura e a concentração do inóculo podem influenciar seus resultados. Compostos naturais como o mel podem conter componentes que não se difundem de forma adequada mesmo no ágar. Esses fatores combinados resultam em diminuição da sensibilidade do teste, refletindo em uma atividade antibacteriana não fidedigna (GRIFFIN et al., 1999; BOORN et al., 2010).

Devido às limitações, os testes de difusão são normalmente utilizados como triagem para identificação da atividade antimicrobiana de méis antes da realização de testes de concentração inibitória mínima (NISHIO et al., 2016).

### **2.3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A CIM refere-se à menor concentração do composto antimicrobiano capaz de inibir crescimento do microrganismo testado. O teste pode ser realizado tanto em meio de cultura líquido como em sólido (CLSI, 2016). No método de diluição em caldo, as técnicas de escolha são macro ou microdiluição. Em ambas as técnicas são feitas diluições em série do agente antimicrobiano para determinar a CIM (CLSI, 2016).

A leitura desse ensaio considera a turbidez do meio, ou seja, o crescimento microbiológico pode ser definido por leitura visual ou espectrofotometria (SILVEIRA et al., 2009). A leitura visual direta pode ser feita com ou sem um composto revelador de viabilidade microbiana. Compostos como sais de resazurina atuam como indicadores de oxirredução, logo se houver respiração celular o corante muda de cor. A reprodutibilidade deste método é uma das suas grandes vantagens, além do baixo custo, pouco material gasto e boa sensibilidade (OSTROSKY et al., 2008).

A reconhecida atividade antimicrobiana do mel de abelhas sem ferrão incentiva a comunidade científica a prosseguir na identificação de novos compostos a fim de elucidar quais atividades biológicas estão envolvidas na morte de microrganismos. Adicionalmente percebe-se uma grande variedade na composição do mel produzido

por diferentes espécies de abelhas em distintas regiões. Esse é o primeiro trabalho que avaliou a atividade antibacteriana dos méis *M. eburnea*, *M. flavolineata* e *M. grandis* provenientes da Amazônia Ocidental. Desta forma, o presente estudo contribuiu para a elucidação da atividade antibacteriana dos méis de abelha do gênero *Melipona*.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Amostragem dos méis

As amostras de mel utilizadas nesse estudo foram obtidas de colônias mantidas em caixas racionais. Em Rio Branco, foram coletadas amostras das espécies *M. eburnea*, *M. grandis* e *M. seminigra*; em Xapuri, de *M. flavolineata*. De cada colônia foram coletados de 5 a 10mL de mel de potes de mel fechados com auxílio de uma seringa estéril. As amostras foram acondicionadas em frascos estéreis envoltos em papel alumínio para que não houvesse alterações físico-químicas. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em geladeira a 4 °C até o momento das análises (WHITE; SUBERS, 1964; MELO et al., 2003). Os méis foram semeados em ágar sangue e incubados a 37 °C por 24h para avaliar a presença de contaminantes (HUSSAIN et al., 2017). As amostras com algum tipo de crescimento microbiano não foram utilizadas.

### 3.2 Estirpes bacterianas

Foram utilizadas estirpes-padrão de bactérias Gram positivas e Gram negativas obtidas na Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz). *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Streptococcus pneumoniae* ATCC 11733 foram selecionadas por estarem associadas a problemas de multirresistência e a infecções nosocomiais (AKOVA, 2016). Adicionalmente, foram utilizadas estirpes formadoras de biofilme: uma estirpe de *S. chromogenes* coagulase positiva e uma estirpe de *S. aureus*, ambas isoladas de vacas com mastite subclínica e identificadas através de MALDI TOF (ISRAEL et al., 2018).

### 3.3 Testes de atividade antimicrobiana

A reativação das estirpes-padrão liofilizadas foi realizada conforme as recomendações do fornecedor para as estirpes ATCC. Todas as bactérias submetidas aos testes de atividade antimicrobiana foram cultivadas em ágar Mueller-Hinton (MH) (Kasvi, ITA) e após o crescimento, as colônias isoladas foram suspensas em solução

salina estéril (NISHIO et al., 2016) e sua turbidez ajustada a 630nm para a absorvância de 0,074 o que corresponde a  $1,5 \times 10^8$ UFC/ml.

### **3.3.1 Difusão em poço**

O ensaio de difusão em ágar foi realizado em triplicata com base no trabalho de Nishio et al. (2016), com modificações. A suspensão ajustada foi espalhada em placas de ágar MH (espessura aproximada de 4mm) com auxílio de um *swab* estéril. Após a secagem da placa, foram cortados poços de 6mm na superfície do ágar. Estes poços foram preenchidos com 50  $\mu$ L de mel diluído a 50% (v/v) em água destilada estéril. As placas foram incubadas a 37 °C por 24h. Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos em milímetros com auxílio de uma régua. O critério utilizado para determinar a atividade antibacteriana foi: halo de inibição <10mm = resistente;  $\geq 10$  e  $\leq 15$ mm = intermediário; >15mm = sensível (ADAMU et al., 2005; AFONSO et al., 2017).

### **3.3.2 Concentrações inibitória mínima e bactericida mínima**

A concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada em triplicata através do ensaio de microdiluição em placa com 96 poços de acordo com as recomendações do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2016).

Foram adicionados 50  $\mu$ L de caldo MH em cada um dos poços e 50  $\mu$ L de mel puro para diluição seriada e 50  $\mu$ L das respectivas suspensões bacterianas. Os poços-controle tinham caldo MH (controle de esterilidade - CN) e caldo MH com bactérias (controle de crescimento - CP). No poço branco (B), foram adicionados mel e caldo (Figura 1).

	Bactéria 1			CP	CN	Bactéria 2			CP	CN	B	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Figura 1. Representação do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em uma microplaca com 96 poços. CP: Controle positivo; CN: Controle negativo; B: Branco.

As microplacas foram tampadas e incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por 18h. O valor de DO foi determinado a 630nm utilizando uma Leitora de Microplacas Celer (modelo Polaris). A porcentagem de inibição do crescimento foi determinada utilizando a fórmula seguinte:

$$PI(\%) = 1 - \left( \frac{DO_t}{DO_c} \right) \times 100 \text{ em que}$$

PI(%) é a porcentagem de inibição do crescimento bacteriano;

DO<sub>t</sub> é o valor da densidade óptica no poço de teste;

DO<sub>c</sub> é o valor da densidade óptica no poço de controle correspondente.

Foram consideradas somente as concentrações que promoveram 100% de inibição do crescimento bacteriano (PATTON et al., 2006).

O ensaio de concentração bactericida mínima (CBM) foi realizado de acordo com o trabalho de Wasihun e Kasa (2016), com modificações. Seguindo os resultados observados na CIM, foram feitas subculturas de todos os poços que não apresentaram crescimento bacteriano. As placas de ágar MH foram incubadas a 37 °C por 24h. A CBM foi determinada como a mínima concentração do mel que não apresentou nenhum crescimento bacteriano nas placas de ágar MH (PAYVELD, 1986).

### **3.3.4 Ensaio *Time-Kill***

Para avaliar o efeito de amostras de mel sobre o crescimento bacteriano, foi traçada uma curva de crescimento tempo-resposta, construída de acordo com as recomendações do CLSI (1999), com modificações. Uma única unidade formadora de colônia (CFU) de *S. aureus* (ATCC 25923) foi inoculada em caldo MH e incubada durante 18h a 37 °C com agitação constante a 200 rpm. Após o crescimento, a cultura teve sua turbidez ajustada para 0,5 na escala de McFarland, e 10 µL foram inoculados a uma densidade de  $1,5 \times 10^6$  CFU/ml em dois tubos, completando o volume final de 1ml de caldo MH e mel, seguindo o valor de CIM. Um tubo recebeu o mel e um foi o controle. Foram tomadas seis alíquotas de 100 µL de cada tubo para representar os tempos adotados (0, 2, 4, 6, 10 e 24h). Estas culturas foram incubadas a 37 °C em incubadora com agitação orbital a 200 rpm. Uma amostra de 100 µL retirada de cada tempo-teste foi diluída em série em solução salina estéril NaCl a 0,85%. As amostras foram semeadas em triplicata em ágar MH seguindo a técnica de microgota e crescidas a 37 °C por 24h para determinar as UFCs totais em cada cultura (NAGUILI et al., 2013).

### **3.4 Efeito sobre a morfologia bacteriana**

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para avaliar o efeito do mel MF sobre a morfologia bacteriana de acordo com o trabalho de NISHIO et al. (2016), com modificações. Colônias de *S. aureus* ATCC 25923 foram cultivadas em ágar MH a 37 °C por 24h e depois transferidas para o caldo MH a uma densidade celular ajustada para  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml. Foram preparados quatro tubos contendo cada 1ml de solução, seguindo o valor de CIM previamente identificado, depois incubados a 37 °C e 150 rpm por 4h. Após incubação, os tubos foram centrifugados por 15 min a 6.000 rpm para formação do *pellet*, o sobrenadante foi desprezado e procedeu-se com duas lavagens com solução salina estéril NaCl a 0,85%. Cada lâmina foi fixada em placa de 24 poços por imersão em 500 µL de glutaraldeído a 2% e solução tampão de cacodilato de sódio 0,1M (pH7,2) a 4 °C durante 2h, depois completou-se o volume para 1ml da mesma solução, incubando por 20h a 4 °C. A pós-fixação foi feita com solução de tetróxido de ósmio ( $OsO_4$ ) a 1% durante 2h. As amostras fixadas foram desidratadas em um gradiente de etanol (30, 50, 70, 90 e 100°GL) durante 15 min cada. As lâminas passaram pelo ponto crítico (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) e observadas sob um microscópio eletrônico de varredura para analisar as alterações celulares.

### **3.5 Análise estatística**

Os dados desse trabalho não apresentaram distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov;  $P > 0,10$ ), assim as comparações envolvendo médias foram feitas usando-se teste não paramétricos. Para se verificar se havia diferença entre os méis na inibição do crescimento bacteriano foi usado o teste de Kruskal-Wallis, adotando-se, quando necessário, o teste de Dunn. Esse mesmo procedimento feito adotado nas comparações entre as concentrações inibitórias mínimas determinadas para os méis testados. O teste de qui-quadrado foi usado para testar a hipótese de que a presença ou ausência do mel testado em sua concentração inibitória mínima não influenciaria o desenvolvimento das colônias de *S. aureus*.

O nível de significância adotado foi de 0,05. Os procedimentos estatísticos estão de acordo com Zar (2010) e os dados foram analisados utilizando o programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizando a o método de difusão em poço para verificação da atividade antimicrobiana, foi observado que as quatro amostras de mel apresentaram distintos padrões de susceptibilidade contra os diferentes microrganismos testados. Os méis de *M. grandis*, *M. flavolineata* e *M. seminigra* apresentaram melhor desempenho contra as estirpes testadas. Não houve diferença do efeito destes três méis quando comparados, diferindo os três apenas do mel de *M. eburnea* (Teste de Dunn;  $H=20,65$ ;  $GL=84$ ;  $P<0,05$ ) (Figura 2).

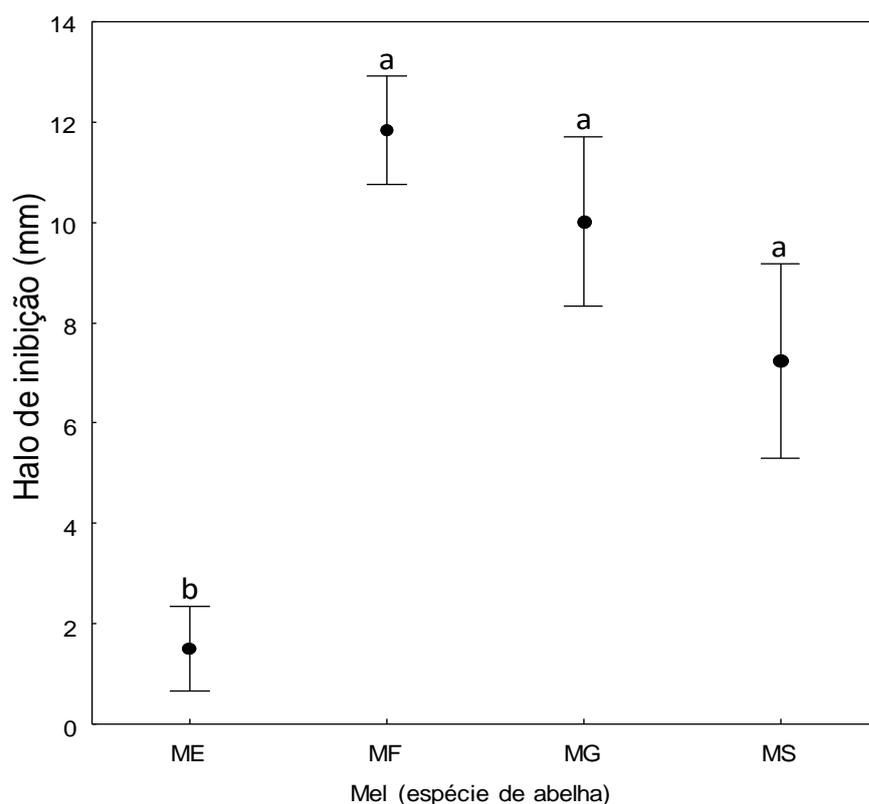


Figura 2. Comparação do halo de inibição obtidos com os méis das quatro espécies de abelhas-sem-ferrão testados. O círculo preenchido indica o valor médio; a barra, o erro padrão. Diferenças significativas são indicadas por letras diferentes colocadas sobre as barras (teste de Dunn;  $P<0,05$ ).

Foram observadas variações nos perfis de susceptibilidade das estirpes testadas frente aos méis ME, MF, MG e MS (Tabela 1). A estirpe de *E. coli* foi resistente a todos os méis testados, enquanto que a estirpe de *S. aureus* apresentou diferentes perfis de susceptibilidade. Esses resultados diferem dos observados em outros estudos, onde algumas estirpes-padrão e isolados clínicos de *S. aureus* e *E. coli* foram susceptíveis aos méis de *M. beecheii*, *M. compressipes manaosensi* e *Tetragonisca angustula* no ensaio de difusão em ágar (CHAN-RODRÍGUEZ et al., 2012; PIMENTEL et al., 2013).

**Tabela 1** – Diâmetros dos halos de inibição (mm) produzidos pelas amostras testadas de mel quatro espécies do gênero *Melipona* contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas no ensaio de difusão em ágar. Os valores são apresentados como média ( $\pm$ EP).

Strains	Mean ( $\pm$ SE) inhibition zone size (mm)			
	ME	MF	MG	MS
<i>S. aureus</i> ATCC25923	9 ( $\pm$ 0.5)	18.3 ( $\pm$ 0.8)	16.6 ( $\pm$ 1.3)	20,6 ( $\pm$ 0.6)
<i>S. pneumoniae</i> ATCC11733	-	12.6 ( $\pm$ 0.8)	15.6 ( $\pm$ 0.6)	13,3 ( $\pm$ 1.2)
<i>E. faecalis</i> ATCC29212	-	12.3 ( $\pm$ 0.6)	12.3 ( $\pm$ 0.8)	9,3 ( $\pm$ 0.6)
<i>E. coli</i> ATCC25922	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC4352	-	15.3 ( $\pm$ 0.6)	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC15442	-	10.0 ( $\pm$ 0.5)	-	-
<i>S. aureus</i> (LB03)	-	13.3 ( $\pm$ 0.3)	20.3 ( $\pm$ 0.8)	-
<i>S. chromogenes</i> (LB14)	-	15.0 ( $\pm$ 0.8)	12.3 ( $\pm$ 0.5)	-

ATCC: American Type Culture Collection. Erro padrão (EP). Sem halo de inibição (-). ME: *M. eburnea*; MG: *M. grandis*; MS: *M. seminigra*; MF: *M. flavolineata*.

O mel de *M. eburnea* produziu halo de inibição apenas quando testado contra *S. aureus*. Uma possível explicação para esses resultados seria a baixa quantidade de peróxido de hidrogênio existente no mel (Brudzynsky, 2006). Segundo Brudzynsky (2006) o mel pode apresentar diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio em sua composição, sendo essa quantidade diretamente proporcional à sua atividade bactericida. Kimoto-nira et al. (2008) também detectaram uma baixa atividade antimicrobiana dos méis de *Friesiometita nigra*, *M. beecheii* e *S. mexicana*, onde os halos de inibição foram menores do que 10mm.

O mel de *M. flavolineata* apresentou atividade contra a maioria das bactérias testadas, com exceção da estirpe-padrão de *E. coli*. Foi observada uma atividade

considerada intermediária contra *P. aeruginosa* (10mm±0,5EP), o que não era inesperado pois esta espécie bacteriana constantemente apresenta novos fenótipos relacionados a multirresistência (NAKANISHI et al., 2018).

Kimoto-nira et al. (2008) testaram méis de diversas espécies de abelhas-sem-ferrão do México. As zonas de inibição encontradas para *E. faecalis* testando os méis de *S. pectoralis* e *S. mexicana* foram semelhantes às encontradas nesse estudo. Entretanto, para a estirpe *K. pneumoniae* o mel de *M. flavolineata* apresentou melhores resultados (Tabela 1).

As bactérias produtoras de biofilme isoladas de mastite bovina também apresentaram satisfatória sensibilidade ao mel de *M. flavolineata*. No estudo de Zamora et. al. (2017), o mel de *T. angustula* também foi eficaz contra *S. aureus* produtor de biofilme.

Considerando a literatura, a susceptibilidade das estirpes frente a esse mel variou de intermediária ( $\geq 10$  e  $\leq 15$ mm) a sensível ( $> 15$ mm) (ADAMU et al., 2005; AFONSO et al., 2017), já que todos os halos de inibição encontrados no presente estudo foram maiores do que 10mm ( $\pm 0,5$ EP). Este resultado pode ser decorrente da maior concentração de polifenóis. De acordo com estudo de Oliveira et al. (2012) méis de coloração mais escura apresentam maior concentração de polifenóis, alguns destes com atividade antibacteriana. A amostra do mel de *M. flavolineata* testada no presente estudo era mais escura que as demais corroborando os achados de Oliveira et al. (2012).

O mel de *M. grandis* apresentou atividade somente contra bactérias Gram positivas, o que era esperado, visto que as bactérias Gram negativas apresentam menor sensibilidade ao mel das abelhas-sem-ferrão (SLAMA, 2008). Este fato pode estar relacionado à permeabilidade da membrana externa das bactérias Gram negativas, que é baixa, e ao efluxo de substâncias antibacterianas presentes no mel (CHANCHAO, 2009; BOORN et al., 2010).

O mel de *M. seminigra* apresentou atividade apenas contra as estirpes-padrão Gram positivas. Cruz et al. (2014) avaliaram o mel dessa mesma espécie testando contra as bactérias *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. coli*, dentre estas *S. aureus* e *E. faecalis* foram inibidas em concentrações menores do que 12%, porcentagem bem inferior à utilizada nesse estudo que foi de 50%.

Existem quatro subespécies de *M. seminigra* já descritas (CAMARGO; PEDRO, 2013), uma explicação é a possível diferença entre subespécies nos dois estudos, além

da diferença entre os locais de realização dos estudos, o que influencia diretamente na composição química do mel decorrente de flora de cada local (VIT et al., 2017).

O ensaio de difusão em ágar foi utilizado como triagem para estabelecer um parâmetro de atividade antimicrobiana dos méis diluídos a 50% (v/v). Entretanto, esse método pode apresentar baixa sensibilidade, uma limitação já descrita por outros autores (BOORN et al., 2010; NISHIO et al., 2016). A espessura do meio de cultura e a concentração do inóculo bacteriano também podem influenciar nos resultados (BOORN et al., 2010).

Compostos naturais como o mel podem conter componentes que não se difundem de forma adequada no ágar, o que reflete em atividade antibacteriana não fidedigna (GRIFFIN et al., 1999; BOORN et al., 2010). Essas limitações aparentemente influenciaram nos resultados desse estudo, já que algumas bactérias que foram resistentes no ensaio de difusão em ágar, foram sensíveis na CIM. Esses resultados contraditórios reforçam a existência de limitações decorrentes da metodologia empregada no ensaio de difusão em ágar.

Os resultados obtidos no método de microdiluição em caldo para as amostras de mel produzidas pelas quatro espécies de *Melipona* encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2** - Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) para as amostras dos méis de quatro espécies de *Melipona*.

Strains	Sample of honey (%)							
	ME		MF		MG		MS	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. aureus</i> ATCC25923	6.25	25	6.25	6.25	3.12	3.12	6.25	12.5
<i>S. pneumoniae</i> ATCC11733	-	-	1.56	3.12	25	25	12.5	12.5
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-	-	3.12	6.25	6.25	12.5	25	-
<i>E. coli</i> ATCC25922	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC4352	-	-	1.56	1.56	-	-	12.5	12.5
<i>S. aureus</i> (LB03)	-	-	6.25	12.5	6.25	12.5	-	-
<i>S. chromogenes</i> (LB14)	12.5	12.5	3.12	6.25	12.5	25	-	-

ATCC: American Type Culture Collection. Erro padrão (EP). Sem inibição (-). ME: *M. eburnea*; MG: *M. grandis*; MS: *M. seminigra*; MF: *M. flavolineata*.

Todos os méis inibiram o crescimento de pelo menos dois dos microrganismos testados. Os valores médios da CIM dos méis *M. flavolineata* e de *M. grandis* foram 3,64% e 10,62%, respectivamente. Não houve diferença estatística entre esses dois

tratamentos na inibição dos microrganismos testados (Teste de Dunn; H=7,10; GL=15; P<0,05).

Para o mel de *M. eburnea*, o ensaio de CIM permitiu encontrar mais um microrganismo (*S. chromogenes*) sensível. Entretanto, comparado aos demais méis, o de *M. eburnea* apresentou baixa atividade antibacteriana.

O mel de *M. flavolineata* apresentou atividade antibacteriana mesmo com baixas concentrações (de 1,56% a 6,25%). Dardón e Enríquez (2007) testaram os méis das abelhas-sem-ferrão *Nannotrigona perilampoides* e *S. pectoralis* encontrando valores de CIM semelhantes (2,5% a 5%) aos encontrados neste estudo. Os valores encontrados por Dardón e Enríquez (2007) e Chan-Rodríguez et al. (2012), apresentaram faixas de MIC variando de 5% a 10% e 4% a 16%, respectivamente. Outros estudos apresentaram valores de MIC acima de 10% para inibição do crescimento de *S. aureus* (BOORN et al., 2010; ZAINOL et al., 2013).

Todos esses resultados indicam ser comum variações na concentração de inibição até entre méis de uma mesma espécie de abelha. O que pode ser devido às variações dos parâmetros físico-químicos dos méis de acordo com a região e até dentro da mesma colônia. Estas diferenças são esperadas para compostos naturais não padronizados (ALMEIDA-MURADIAN, et al., 2007; LIRA et al., 2014; VIT et al., 2017).

O mel de *M. grandis* apresentou grande amplitude nas faixas de inibição, variando de 3,12% a 25% e o de *M. seminigra* variou de 6,25% a 25%. Cruz et al. (2014) relataram valores menores de MIC testando o mel de *M. seminigra*. No presente estudo foi necessária uma concentração maior do mel de *M. seminigra* para inibição de *E. faecalis* e de *S. aureus*. Resultados semelhantes foram observados nos estudos de Cruz et al. (2014) e Zamora et al. (2015), onde a concentração inibitória dos méis de *M. beecheii*, *T. angustula*, *M. compressipes* foi maior do que 20% para alguns microrganismos testados.

Os valores de CBM variaram de 1,56% a 25% quando avaliados os quatro méis (Tabela 2). Quando comparados aos valores de CIM, os valores de CBM dos quatro méis aumentaram de uma a duas concentrações para a maioria dos microrganismos testados. Ou seja, a concentração que inibiu o crescimento bacteriano diferiu daquela que eliminou os microrganismos, expressando uma CIM bacteriostática.

Para poucos microrganismos, a CIM e a CBM tiveram a mesma concentração (Tabela 2). O mel *M. flavolineata*, por exemplo, apresentou ação bactericida a 6,26%

contra a estirpe de *S. aureus* (ATCC25923). Ewnetu et al. (2013) relataram o mesmo valor de CIM e CBM para uma estirpe resistente de *S. aureus*, entretanto com concentração de 12,5%, considerada alta.

Após os ensaios de difusão em ágar, CIM e CBM o mel *M. flavolineata* foi escolhido para a avaliação da cinética de crescimento bacteriano devido aos melhores resultados de inibição de crescimento bacteriano frente às bactérias Gram positivas. Foi observada uma diminuição de até  $2 \log^{10}$  após 6 horas de tratamento quando comparado ao controle (Figura 3), confirmando o efeito inibitório do mel sobre o crescimento bacteriano (teste qui-quadrado;  $\chi^2=122,3$ ; GL=5;  $P<0,001$ ).

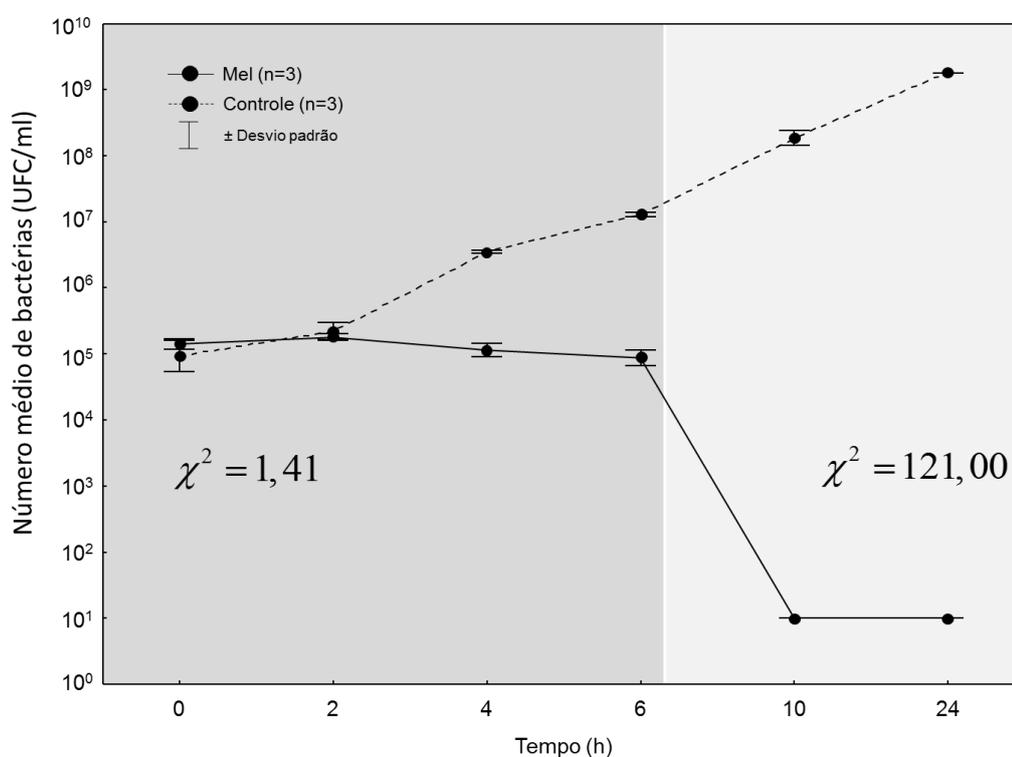


Figura 3. Curvas de time-kill de *S. aureus* exposta ao tratamento com o mel de *M. flavolineata* (CIM 6,25%). O controle consiste em crescimento bacteriano na ausência do mel. Os valores do teste de qui-quadrado mostram que a diferença entre o controle e o tratamento surgem após 4h de incubação ( $P<0,001$ ).

A avaliação cinética da ação antibacteriana do mel de *M. flavolineata* apresentou efeito bactericida. Temaru et al. (2007) também observaram efeito bactericida após 10h de exposição das bactérias frente aos méis de *M. beecheii*, *Trigona biroi* e *S. pectoralis*. Já Nishio et al. (2016) verificaram a diminuição de até  $2 \log^{10}$  UFC após 4h de tratamento quando testaram méis de *S. postica* e *S. binpunctata*, apresentando efeito bactericida em menor tempo do que nesse estudo.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) avaliou o efeito do mel de *M. flavolineata* sobre a estirpe-padrão de *S. aureus* ATCC25923. A lâmina do grupo controle (Figura 4A e B) revelou grande quantidade células por todo campo analisado. A superfície bacteriana apresentava-se intacta e a morfologia celular era normal. Foi possível observar uma pequena quantidade de matriz extracelular na lâmina. No grupo tratado com o mel de *M. flavolineata*, após 4h de incubação (tempo baseado nos resultados do time kill), observou-se uma redução significativa no número de bactérias por campo, quando comparado ao controle, e as células com maior volume (Figura 4C e D).

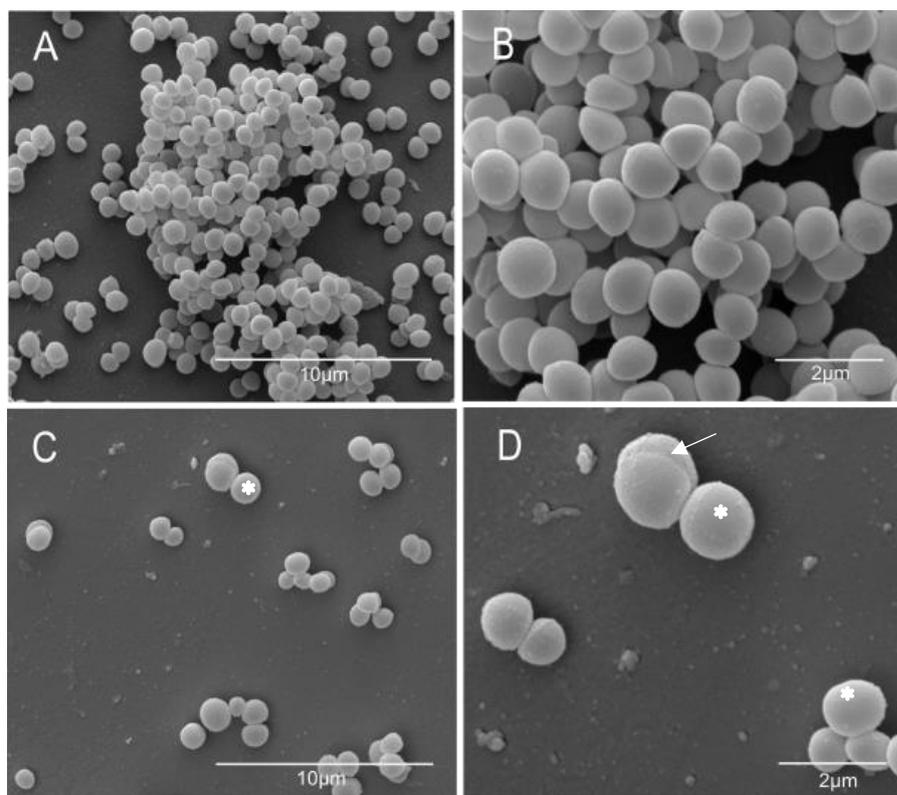


Figura 4. Fotomicrografia mostrando o efeito antibacteriano do mel de *Melipona flavolineata* contra a estirpe de *Staphylococcus aureus* após 4h de incubação. (A e B) Controle negativo (sem mel). (C e D) Células incubadas com mel (6,25%) apresentando septos (seta) e esferoplastos (\*).

Algumas células maiores também apresentavam septo relacionado a divisão celular (Figura 4D). Em suma, o mel de *M. flavolineata* promoveu redução no número e alterações morfológicas nas células bacterianas.

Os septos observados nas células aumentadas (Figura 4D) sugerem que o mel de *M. flavolineata* pode dificultar a divisão celular bacteriana, tornando-a inviável. Jenkins et al. (2011) observaram resultados semelhantes em *S. aureus* resistente à

meticilina (MRSA) tratado com mel de Manuka. O estudo propôs que o mel de Manuka tem ação sobre a mureína hidrolase, interferindo na hidrólise dos componentes da parede celular bacteriana, o que impede a separação das células.

Ouyang et al. (2018) testaram o efeito da galangina (composto encontrado no mel) sobre *S. aureus*. Os autores observaram que esse flavonoide tem potencial para inibição da mureína hidrolase, enzima essencial para a divisão bacteriana. A análise através de microscopia eletrônica de transmissão (MET) revelou grande número de células com evidente inibição da divisão celular e aglomerados celulares com divisão incompleta.

A análise das micrografias também revelou outro efeito causado pelo mel de *M. flavolineata*, o surgimento de esferoplastos (Figura 4D). Essas células resultam da degradação total ou parcial do peptídeoglicano presente na parede celular. Os esferoplastos são susceptíveis a alterações de pressão osmótica do meio e podem lisar facilmente (CHANG; WEINSTEIN, 1964). Cushnie e Lamb (2005) também testaram a ação de galangina contra *S. aureus*. Esses autores sugeriram que o flavonoide pode causar danos a membrana citoplasmática e debilitar a parede celular, que resulta na desestabilização da pressão osmótica da bactéria ou até causar lise.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos ensaios de atividade antibacteriana demonstraram a ação do mel de abelha-sem-ferrão do gênero *Melipona* contra bactérias patogênicas de animais e humanos.

A microscopia eletrônica de varredura mostrou o dano do mel de *M. flavolineata* nas células de *S. aureus* e seu efeito inibitório na multiplicação celular.

Os efeitos observados no presente estudo fazem do mel de abelha-sem-ferrão da Amazônia *M. flavolienata* um produto promissor, servindo, portanto, como um potencial agente antimicrobiano para uso em várias abordagens terapêuticas futuras.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, D.F.S. Efeitos de aplicação tópica do mel de *Melipona subnitida* em feridas infectadas de ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, n.35, p.188-93, 2008.
- ADAMU, H.M. et al. An ethnobotanical survey of Bauchi State herbal plants and their antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, p.1-4, 2005.
- AFONSO, M. A. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo volátil e extratos etanólicos de Folhas e ramos de *Ilex paraguariensis* a. St.-hil. (erva mate) **Revista de ciências ambientais**, v. 11, n. 3, 2017.
- AKOVA, M. Epidemiology of antimicrobial resistance in blood-stream infections. **Virulence**, v.7, n.3, p.252-266, 2016.
- ALLEN, K. L.; MOLAN, P. C.; REID, G. M. A Survey of the Antibacterial Activity of Some New Zealand Honeys. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.43, n.12, p.817-822, 1991.
- ALMEIDA-MURADIAN, L. B.; MATSUDA, A. H.; BASTOS, D. H. M. Physicochemical parameters of Amazon Melipona honey. **Química Nova**, v.30, n.3, p.707-708, 2007.
- ÁVILA, S., et al. Stingless bee honey: quality parameters, bioactive compounds, health-promotion properties and modification detection strategies. **Trends in Food Science & Technology**, v.81, p.37-50, 2018.
- AYRES, M.; AYRES Jr., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. BioEstat - Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Belém Sociedade Civil Mamirauá - MCT - CNPq. 2007.
- BANG, L.M.; BUNTTING, C.; MOLAN, P. The effect of dilution on the rate of hydrogen peroxide production in honey and its implications for wound healing. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.9, n.2, p.267-273, 2003.
- BOORN, K. et al. Antimicrobial activity of honey from the stingless bee *T. carbonaria* determined by agar diffusion, agar dilution, broth microdilution and time-kill methodology. **Journal of Applied Microbiology**, v.108, p.1534-1543, 2010.
- BORSATO, D.M. et al. Topical Anti-inflammatory Activity of a Monofloral Honey of Mimosa scabrella provided by Melipona marginata During Winter in Southern Brazil. **Journal of Medicinal Food**, v.17n.7, p.817-825, 2014.
- BRASIL. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), 80f. Decreto n. 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei n. 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da União, Brasília, 30 mar. 2017, Seção 1, p.54.
- BRUDZYNSKI, K. Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. **Canadian journal of microbiology**, v.52, n.12, p.1228-1237, 2006.
- BRUDZYNSKI, K. et al. Re-examining the role of hydrogen peroxide in bacteriostatic and bactericidal activities of honey. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p.1-9, 2011.

- BUCEKOVA, M. et al. Honeybee glucose oxidase--its expression in honeybee workers and comparative analyses of its content and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated antibacterial activity in natural honeys. **Naturwissenschaften**, v.101, n.8, p.661-670, 2014.
- CAMARGO, J.M.F., PEDRO, S.R.M. Meliponini Lepeletier, 1836. In: Moure J.S., Urban, D., Melo, G.A.R. (Orgs). Catalogue of Bees (Hymenoptera, Apoidea) in the Neotropical Region. 2013. Disponível em:  
<<http://www.moure.cria.org.br/catalogue> accessed in february 3/2013>.
- CHAN-RODRÍGUEZ, D. et al. Antibacterial properties of honey produced by *Melipona beecheii* and *Apis mellifera* against foodborn microorganisms. **Food Science and Biotechnology**, v.21, p.905–909, 2012.
- CHANCHAO, C. Antimicrobial activity by *Trigona laeviceps* (stingless bee) honey from Thailand. **Pakistan journal of medical sciences**, v.25, n.9, 2009.
- CHANG, T. W.; WEINSTEIN, L. Morphological changes in gram-negative bacilli exposed to cephalothin. **Journal of Bacteriology**, v.88, n.6, p.1790-7, 1964.
- CHOE J.C.; CRESPI B.J, editors. **The Evolution of Mating Systems in Insects and Arachnids**. Cambridge and New York: Cambridge University Press. 1997.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents. Pennsylvania: CLSI, 1999.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26 ed. Pennsylvania. 2016.
- COETZEE, J. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance (MCR-1) among *Escherichia coli* isolated from South African patients. **South African Medical Journal**, v.106, n.5, p.35-6, 2016.
- CORREIA, F. C. S.; PERUQUETTI, R. C.; SILVA, A. R.; GOMES, F. A. Distância de voo para forrageamento da abelha uruçu beijo (*Melipona eburnea* Friese, 1900). Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR, v. 20, n. 3, 2018. Disponível em:  
<<http://www.revistas.unipar.br/index.php/veterinaria/article/view/5838>>
- CRUZ, C. B. N. et al. Antimicrobial activity of honeys from two stingless honeybee species and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) against pathogenic microorganisms. **Acta Amazônica**, v.44, n.2, p.287-290, 2014.
- CUSHNIE, T. P.; LAMB, A. J. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. **Journal of Ethnopharmacology**, v.101, n.1-3, p.243-248, 2005.
- DARDÓN, M. J.; ENRÍQUEZ, E. Caracterización fisicoquímica y antimicrobiana de la miel de nueve especies de abejas sin aguijón (meliponini) de Guatemala. **Interciência**, v.33, p.916-922, 2008.
- DUARTE, A.W.S. et al. COMPOSITION and antioxidant activity of honey from Africanized and stingless bees in Alagoas (Brazil): a multivariate analysis. **Journal of Apicultural Research**, v.51, n.1, p.23-35, 2012.
- EWNETU, YALEMWORK; LEMMA, WOSSENSEGED; BIRHANE, NEGA. Antibacterial effects of *Apis mellifera* and stingless bee honeys on susceptible and resistant strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* in Gondar, Northwest Ethiopia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.13, n.269, p.1-7, 2013.
- GONÇALVES, A. L.; ALVES, F. A.; MENEZES, H. Atividade antimicrobiana do mel da abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera:

- Apidae, Meliponini). **Arquivo Instituto Biológico**, v. 72, n. 4, p.455-459, 2005.
- GRAJALES-CONESA, J. et al. Mieles de abejas sin aguijón en el tratamiento de úlceras de pie diabético. **Salud pública de México**, v.60, n.1, 2018.
- GRIFFIN, S.G., WYLLIE, S.G., MARKHAM, J.L. AND LEACH, D. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. **Flavour and Fragrance Journal**, v.14, p.322–332, 1999.
- HABIB, H. M. et al. Bioactive components, antioxidant and DNA damage inhibitory activities of honeys from arid regions. **Food Chemistry**, v.153, p.28–34, 2014.
- HOLETZ, F.B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.1027-1031, 2002.
- HUSSAIN, M. B. et al. In-vitro susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to honey. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v.27, p.57-60, 2017.
- ISRAEL, L. F. S. et al. Produção de biofilme por *S.chromogenes* isolados de amostras de leite provenientes de rebanhos bovinos com mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70, n.6, p.1943-1949, 2018.
- JALIL, M. A. A.; KASMURI, A. R.; HADI, H. Stingless Bee Honey, the Natural Wound Healer: A Review. **Skin Pharmacology and Physiology**, v.30, n.2, p.66-75, 2017.
- JENKINS, R.; BURTON, N.; COOPER, R. Manuka honey inhibits cell division in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.66, n.11, p.2536-42, 2011.
- KERR, W.E.; ALMEIDA, G.A.; NASCIMENTO, V.A. **Abelha Uruçu. Biologia, Manejo e Conservação**. Belo Horizonte: Fundação Acangú, 1996. 143p.
- KIMOTO-NIRA, H.; AMANO, K. Antimicrobial activity of honey produced by stingless honey bees. **Journal of Apicultural Research**, v.47, n.4, p.325-327, 2008.
- KOFFLER, S. et al. Variação temporal na produção de mel pela abelha sem ferrão *Melipona subnitida* (Hymenoptera: Apidae): a gestão a longo prazo revela seu potencial como espécie comercial no Nordeste do Brasil. **Journal of Economic Entomology**, v.108, n.3, p.858-867, 2015.
- KUMAR, P.; KIZHAKKEDATHU, J. N.; STRAUS, S. K. Antimicrobial Peptides: Diversity, Mechanism of Action and Strategies to Improve the Activity and Biocompatibility In Vivo. **Biomolecules**, v.8, n.1, 2018.
- KWAKMAN, P. H. Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity. **PloS one**, v.6, n.3, e17709, 2011.
- LIN, J. Antimicrobial resistance: from basic science to translational innovation. **Animal Health Research Reviews**, v.18, n.2, p.85-86, 2018.
- LIRA, A.F. et al. Estudo comparativo do mel de *A. mellifera* com méis de meliponíneos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, n.3, p.169-178, 2014.
- MANDAL, M.D.; MANDAL S. Honey: its medicinal property and antibacterial activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.1, p.154–160, 2011.
- MASSARO, C.F. In vitro antibacterial phenolic extracts from “sugarbag” pot-honeys of Australian stingless bees (*Tetragonula carbonaria*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, n.50, p. 12209-12217, 2014.

- MEDEIROS, V. D. F. L. P. et al. Antibacterial properties and healing effects of Melipona scutellaris honey in MRSA-infected wounds of rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.31, 2016.
- MICHENER, C.D. **As abelhas do mundo**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2. Ed, 953 p, 2000.
- MELO, Z. F. N. et al. Estudo das alterações do hidroximetilfurfural e da atividade diastásica em méis de abelha em diferentes condições de armazenamento **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.5, n.1, p.89-99, 2003.
- MIGUEL, M.; ANTUNES, M.; FALEIRO, M. Honey as a Complementary Medicine. **Integrative Medicine Insights**, v.12, p.1-15, 2017.
- MOLAN, P. The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. **Bee World**, v.73, n.5, p.28, 1992.
- MOLAN, P. Honey: Antimicrobial actions and role in disease management. *In*: AHMAD, I; AQIL, F. **New strategies combating bacterial infection**. Hoboken: wiley-blackwell, p.229–253, 2009.
- MOLAN, P. The Use Of Manuka Honey: To Promote Wound Healing. **The Official Journal of The New Zealand College of Primary Health Care Nurses**, p.23-25, 2013.
- NAGUILI, H. et al. Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. **Veterinary Research Forum**, v.4, n.3, p.179 – 183, 2013.
- NAKANISHI, N. Acquisition of antimicrobial-resistant variants in repeated infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* revealed by whole genome Sequencing. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.25, v.2 p. 154–156, 2019.
- NISHIO, E. K. et al. Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807. **Scientific reports**, v.6, p.1-8, 2016.
- OLIVEIRA, P. S., et al. Phenolic acids, flavonoids and antioxidant activity in honey of Melipona fasciculata, M. flavolineata (Apidae, Meliponini) and Apis mellifera (Apidae, Apini) from the Amazon. **Química nova**, v.35, n.9, 2012.
- OSTROSKY, E.A. et al. Métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, 2008.
- OUYANG, J. et al. Antimicrobial Activity of Galangin and Its Effects on Murein Hydrolases of Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus (VISA) Strain Mu50. **Chemotherapy**, v.63, n.1, p.20-28, 2018.
- PATTON, T. et. al. Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. **Journal of Microbiological Methods**, v.64, p-84–95, 2006.
- PAYVELD, R. Studies on the medicinal potentials of Aloe vera locally used for wound dressing and antimicrobial activity. **Indian Journal Pharmacognosy**, v.31, n.3, p.170–172, 1986.
- PERUQUETTI, R.C. Introdução ao estudo sobre as abelhas-sem-ferrão. Disponível em <http://www.ufac.br/ppgespa/polen>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2019.
- PIMENTEL, R.B.Q. et al. Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by stingless bee Melipona compressipes manaoensis and commercial honey. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.13, p.2-1, 2013.

- PINTO, T.J.A; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p. 2003
- RAO, P. V. et al. Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.26, n.5, p.657-664, 2016.
- RASMUSSEN, C.; CAMERON, S.A. Global stingless bee phylogeny supports ancient divergence, vicariance, and long-distance dispersal. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 99, p.206–232, 2010.
- RODRIGUES, F. **Aspectos do voo de *Melipona mandacaia* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) na região do Vale do Submédio São Francisco**. 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2012.
- SILVA, G. R. et al. Aspectos bioecológicos e genético-comportamentais envolvidos na conservação da abelha Jandaíra, *Melipona subnitida* Ducke (Apidae, Meliponini), e o uso de ferramentas moleculares nos estudos de diversidade. . **Arquivos do Instituto Biológico**, v.81, n.3, p.299-308, 2014.
- SILVA, I. A. A. Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. **Food Chemistry**, v.141, p.3552–3558, 2013.
- SILVEIRA, F.A.S.; MELO, G.A.R.; ALMEIDA, E.A. **Abelhas brasileiras: sistemática e identificação**. 1ed. Belo Horizonte: Fundação Araucária. 2002.
- SILVEIRA, L.M.S. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.90, n.2, p.124-128, 2009.
- SLAA, E.J. et al. Stingless bees in applied pollination: practice and perspectives. **Apidologie**, v.37, p.293-315, 2006.
- SLAMA, T. G. Gram-negative antibiotic resistance: there is a price to pay. **Critical Care**, v.12, n.4, p.4, 2008.
- SOUSA, J.M. et al. Polyphenolic profile and antioxidant and antibacterial activities of monofloral honeys produced by Meliponini in the Brazilian semiarid region. **Food Research International**, v.84, p.61–68, 2016.
- SOUZA, B. et al. Composition of stingless bee honey: setting quality standards. **Interciencia**, v.31, p-867–875, 2006.
- TEMARU, E. et al. Antibacterial activity of honey from stingless honeybees. **Polish journal of microbiology**, v.56, p.281-285, 2007.
- VALGAS, C. et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal Microbiology**, v.38, p.369-380, 2007.
- VILLAS-BÔAS, J. Manual tecnológico: mel de abelhas-sem-ferrão. Série Manual Tecnológico. Brasília, Instituto Sociedade, População e Natureza. 2012
- VIT, P., PEDRO, S. R. M.; ROUBIK, D. W. **Pot-Honey: A Legacy of Stingless Bees**. New York: Springer. 2013.
- VIT, P. et al. Meliponini biodiversity and medicinal uses of pot-honey from El Oro province in Ecuador. **Emirates Journal of Food and Agriculture**. v.27, p.502–506, 2015.
- VIT, P. et al. Ecuadorian honey types described by Kichwa community in Rio Chico, Pastaza province, Ecuador using Free-Choice Profiling. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.27, n.3, 2017.

- WASIHUN, A.G.; KASA, B.G.. Evaluation of antibacterial activity of honey against multidrug resistant bacteria in Ayder Referral and Teaching Hospital, Northern Ethiopia. **SpringerPlus**, v.5, 2016.
- WHITE, J.W, Jr, SUBERS, MH. Studies on honey inhibit. 4. Destruction of the peroxide accumulation system by light. **Journal of Food Science**, v.29, p.819-828, 1964.
- YAZAN, L.S.et al. Chemopreventive Properties and Toxicity of *Kelulut* Honey in *Sprague Dawley* Rats Induced with Azoxymethane. **BioMed Research International**, p.1-6, 2016.
- ZAINOL, M. I.; YUSOFF, K. M.; YUSOF, M. Y. M. Antibacterial activity of selected Malaysian honey. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.13, n.1, p.129, 2013.
- ZAMORA, L. G. et al. Stingless Bee Honeys from Costa Rica Exhibit Antimicrobial Activity Against Antibiotic-resistant Clinical Isolates, **Journal of biologically active products from nature**, v. 5, p. 144-129, 2015.
- ZAMORA, L. G. et al. An insight into the antibiofilm properties of Costa Rican stingless bee honeys. **Journal Wound Care**, v.26, n.4, p.168-177, 2017.
- ZAR, J.H. Biostatistical Analysis, 5th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 944p. 2010.