



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

SORREL GODINHO BARBOSA DE SOUZA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL DE ABELHA SEM FERRÃO
ASSOCIADO ÀS NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

**SANTARÉM – PARÁ
2022**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

- S729a Souza, Sorrel Godinho Barboza de
Atividade antimicrobiana do mel de abelha sem ferrão associado às nanopartículas de prata. / Sorrel Godinho Barboza de Souza. – Santarém, 2022.
44 fls. : il.
Inclui bibliografias.
- Orientador: Paulo Sérgio Taube Junior.
Coorientadora: Katrine Rabelo da Silva.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Instituto de Biodiversidade e Florestas, Programa de Pós-Graduação em Biociências.
1. Mel. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Abelhas sem ferrão. 4. Nanopartículas. 5. Amazônia. I. Tauber Junior, Paulo Sérgio, *orient.* II. Silva, Katrine Rabelo da, *coorient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 638.1

Bibliotecária - Documentalista: Cátia Alvarez – CRB/2 843

SORREL GODINHO BARBOSA DE SOUZA

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL DE ABELHA SEM FERRÃO
ASSOCIADO ÀS NANOPARTÍCULAS DE PRATA**

Dissertação de Mestrado apresentado ao programa de pós-graduação *stricto sensu* em Biociências da Universidade Federal do Oeste do Pará como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Taube Junior
Coorientadora: Profa. Dra. Katrine Rabelo da Silva

Área de concentração: Fisiologia ambiental.

SANTARÉM – PARÁ
2022

SORREL GODINHO BARBOSA DE SOUZA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL DE ABELHA SEM FERRÃO

ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Exame de Defesa apresentado ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Biociências da Universidade Federal do Oeste do Pará como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Taube Junior
Co-orientadora: Profa. Dra. Katrine Rabelo da Silva
Área de concentração: Fisiologia ambiental.

Data de aprovação: 26/09/2022.

Nota: 9,8.

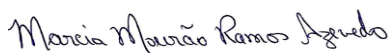
BANCA EXAMINADORA

Paulo Sérgio Taube Júnior
Professor - IBEFUFOPA
SIAPE: 1770373



Dr. Paulo Sérgio Taube Júnior – Orientador

Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA



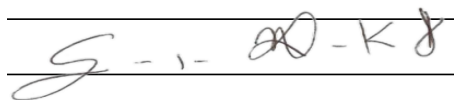
Dra. Marcia Mourão Ramos Azevedo – Membro Titular

Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA



Dr. Hugo de Campos Braga – Membro Titular

Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP



Dr. Gerson Nakazato - Membro Titular

Universidade Federal de Londrina



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
COORDENAÇÃO DO INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E
FLORESTAS



ATA Nº 17 / 2022 - CIBEF (11.01.06.03)

Nº do Protocolo: 23204.013852/2022-90

Santarém-PA, 04 de outubro de 2022.

Aos 26 (vinte e seis) dias do mês de setembro do ano de 2022 (dois mil e vinte e dois), às 14h00min, em sala virtual (google meet ? vde-xrmy-wod), instalou-se a banca examinadora de dissertação de mestrado da aluna Sorrel Godinho Barbosa de Souza. A banca examinadora foi composta pelos professores Dr. Hugo de Campos Braga, Universidade Federal de São Paulo ? UNIFESP, examinador externo a UFOPA, Dr. Gerson Nakazato - Universidade Estadual de Londrina (UEL), examinador externo a UFOPA, Dra. Márcia Mourão Ramos Azevedo, Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), examinador (a) externo (a) ao Programa, e Dr. Paulo Sérgio Taube Júnior, Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), orientador. Deu-se a abertura dos trabalhos, por parte do professor Dr. Paulo Sérgio Taube Júnior, coordenador do Programa e presidente da Banca, que, após apresentar os membros da banca examinadora e esclarecer a tramitação da defesa, solicitou à candidata que iniciasse a apresentação da dissertação, intitulada ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL DE ABELHA SEM FERRÃO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE PRATA, marcando um tempo de 45 minutos para a apresentação. Concluída a exposição, o Prof. Dr. Paulo Sérgio Taube Júnior, presidente, passou a palavra ao examinador externo a UFOPA, Prof. Dr. Hugo de Campos Braga, para arguir a candidata, em seguida, ao examinador externo a UFOPA, Prof. Dr. Gerson Nakazato e por fim, à examinadora externa ao Programa, Profa. Dra. Márcia Mourão Ramos Azevedo, para que fizessem o mesmo. Após, todas as arguições, os membros da banca se reuniram, sem a presença da aluna e demais, para fazer as suas considerações sobre o trabalho em julgamento. A banca então deferiu a aprovação da candidata, conforme as normas vigentes na Universidade Federal do Oeste do Para. A versão final da dissertação deverá ser entregue ao programa, no prazo de 30 dias; contendo as modificações sugeridas pela banca examinadora e constante na folha de correção anexa.

(Assinado digitalmente em 04/10/2022 13:47)
MARCIA MOURAO RAMOS AZEVEDO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
IBEF (11.01.06)
Matrícula: 1024061

(Assinado digitalmente em 04/10/2022 13:53)
PAULO SERGIO TAUBE JUNIOR
COORDENADOR DE POS-GRADUACAO
IBEF (11.01.06)
Matrícula: 1770373

(Assinado digitalmente em 04/10/2022 22:12)

GERSON NAKAZATO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 176.843.348-83

(Assinado digitalmente em 16/10/2022 22:54)

SORREL GODINHO BARBOSA DE SOUZA
DISCENTE
Matrícula: 2019100120

(Assinado digitalmente em 04/10/2022 17:48)

HUGO DE CAMPOS BRAGA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 009.702.350-70

Visualize o documento original em <https://sipac.ufopa.edu.br/public/documentos/index.jsp>
informando seu número: **17**, ano: **2022**, tipo: **ATA**, data de emissão: **04/10/2022** e o código de
verificação: **d110946285**

RESUMO

Desde a antiguidade o mel é utilizado de forma empírica para tratar doenças e feridas, mas somente nas últimas décadas começaram a desenvolver estudos para analisar suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, cicatrizante e estimulante tecidual. Considerando essas propriedades, o objetivo dessa pesquisa é investigar a atividade antimicrobiana do mel em natura e, em seguida, realizar a solução do mesmo mel adicionada às nanopartículas de prata, conhecida por terem propriedades desinfetantes e antissépticas, para a observação de uma suposta potencialização do efeito antimicrobiano do mel, e nas duas fases contra os mesmos microrganismos de interesse clínico: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Candida kruzei*, utilizando método de difusão em poços. Trata-se de um estudo analítico, experimental e bibliográfico. A amostra é formada por 36 méis de *Apis mellifera* e de *Melipona sp.* produzida em cidades e comunidades ao redor de Santarém-PA, Brasil. As análises físico-químicas e bioquímicas realizados nos méis foram: atividade antioxidante (% de Inibição DPPH), compostos fenólicos totais (mgGA100g⁻¹), teor de açúcares redutores (%), pH, umidade (%), teor de sólidos solúveis (°Brix). O uso de AgNP está crescendo exponencialmente e com múltiplas aplicações e benefícios, além de poder suprimir o crescimento microbiano em áreas contaminadas. Assim, neste estudo os efeitos da associação do mel com a nanopartícula de prata foram sinérgicos. As AgNPs biogênicas preparadas mostraram um efeito citotóxico contra algumas bactérias Gram positivas e negativas. A síntese verde de AgNPs utilizando diferentes méis pode ser uma alternativa eficiente e econômica para combater essa multirresistência bacteriana.

PALAVRAS-CHAVE: mel, atividade antimicrobiana, abelhas sem ferrão, nanopartículas, Amazônia.

ABSTRACT

Since antiquity, honey has been used empirically to treat diseases and wounds, but only in the last decades have they started to develop studies to analyze its anti-inflammatory, antimicrobial, healing and tissue stimulating properties. Considering these properties, the objective of this research is to investigate the antimicrobial activity of honey in natura and, then, to make the solution of the same honey added to the silver nanoparticles, known for having disinfectant and antiseptic properties, for the observation of a supposed enhancement antimicrobial effect of honey, and in both phases against the same microorganisms of clinical interest: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* and *Candida kruzei*, using a well diffusion method. This is an analytical, experimental and bibliographic study. The sample will consist of 17 honeys from *Apis mellifera* and *Melipona sp.* produced in communities in Santarém-PA, Brazil. The physical-chemical and biochemical analyzes carried out on the honeys were: antioxidant activity (% of DPPH Inhibition), total phenolic compounds (mgGA100g⁻¹), reducing sugar content (%), pH, soluble solids content (° Brix), moisture (%). The use of AgNP is growing exponentially and with multiple applications and benefits, in addition to being able to suppress microbial growth in contaminated areas. Thus, in this study the effects of the association of honey with the silver nanoparticle were synergistic. The prepared biogenic AgNPs showed a cytotoxic effect against some Gram positive and negative bacteria. The green synthesis of AgNPs using different honeys can be an efficient and economical alternative to combat this bacterial multidrug resistance.

KEYWORDS: honey, antimicrobial activity, stingless bees, nanoparticles, Amazonia.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Funcionalidade do mel	11
2.2 Classificação das abelhas sem ferrão no Brasil	12
2.3 Alterações e adulterações	13
2.4 Atividade antimicrobiana do mel	14
2.5 Tipos de contaminação	15
2.5.1 Contaminação química	15
2.5.2 Contaminação microbiológica	15
2.6 Alguns microrganismos	15
2.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	16
2.6.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
2.6.3 <i>Escherichia coli</i>	17
2.6.4 <i>Candida kruzei</i>	17
3 NANOPARTÍCULAS DE PRATA	18
4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL ASSOCIADA AS NANOPARTÍCULAS DE PRATA	20
5 MATERIAL E MÉTODOS	21
5.1 Local	21
5.2 Descrição das amostras	21
5.3 Avaliação estatística	22
5.4 Avaliação físico-químicas	22
5.5 Avaliação antimicrobiana	22
5.6 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)	23
5.7 Amostras de méis utilizadas na síntese verde de nanopartículas de prata (AgNPs)	24
5.8 Síntese verde de AgNPs	24
5.9 Caracterização das AgNPs produzidas com mel de abelhas	25
5.9.1 Espectroscopia de UV/VIS	25

5.9.2 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta	25
5.10 Concentração Mínima Inibitória (CMI) das AgNPs	26
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
7 CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Resolução 12 de 1978, da ANVISA, pode ser definido como mel, o produto natural elaborado por abelhas, podendo ser produzido a partir do néctar de flores ou exsudatos de plantas. Também pode ser obtido através de excreções de insetos sugadores de partes vivas das plantas, chamado mel de melato (FREITAS, D.; KHAN, A.; SILVA, L., 2004). Melato é um termo da biologia que se refere às excreções em forma de líquidos açucarados, de variadas quantidades de espécies de parasitas sugadores da seiva elaborada do floema das plantas, como os homópteros. Tais líquidos são procurados e contidos pelas abelhas como se fossem néctares e passam pelos mesmos processos enzimáticos, contudo, o produto final é diferente nas suas propriedades físico-químicas e constitui mel de melato (ALVES, 2008).

O mel tem uma matriz complexa com diversas interferências de variáveis não controladas pelo homem durante sua elaboração, como a floração, solo, clima, presença de outros insetos sugadores e demais fatores. As abelhas, por sua vez, vão utilizar os recursos disponíveis como fonte de açúcar para elaborá-lo, logo, é comum a ocorrência de mel floral misturado com mel de melato. O mel é constituído por diversos açúcares, predominantemente D-frutose e D-glicose, bem como outros componentes como ácidos orgânicos, enzimas e partículas sólidas coletadas pelas abelhas. (CAMPOS E MODESTA, 2000).

O mel é uma substância de consistência líquida viscosa, aromática e doce, adquirido a base de néctar recolhido de plantas, onde abelhas melíferas recolhem, transformam, associam e deixam maturar nas colmeias. Sua composição físico-química, aroma, cor e sabor modificam de acordo com a espécie da abelha produtora, da origem floral ou fonte de alimento, flutuações no teor de néctar, das condições geográficas e climáticas, tipo de solo, umidade, altitude e também da gestão dos meliponicultores. O mel é considerado o produto apícola mais fácil de ser explorado, sendo também o mais conhecido e com maiores possibilidades de comercialização. Além de ser alimento, é também utilizado pela indústria farmacêutica e cosmética, pelas suas conhecidas ações terapêuticas (VENTURIM, SARCINELLI & SILVA, 2007).

A aparência do mel varia de quase incolor a marrom escuro, pode ser fluído viscoso ou até mesmo sólido. Variedades de mel podem ser identificados por sua cor, gosto, sabor e maneira de cristalização. (SNOW, M. E MANLEY-HARRIS, 2004).

Em circunstâncias excepcionais, o sedimento do mel é analisado pelo conteúdo de grãos de pólen. Alternativamente, em variedades de mel de melato, outra característica de componentes presentes, como esporos, fragmentos de micélio, ou fragmentos de folha, é determinada. Outras características úteis na identificação do tipo de mel incluem condutividade específica e componente de flavor específico da variedade (FREITAS, D. KHAN, A. E SILVA, L., 2004).

O mel é processado em local específico denominado casa do mel, onde se tem um ambiente propício e normatizado pela ABNT, desenvolvido especialmente para essa prática. O processo de extração do mel é relativamente simples, mas, de acordo com a literatura, é durante esse procedimento que ocorrem as maiores contaminações do produto (TOSI, et al., 2002).

Em cada etapa do processo existe o risco de contaminação, necessitando cuidados especiais. Por ser um produto higroscópico, o mel capta muito facilmente a umidade, e conseqüentemente, os odores do ambiente em que está sendo beneficiado (TOSI, et al., 2002).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Funcionalidade do mel

O mel é um alimento rico e de alto valor energético, consumido mundialmente e de extrema importância para a saúde humana quando puro por apresentar diversas propriedades, tais como: a antimicrobiana, a curativa, calmante, estimulante, regeneradora de tecidos, entre outras. Por ser constituído de açúcares simples como glicose e frutose, sua passagem do sistema digestivo para a circulação sanguínea e desta para o interior da célula, onde é metabolizada, não requer muitas transformações através de enzimas, por exemplo, e sua entrada no metabolismo celular é relativamente rápida. (PEREIRA, 2010).

Os principais ingredientes responsáveis pela funcionalidade desses produtos são as fibras solúveis e insolúveis, flavonóides, carotenóides, ácido orgânico v-3 e v-6, prebióticos e probióticos (TAIPINA et al., 2003).

Entretanto, deve ser enfatizado que os alimentos funcionais são utilizados com o intuito de prevenção e promoção da saúde e não à cura de doenças (CAMPÊLO, M., et. al. 2015).

No Brasil estima-se um consumo de 120 mil toneladas por ano de leites fermentados contendo microrganismos probióticos (OLIVEIRA et al., 2002).

2.2 Classificação das abelhas sem ferrão no Brasil

As abelhas são classificadas como insetos pertencentes à família Apidae, subfamília Apinae e ao gênero *Apis*, qual engloba uma série de espécies, que são responsáveis pela maior parte da produção de mel. Originárias dos Alpes europeus e da Rússia central, as *Apis mellifera mellifera* foram as primeiras abelhas do gênero introduzidas no Brasil pelo padre Antônio Carneiro, em 1949. Também conhecidas como abelhas europeias, elas também possuem temperamento dócil, porém ficam agitadas durante o manuseio.

Outras espécies de abelhas também foram trazidas para o Brasil, como *Apis mellifera ligustica*, da Itália; *Apis mellifera lamarckii*, do Vale do Nilo e *Apis mellifera carnica*, da Áustria e da Iugoslávia.

Aqui no Brasil existem reservas florais capazes de proporcionar milhares de toneladas de mel, de primeira qualidade, de aceitação dos mercados de maior exigência do mundo. Na Paraíba, por exemplo, existe uma gama de possibilidades para estudo dos Meliponíneos, ao observar a grande variedade de espécies nativas existentes neste Estado. (CAMPÊLO, M., et. al. 2015).

Em relação ao mel de abelha nativa (*Melipona*), este é pouco conhecido em termos de composição, sendo constantemente associado às características do mel das abelhas africanizadas. Assim, é importante salientar os hábitos das abelhas nativas que se diferenciam das abelhas africanizadas, podendo alterar também a composição do produto (BAZONI, 2012).

No Estado do Amazonas, a vontade pela criação de abelhas sem ferrão é justificada pelo grande valor terapêutico do mel e pólen, pela ampliação da renda familiar, polinização e perpetuação de milhares de plantas, também em servir como fonte de lazer, no entanto, ainda precisa foco maior em estudos quanto aos constituintes nutricionais e farmacológicos. (BAZONI, 2012).

A meliponicultura se destaca em termos de preferências pelos criadores de abelhas da Amazônia. Além da facilidade de manejo, a preferência pela criação de abelhas sem ferrão está relacionada também com costumes e tradições locais (RAYOL e MAIA, 2013). No

estado do Pará a atividade apícola também tem se fortalecido nos últimos anos como alternativa de ocupação e geração de emprego e renda, possibilitando a consolidação do estado num grande produtor de mel do Brasil (MONTEIRO et al., 2013).

Nas comunidades rurais dos municípios do baixo Amazonas, como em Óbidos, Juruti e Itaituba, a meliponicultura contribui para a preservação ambiental como também está inserida tradições locais ou na fonte de renda dos produtores, fato que gera renda, integra a população e há o bom uso da terra (RAYOL E MAIA 2013; DEMETERCO, 2016).

O mel, pólen, geoprópolis e cera de abelha sem ferrão há muito tempo é usado pelos índios e sitiantes no combate às doenças pulmonares, inapetência, infecção dos olhos, fortificantes e agentes bactericidas. Ainda sendo o adoçante natural e fonte de energia, apresentando também, efeitos imunológicos, antibacteriano, anti-inflamatório, analgésico e entre outros (CAMPÊLO, M., et. al. 2015).

2.3 Alterações e adulterações

Como qualquer alimento, o mel deve ter seus parâmetros de qualidade inalterados, pois, qualquer mudança ou adulteração da sua composição, compromete sua eficiência no organismo, sabor e cor. Normalmente ocorrem por erro de armazenamento e de manipulação (BAZONI, 2012). Sua qualidade pode ser afetada pelos processos de aquecimento, extração, liquefação ou pela etapa de estocagem demorada. As suas características precisam ser controladas analiticamente e asseguradas mediante certificado que ateste a sua precisão, garantindo ao consumidor que está adquirindo um produto de qualidade e a proteção contra a especulação comercial (MENDES et al., 2009).

De acordo com Mendes et al. 2009 e Serrano et al. 1994, o grau de envelhecimento do mel é medido através do conteúdo de atividade diastásica e do hidroximetilfurfural. Os autores relataram que a cristalização é um fator que requer observação no momento do envase, na distribuição e comercialização. A maioria dos méis cristalizam facilmente por se tratar de um líquido muito saturado de açúcares, como a glicose e frutose, sendo a glicose o primeiro açúcar a cristalizar. A cristalização dificulta o manuseio do mel de modo geral, desde as máquinas de envase até o momento de servir para consumo (LÍRIO, 2010).

De acordo com Coutinho (2006), a adulteração é bastante comum e notada desde o acréscimo de soluções açucaradas até a utilização de adoçantes artificiais, como por exemplo: o xarope de milho, xarope de açúcar, xarope de açúcar invertido de beterraba e cana de açúcar e amido.

Já a fermentação é uma alteração do mel que contribui para a sua desvalorização comercial, originando-se pela presença de leveduras que, por manuseio incorreto, podem se misturar ao mel, sendo comum em méis coletados anteriormente ao amadurecimento e possui grande teor de umidade. A ocorrência de fermentação dependerá do ambiente em que o mel é conservado. Sendo assim, o tratamento mais utilizado é a pasteurização a uma temperatura inferior a 71°C e armazená-lo em recipientes herméticos. Méis que tem umidade inferior a 17% não fermentam, porém, os méis que possuem umidade entre 17-20% são favoráveis a instituição da fermentação decorrente da carga microbiana (SERRANO, et al. 1994).

A centrifugação pulveriza micropartículas do mel, fato que contribui para fermentação uma vez que possibilita a absorção de água pela formação de uma enorme superfície em relação ao volume, segundo Pereira et al. (2008) e Souza et al. (2003), se esse processo ocorrer em um local de alta umidade, também poderá elevar o teor de água do mel, por isso há a necessidade de aderir aos cuidados regulamentados para com a manipulação do mel e entregar um produto de boa qualidade ao consumir final.

2.4 Atividade antimicrobiana do mel

Como já mencionado, os méis são produtos animais com grande concentração de elementos químicos com atividade biológica significativa, suas propriedades ou funções terapêuticas são conhecidas desde muito tempo e sendo utilizados por várias civilizações, com propósito analgésico de várias enfermidades. Estudos a partir de conhecimentos empíricos e equipamentos avançados vem se aprimorando a fim de direcionar pesquisas sobre esses metabólitos, com presunção de alto potencial medicinal, fundamentalmente focadas em desempenhar ações farmacológicas contra microrganismos patogênicos, destacando como principais agentes as bactérias e fungos etiológicos (RAOA, KRISHNANA & GAN, 2016).

Determinados estudos detalham a atividade antimicrobiana dos méis a certas substâncias aduzindo o peróxido de hidrogênio (PH), metilglioxal (MGO), hidroximetilfurfural (HMF), ácidos fenólicos, flavonóides e defensinas, sendo os principais

agentes antibacteriano e antifúngico. Este último é evidenciado nas bibliografias como de menor eficácia, devido sobretudo pelo início de ação demorado (Pinheiro et al., 2018).

Uma das principais características para a atividade antimicrobiana do mel é a reação enzimática glicose-oxidase com a produção de ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Contudo, elevada pressão osmótica, baixa atividade de água, baixo pH, meio ácido, baixo conteúdo proteico, baixo potencial redox devido ao alto teor de açúcares redutores e viscosidade limitam a solubilidade do oxigênio, também inibem o crescimento de microrganismos. (GÓIS, et. al. 2013).

É sabido que o real mecanismo de ação para os méis apresentarem a atividade antimicrobiana, não está completamente exposto, então, propõe-se relação ao alto grau de osmolaridade, viscosidade, acidez, baixa atividade de água, conteúdo proteico, alto teor de açúcares redutores e o alto conteúdo de inibidores. Ainda há referência da vasta variedade de enzimas que são encontradas nos méis, dentre elas, peroxidase, catalase, inulase, diástase, fosfatase ácida, amilase, lipase e α -glicosidase, podendo estas estarem relacionadas a atividade antimicrobiana (GONÇALVES, FILHO & MENEZES, 2005).

Segundo Nasir et. al. (2010), espectro de ação do mel é bem grande, existindo na bibliografia um número amplo de bactérias patogênicas com características morfológicas e fisiológicas bem diferentes que apresentam vulnerabilidade ao mel. Possui função bacteriostática e bactericida em bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e em fungos (MANDAL, et al., 2010).

A ação antibacteriana do mel é tem também eficácia em estirpes bacterianas resistentes e multi-resistentes. Segundo Cooper et al., (2000) retratou a suscetibilidade de 20 estirpes bacterianas de *Burkholderia cepacia* ao mel Manuka; os valores de MIC obtidos para as várias estirpes foram diversos. O mel Manuka apresenta uma alta eficácia em estirpes de *S. aureus* resistentes à meticilina e oxacilina (ORSA) e Enterococci resistentes à vancomicina (VRE) (MANDAL, et al., 2010; JENKINS, et al., 2012).

Segundo Jenkins et al., (2012), um dado interessante é a possível sinergia entre os antibióticos e o mel. O autor verificou que o tratamento com o mel Manuka aumentava a suscetibilidade de MRSA à oxacilina. Muitas estirpes de *P. aeruginosa* multirresistentes e Actinos bactérias foram retiradas de queimaduras e foram testadas em relação à sua suscetibilidade ao mel, foram classificadas como suscetíveis (GLASSER, et al., 2012).

2.5 Tipos de contaminação

As fontes primárias de contaminação microbiana no mel são aquelas anteriores a colheita, sendo bem mais difíceis de controlar, como por exemplo, o pólen, aparelho digestivo das abelhas, solo, pó e néctar. As fontes secundárias de contaminação, que podem ocorrer após a colheita, incluem os manipuladores, manejo incorreto, contaminação cruzada, equipamentos e instalações mal higienizados, locais inapropriados pela incidência do vento, presença de insetos ou animais domésticos (SILVA, et. al. 2008).

2.5.1 Contaminação química

Os principais perigos químicos na produção do mel se relacionam a tratamento das abelhas com fármacos, na produção no campo e as possíveis contaminações resultantes de resíduos químicos utilizados para higienizar utensílios e equipamentos nas casas do mel. Ainda havendo a possibilidade de contaminação por defensivos agrícolas e por constituintes físicos como areia, partes do corpo de abelhas, pedaços da vegetação, farpas de madeiras, dentre outros, os antibióticos, pesticidas e metais pesados são os mais perigosos à saúde pública (SEBRAE NACIONAL, 2009).

2.5.2 Contaminação microbiológica

A contaminação microbiológica tem sua origem, principalmente, pela microbiota da própria abelha, como também pode ocorrer a contaminação pela falta de higiene na extração, além das variáveis como que cercam o manejo do mel, como o pólen, néctar floral, poeira, terra, o próprio corpo e trato digestivo das abelhas. Os bolores mais fáceis de serem encontrados são os do gênero *Penicillium*, *Mucor* e *Aspergillus* são nocivos por produzirem metabólitos tóxicos. Esses microrganismos não reproduzem no mel, logo, caso tenha uma contagem elevada de, por exemplo, *Bettysaalvei*, *Acosphaeraapis* e *Acosphaera major*, indica uma contaminação recente pelo ambiente de manuseio da extração de mel (PEREIRA, 2008).

2.6 Alguns microorganismos

2.6.1 *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*

As bactérias *S. aureus* são cocos anaeróbios facultativos, sendo capazes de crescer num ambiente contendo uma alta concentração de sal (por exemplo, 10% (p/v) de cloreto de sódio) a temperaturas entre 18 e 40 ° C. Reagindo positivamente à coloração de Gram e não são produtores de endósporos. Em aspectos de caracterização bioquímica, a pesquisa da enzima catalase e coagulase são os dois testes mais importantes para esse grupo, sendo o *S. aureus* positivo para os dois testes. O gênero *Staphylococcus* inclui 35 espécies e 17 subespécies, muitos dos quais fazem parte da microbiota humana (MURRAY, et al., 2005).

O *S. epidermidis*, a segunda espécie do gênero *Staphylococcus* testado no presente trabalho, é uma bactéria gram-positiva oportunista encontrada comumente na pele e que, atualmente, também já apresenta resistência a antibióticos.

2.6.2. *Pseudomonas aeruginosa*

As bactérias *Pseudomonas aeruginosa* são minúsculos bacilos Gram-negativos retos ou ligeiramente curvados e encapsulados. Embora sejam definidos como aeróbios restritos, podendo crescer em condições de anaerobiose diante de nitrato de arginina. Algumas delas adquirem um aspeto mucoide resultado da grande quantidade de polissacarídeos capsulares e podem produzir pigmentos (MURRAY, et al., 2005).

Segundo explica Murray (2005), inúmeras infecções como endocardites, foliculites, meningites, pneumonia, infecções do trato urinário e/ou intestinal e feridas da pele (sobretudo em queimaduras) estão associadas à colonização por *P. aeruginosa*. Associados as consequências destas infecções estão os inúmeros fatores de virulência produzidos por *P. aeruginosa*.

O desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos por *P. aeruginosa* se trata de alto índice preocupação e estudos na microbiologia clínica. Variados componentes de resistência foram identificados, no entanto, a mutação das porinas constitui o principal mecanismo. A penetração dos antibióticos para o interior da célula ocorre através dos poros, pelo que a mudança das proteínas que configuram a parede destes poros resulta numa redução da entrada do agente antimicrobiano possibilitando o aparecimento de resistência (MURRAY, et al., 2005).

2.6.3. *Echerichia coli*

A *Echerichia coli* pertence à família das enterobactérias, é um bacilo aeróbio e anaeróbio facultativo com coloração Gran-negativa. É indicador da presença de coliformes fecais em alimentos, pois é de proveniente do contato com fezes humanas ou de animais. Se desenvolve bem em meios de culturas artificiais e forma ácidos na presença de glicose e lactose ((MURRAY, et. al., 2005).

Problemas ocasionados pela ausência de higiene, relacionados à manipulação dos alimentos, são causas principais de contaminação por microrganismos, o mesmo ocorrendo no mel. A bactéria *E. coli* é considerada patogênica, podendo agir no intestino dos seres humanos e dos animais, ocasionando vários transtornos. Nos estudos de Ebrahimi e Lotfalian (2005), foi observada a resistência da *E. coli* no trato digestivo da abelha, mostrando que 77,77%, das 45 cepas estudadas desse microrganismo, demonstraram resistência a um ou mais antibióticos (TESSI et al., 1997).

2.6.4. *Candida Kruzei*

O gênero *Candida* é composto por leveduras que fazem parte da microbiota endógena do corpo humano que podem se tornar patógenas quando estão sob condições favoráveis no hospedeiro, como condições ambientais favoráveis, especialmente em climas quentes e úmidos, e quando as defesas imunitárias estão debilitadas (CAVALCANTI et al. 2011; ALMEIDA et al. 2011). Dentre as espécies do gênero, destacam-se a *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, e a *Candida kruzei*, todas com capacidades para promover infecções em pacientes com sistema imunológico comprometido. Atualmente, devido ao fenômeno crescente da resistência aos antifúngicos, destacando o fluconazol e a nistatina, devido a facilidade de aquisição nas farmácias, há a necessidade de pesquisa sobre novos antifúngicos, sendo uma das propostas do presente trabalho averiguar a eficácia antifúngica do mel frente a *Candida kruzei* (MENEZES et al. 2012; DOI et al. 2016).

3. NANOPARTÍCULA DE PRATA

Na atualidade, várias pesquisas tratam da obtenção de nanopartículas metálicas devido as suas propriedades únicas. Sendo utilizadas em catálises, sensores tecnológicos, diagnóstico e tratamento de doenças, dentre outros usos. Geralmente, sua fabricação se desenvolve por

meios físicos ou químicos a partir de metais nobres, envolvendo equipamentos caros, várias etapas e com geração de subprodutos tóxicos. Por estas razões, a efetivação de técnicas mais simples, baratas e sem prejudicar o meio ambiente é bastante atraente (JAMKHANDE, et al, 2019)

Dentre as várias nanopartículas metálicas, as nanopartículas de prata estão ganhando maior foco em todo o mundo. A atividade bactericida da prata é um conhecimento já estabelecido e está sendo profundamente discutido. Similar à prata não nano (macroscópica), as nanopartículas de prata também possuem a característica de inibir o crescimento de microrganismos. Contudo, a prata da forma nano realiza uma atividade antimicrobiana mais elevada em comparação com a sua contraparte macroscópica. Ademais, as nanopartículas de prata mostram melhores propriedades antioxidantes e anticancerígenas com potencialidade de se desenvolverem como novos agentes terapêuticos. (LAKSHMANAN, SATHIYASEELAN e KALAICHELVAN, 2018)

A prata metálica é inativa, mas reage com a umidade na pele e fluidos corporais, e se torna ionizada. O íon de prata é bastante reativo e pode se ligar a componentes celulares de microrganismos, acarretando mudanças estruturais na parede celular ou na membrana do núcleo e, como consequência, à morte. (BEHRAVAN, PANAHI e NAGHIZADEH, et al, 2018)

O efeito antimicrobiano da prata é reconhecido desde a antiguidade, já era aproveitada no tratamento de queimaduras e como agente quimioterápico contra patologias ocasionadas por bactérias, como a *Staphylococcus aureus*. Depois do descobrimento da penicilina, o uso da prata como agente bactericida teve uma considerável diminuição, mas com a seleção de cepas resistentes a antibióticos, a prata retornou ao interesse na comunidade científica em decorrência do desenvolvimento de novos antimicrobianos (CHOPRA, 2007; ANTUNES et al., 2013).

A prata em seu estado metálico é inerte, no entanto, quando entra em contato com a pele úmida das feridas, se ioniza ficando amplamente reativa, demonstrando alta propriedade antimicrobiana visto que se liga a proteínas, causando alterações estruturais na parede celular bacteriana e na membrana nuclear ocasionando à morte celular. Outro mecanismo de ação descrito se deve à possibilidade da prata ionizada fazer ligação ao material genético bacteriano e inibir sua replicação (LANDSDOWN, 2002).

As nanopartículas de prata também possuem grande atividade antimicrobiana, por diversas vezes sendo mais eficientes do que os íons de prata, em razão da área de superfície grande, que garante um melhor contato com os microrganismos (LANDSDOWN, 2002).

As propriedades das nanopartículas, como tamanho, forma e fases, estão intrinsecamente relacionadas aos seus métodos de síntese. Uma variedade de metodologias químicas e físicas são utilizadas para a síntese de nanopartículas de prata. Os métodos químicos envolvem redução, técnicas eletroquímicas, pirólise e assistidos por irradiação, porém, muitas vezes, envolvem agentes e subprodutos tóxicos. Os métodos físicos, como ablação a laser, moagem de bolas e deposição física de vapor (PVD) não envolvem produtos tóxicos, são mais rápido, entretanto exigem uma grande demanda de energia.

4.ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL ASSOCIADA AS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

Muitos extratos naturais estão sendo colocados na síntese verde de nanopartículas metálicas devido ao seu poder redutor. O extrato de própolis vem sendo observado como uma excelente alternativa, já que por si só possui propriedades medicinais: bactericida, anti-inflamatório, antiviral, antimicrobiano, antioxidante, anestésico, antitumoral, anticancerígeno e antifúngico. A seiva de sangue também apresenta propriedades antioxidantes, cicatrizantes e anti-inflamatórias. Por esta razão, demonstram alternativas promissoras em aplicações em biomateriais. (POBIEGA, KRASNIEWSKA, GNIEWOSZ, 2019)

O mecanismo de ação das nanopartículas de prata ainda não está bem ilustrado, porém, estudos vem revelando que a liberação dos íons metálicos presentes na superfície das AgNPs reage com os grupos tiol e sulfidril presentes nas proteínas, reduzindo a permeabilidade da membrana, podendo provocar a morte celular (ANDRADE, 2013).

A combinação da ciência dos materiais e da nanomedicina vem dando resultado no surgimento de campos alternativos que envolvem a funcionalização de nanoestruturas com vários materiais ativos. Pesquisas relacionadas às atividades antibacterianas de nano materiais funcionalizados com biomoléculas terapeuticamente ativas são raras (ANDRADE, 2013).

Compostos bioativos, como alcaloides, fenóis, taninos, terpenóides, aminoácidos e proteínas, achados em produtos naturais, auxiliam na redução de íons Ag em AgNPs. Assim,

essas substâncias funcionam como agentes redutores, reagindo com o metal iônico e reduzindo o seu nox para zero. Por consequência, os íons metálicos se agregam e geram as nanopartículas metálicas. Por algumas vezes, os biocompostos podem criar uma camada estabilizante por volta das nanopartículas, evitando que fiquem agregadas (SOUZA, SOUZA e FRANCHI, 2019).

Uma das principais vantagens de utilização de extratos naturais para síntese de nanopartículas de prata é fácil acesso. Plantas geralmente são seguras e não tóxicas, reduzindo os íons de prata. Os métodos de síntese de AgNP baseados em plantas e seus extratos são não patogênicos, simplificados, envolvendo somente uma única etapa e, com maior potencial de biorredução, se comparado aos filtrados microbianos. Podendo serem produzidos utilizando toda a planta ou seu extrato, entretanto, a disponibilidade do agente redutor é mais concentrada no extrato do que na planta inteira. Assim, a maioria dos estudos tem se concentrado no uso de extratos vegetais como no caso do extrato de própoles (SOUZA, SOUZA e FRANCHI, 2019).

5. MATERIEL E MÉTODOS

5.1. Local

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Estudos Bioquímicos e Químicos do Núcleo Tecnológico de Bioativos e no Laboratório de Microbiologia, ambos da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), campus Santarém - e, em laboratórios parceiros da Universidade Federal do Oeste Pará.

5.2. Descrição das Amostras

Foram coletadas um total de 36 amostras de mel de abelha *Apis mellífera* e de *Melipona sp.*, por meio de extração manual sem uso de fumigação ou qualquer produto químico, em 7 cidades próximas a Santarém-PA, Brasil, no ano de 2019, conforme detalhado na Tabela 1. As amostras foram armazenadas em tubos Falcon® a temperatura ambiente para posteriores análises.

Tabela 1. Especificações das amostras de mel em estudo, destacando-se a espécie produtora e a cidade de procedência.

Amostras	Espécie	Procedência
A1, A2, A3, A4, A5, A6, A8, A16, A17, A20, A24, A26,A7	<i>Melipona sp.</i>	Óbidos
A9, A10, A11, A12, A13	<i>Melipona sp.</i>	Juruti
A15, A18	<i>Apis mellífera</i>	Aveiro
A14, A19	<i>Apis mellífera</i>	Castelo dos Sonhos
A21, A22, A23, A24, A27, A28, A29, A30, A31, A32, A33, A34, A35, A36	<i>Apis mellífera</i>	Alenquer
A25	<i>Apis mellífera</i>	Santarém

5.3. Avaliação estatística

Para a análise do perfil de resistência antimicrobiana apresentam-se os valores de halos em milímetros. E para a atividade antimicrobiana do mel, as médias dos halos de inibição foram agrupadas com o seu respectivo desvio padrão.

5.4. Avaliação físico-química

Para a avaliação físico-químicas e bioquímicas nos méis, foi realizado a aferição do pH, teor de açúcares redutores (%), umidade (%), teor de sólidos solúveis (°Brix), compostos fenólicos totais (mgGA100g⁻¹) e atividade antioxidante (% de Inibição DPPH). As amostras foram analisadas em triplicata em cada um dos procedimentos realizados e posteriormente foram comparados com os valores estabelecidos pela legislação brasileira vigente que contempla o regulamento técnico de identidade e qualidade do mel (BRASIL, 2000).

5.5. Avaliação antimicrobiana

Os microrganismos teste utilizados nos ensaios antimicrobianos foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida kruzei* (CEFAR®, São Paulo, Brazil). As cepas foram mantidas em meio Nutriente estéril (NM – 3,0 g de peptona bacteriológica, 5,0 g de

extrato de carne, 5,0 g NaCl em 1000 mL de solução aquosa, pH inicial 7,2 - 7,4 até a preparação das suspensões utilizadas nos ensaios.

Para a realização dos testes de atividade antimicrobiana *in vitro* foi utilizado o método de difusão em poço. Uma alíquota de 100 µL de cada suspensão dos microrganismos foi ajustada a 0,5 da Escala de McFarland, correspondendo a 10^8 UFC mL⁻¹ de bactéria e semeada em placas de Petri estéreis contendo Ágar Mueller-Hinton (MHA - Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) com o auxílio de swab estéril. Foram confeccionados orifícios de 6 mm de diâmetro no meio de cultura MHA com o auxílio de um molde formando os poços. Posteriormente cada orifício foi preenchido com 100 µL de mel *in natura*. O material foi incubado a 35 °C por 24 h. Para o ensaio com a *C. kruszei*, utilizou-se o meio Sabouroud dextrose (SDA). O controle negativo foi feito em poços com solução de glicose diluída em água deionizada à 65% (w/v). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os halos de inibição do crescimento microbiano foram medidos em milímetros. As placas foram incubadas à 35 °C por 48 horas até a leitura dos halos de inibição, com o auxílio de uma régua, sendo possível determinar através dos halos inibitórios, se a amostra de mel em questão tem alguma atividade antimicrobiana, seja bacteriostática, bactericida ou sem efeito contra o microrganismo teste.

5.6. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A Concentração Inibitória Mínima é um método quantitativo onde se observa a reação entre a concentração padronizada de um inóculo e o menor valor de concentração da substância em teste necessária para impedir o crescimento do microrganismo. Para este teste foram utilizadas placas de poliestireno com 96 poços, utilizando-se da técnica de microdiluição em caldo (TAVEIRA et al., 2010). As amostras não diluídas foram adicionadas no primeiro poço, seguindo-se uma diluição seriada com água deionizada nos demais poços para se obter o mel em diferentes concentrações: 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 e 0,78% (v/v), ficando a solução com volume final de 100 µL. Posteriormente, para a determinação do CMI, foram adicionados aos poços 100 µL de caldo Mueller Hinton Broth (MHB - Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e uma alíquota de 10 µL de cada suspensão bacteriana correspondendo a 10⁸ UFC/mL de bactéria (BLAIR et al., 2009). Como corante químico foi utilizado 15 µL de solução resazurina (0,01%). O controle negativo foi realizado com caldo MHB e o controle positivo com 100 µL do antibiótico Ampicilina (100 µg/mL). O controle osmótico foi feito com a substituição das amostras de mel por solução de glicose e água

deionizada em diferentes concentrações: 65,00, 32,50, 16,25, 8,12, 4,06, 2,03, 1,02 e 0,51% (w/v). Todas as placas foram incubadas à 35 °C por 24 horas. A CMI foi considerada como a menor concentração das amostras de mel capaz de inibir o crescimento bacteriano.

5.7. Amostras de méis utilizadas na Síntese Verde de nanopartículas de prata (AgNPs)

A partir dos resultados anteriores que mostraram efeitos satisfatórios na atividade antimicrobiana das amostras dos méis 8, 9, 10 e 25 testados contra microrganismos patogênicos e levando em consideração a disponibilidade de amostras, optou-se também por explorá-los na produção de AgNPs. Para isso, a Tabela 2 resume a nomenclatura dada para descrever as amostras contendo AgNPs formadas a partir de diferentes méis de abelha

Tabela 2: Nomenclatura das AgNPs produzidas.

Amostra de mel	Nome da amostra de AgNPs
Mel 8	AgNPs-8
Mel 9	AgNPs-9
Mel 10	AgNPs-10
Mel 25	AgNPs-25

5.8. Síntese verde de AgNPs

A síntese verde de AgNPs foi realizada no Laboratório de Fisiologia com base nos protocolos de Obot et al. (2013) e Al-Brahim& Mohammed (2019). Para isso, foi preparada uma solução aquosa 2 mM de nitrato de prata (AgNO_3) que corresponde a aproximadamente 340 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e esta foi adicionada em tubos de ensaio de vidro contendo amostras distintas de mel (5%) atingindo um volume final de 10 mL que foi ajustado com água ultrapura; além disso, foram preparados controles experimentais contendo somente a solução aquosa de AgNO_3 a 2 mM ou a solução de mel no mesmo volume final das amostras de AgNPs.

Posteriormente, dois métodos de obtenção das AgNPs foram testados utilizando fontes de energia diferentes: (1) sob luz solar onde as reações foram conduzidas por meio de exposição direta à radiação nos tubos de ensaio por 120 minutos e (2) em banho-maria (marca, modelo, ano) com controle de temperatura de 50°C por 120 minutos com os tubos de ensaio cobertos com papel alumínio para minimizar a evaporação e foto-oxidação da prata e

no decorrer do período de biossíntese, as mudanças de coloração nos meios reacionais foram monitoradas e registradas.

5.9. Caracterização das AgNPs produzidas com mel de abelha

5.9.1. Espectroscopia de UV/Vis

As cinéticas de formação das AgNPs foram avaliadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm no tempo inicial de síntese e a cada 30 minutos de reação. Adicionalmente, após o término das reações, foram realizadas leituras espectrofotométricas para a construção de curvas de absorção na faixa entre 350 a 500 nm para todas as amostras e os controles experimentais no intuito de conhecer os picos máximos de absorção das AgNPs potencialmente formadas.

5.9.2. Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial Zeta

O equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) foi usado para medir o tamanho (diâmetro hidrodinâmico médio), o índice de polidispersidade (PdI) e o potencial Zeta de superfície (carga elétrica de partículas) no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (IB/UnB). Para as análises, alíquotas de 100 μL de cada amostra de AgNPs foram diluídas em 900 μL de água ultrapura e, em seguida, depositada em uma cubeta de poliestireno contendo eletrodo que foi inserida no aparelho e submetida, após 120 segundos de estabilização, a 10 execuções em triplicata com um ângulo de espalhamento de 173° e uma temperatura de 25°C . Os resultados consistem no valor médio das três repetições \pm desvio padrão da média.

5.9.3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As AgNPs foram submetidas às análises de MET para identificação da morfologia. Em suma, 10 μL de cada amostra de AgNPs foram depositadas em uma tela recoberta por película de Formvar/carbono e posicionadas sob papel filtro dentro de placas de Petri que foram levadas à estufa a 60°C por 20 minutos para facilitar a secagem. Após esse tempo e o resfriamento das telas, as imagens foram adquiridas em um microscópio eletrônico de transmissão (Tecnai 12 - FEI 120 kV), no Instituto de Estudos Avançados do Mar na Unesp (IEAMar/UNESP, SP).

5.10. Concentração Inibitória Mínima (CIM) das AgNPs

A determinação das CIM e CBM foi realizada em duplicata por ensaios de microdiluição em microplacas de 96 poços (Corning®), conforme padronização do Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2015) contra *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida kruzei*, no Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL), na cidade de Londrina/PR. Foram adotados valores de CIM90, ou seja, os valores das concentrações eram capazes de inibir 90% da população bacteriana. Diferentes concentrações das AgNPs serão testadas. Colônias bacterianas, crescidas durante 18-24 h em ágar Mueller-Hinton (MH) (Difco®), serão diluídas em solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada e a concentração de bactérias ajustada na escala 0,5 de McFarland, que corresponde a $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL. As suspensões bacterianas foram diluídas em caldo MH (Difco®), colocadas em microplacas de 96 poços a uma concentração de aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC/mL. Como controle de crescimento foi adicionado apenas meio de cultura e bactéria (sem AgNPs). As microplacas foram incubadas a 37°C durante 18 h e, em seguida, a leitura foi realizada por meio da turbidez apresentada. A CIM corresponde à menor concentração das AgNPs em que não houve crescimento bacteriano visível (turbidez).

Para realizar a microdiluição em caldo, foram colocados 50 µL de MH caldo em todos os poços de uma placa de poliestireno com 96 poços. Posteriormente, colocou-se 50 µL das AgNPs no primeiro poço da placa, totalizando 100 µL. 50 µL dessa solução foi coletada e colocada no próximo poço e sucessivamente em todos os poços, realizando assim uma diluição seriada. A salina com as bactérias foi diluída à concentração de 1×10^6 UFC/mL em MH caldo (DIFCO) e 50 µL dessa solução bacteriana foi colocada em cada poço, completando assim a diluição das AgNPs.

As placas foram incubadas à 37°C por 18 a 24 horas em estufa bacteriológica e todos os testes foram feitos em triplicatas com controle positivo (apenas bactérias) e controle negativo (apenas meio de cultura). A CBM foi considerada quando ocorreu quantidade de morte bacteriana de $\geq 99,9\%$ em 24 horas de tratamento. Todos esses ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir da identificação da reação enzimática glicose-oxidase e do peróxido de hidrogênio, produto desinfetante obtido a partir do processo de conversão da D-glicose em ácido D-glicônico, resultantes dos processos e reações naturais, o mel tem outros fatores físicos importantíssimos para essa atividade antimicrobiana, tais como o seu meio ácido, que inibe crescimento de patógenos, seu baixo potencial redox devido ao alto teor de açúcares redutores, por ser rico em açúcares é um a solução hipersaturada de baixa osmolaridade, consequentemente tem uma elevada pressão osmótica, com baixo teor de água e alta viscosidade, o que dificulta o crescimento bacteriano e qualquer solubilidade, inclusive de oxigênio, fatores esses que expandiram o entendimento sobre a atividade antimicrobiana do mel (GÓIS, 2013; TRIPOLI & LIMA, 2014).

Estão sumarizados na Tabela 3 abaixo os resultados dos exames físico-químicos e bioquímicos das amostras, respectivamente enumeradas, na seguinte sequência de exames: atividade antioxidante (% de Inibição DPPH), compostos fenólicos totais (mgGA100g⁻¹), teor de açúcares redutores (%), pH, teor de sólidos solúveis (°Brix) e umidade (%).

Tabela 3. Resultados dos exames físico-químicos e bioquímicos citados acima para cada amostra de mel, respectivamente enumerada.

Amostras	DPPH	Comp. Fenólicos	Açúcar Redutor	pH	°Brix	Umidade
A1	58,74 ± 4,38	41,40 ± 1,20	42,02 ± 1,14	4,13 ± 0,01	77	20,7
A2	56,00 ± 5,05	40,62±0,87	38,59 ± 2,67	4,04±0,02	77,5	20,4
A3	51,90 ± 6,32	40,20±0,90	50,54 ± 10,54	3,78±0,03	72	26,1
A4	78,57 ± 1,28	41,40 ± 1,25	53,62 ± 1,28	3,84 ± 0,02	72,4	26
A5	45,37 ± 2,41	98,34 ± 1,88	33,74±4,18	3,45 ± 0,01	67,5	>30
A6	47,73 ± 4,32	101,92 ± 1,65	59,42 ± 12,53	2,61 ± 0,01	73,4	25
A7	56,23 ± 2,97	41,50 ± 0,13	15,96±1,74	3,41 ± 0,01	69	>30
A8	76,35 ± 1,12	35,17 ± 1,68	37,29 ± 3,69	3,05 ± 0,04	72	26,1
A9	59,26 ± 2,55	50,59 ± 4,16	58,00 ± 0,54	3,08 ± 0,01	71	27
A10	80,41 ± 2,57	32,70 ± 5,56	49,83 ±8,41	3,06 ± 0,01	69	>27
A11	73,23 ± 0,42	42,82 ± 3,23	28,88 ± 6,44	3,00 ± 0,03	70,6	>27
A12	77,05 ± 1,47	65,10 ± 0,82	36,70 ± 6,89	3,76 ± 0,01	69	>27
A13	68,79 ± 0,22	33,78 ± 2,84	46,88 ± 1,07	2,91 ± 0,02	70,6	>27
A14	39,66 ± 4,31	98,64 ± 1,59	30,02±4,02	3,27±0,01	72,5	25,5
A15	72,00 ± 1,55	44,40 ± 0,78	33,11 ± 1,08	4,07 ± 0,02	72,9	25,2
A16	66,95 ± 1,22	43,42±2,57	56,34 ± 15,60	3,33 ± 0,02	71,6	26,2
A17	83,24 ± 2,63	39,95 ± 0,25	81,91 ± 6,41	3,63±0,04	75	23,3
A18	55,86 ± 5,73	46,64 ± 1,00	40,01 ± 2,36	3,76 ± 0,01	70,5	>27
A19	39,71 ± 2,62	103,25 ± 0,47	31,10±3,74	3,15±0,03	70,5	>27
A20	75,78 ± 2,96	99,15 ± 3,29	5,20±2,17	3,10 ±0,10	71,3	26,3
A21	50,00 ± 3,19	41,03 ± 0,99	36,42±3,17	3,02±0,05	67,5	>30

A22	75,97 ± 0,64	108,59 ± 11,70	44,10±3,15	3,72±0,01	73,2	>27
A23	47,88 ± 3,41	40,06 ± 0,49	52,30±11,10	3,23±0,02	70,2	25,7
A24	72,05 ± 3,75	109,47 ± 11,86	53,74 ± 3,20	3,41 ± 0,04	77,9	20,3
A25	81,11±1,64	44,43 ± 0,33	75,46 ± 4,82	3,58 ± 0,02	78	19,2
A26	53,68 ± 4,01	41,40 ± 1,20	44,39 ± 19,38	4,13 ± 0,02	77,5	20,5
A27	74,98 ± 2,40	51,22±1,75	44,15 ± 3,10	3,55±0,02	77	21,2
A28	73,09 ± 3,19	49,81±1,18	45,42±2,36	3,61±0,03	77,1	21,1
A29	61,30 ± 2,43	44,48±2,23	48,89±3,57	3,48±0,01	78	20,3
A30	29,97±5,22	16,25±2,41	26,40 ± 1,68	3,50±0,04	78	20,3
A31	77,67 ± 2,22	56,32±1,95	46,05 ± 0,54	3,49±0,02	74	21,2
A32	61,90 ± 2,69	48,62±1,80	42,61 ± 3,42	3,52±0,01	77,4	21,2
A33	81,11 ± 1,08	59,33±2,34	45,18±1,93	3,62±0,02	77,5	21,1
A34	22,50±11,39	14,10±1,18	28,29 ± 0,89	3,56±0,03	77,4	21,2
A35	69,83 ± 3,32	57,12±1,90	62,03 ± 5,17	3,53 ± 0,01	77	21,2
A36	62,01±1,74	56,22±4,84	67,47 ± 5,51	3,95±0,03	80,1	18,3

A partir dos resultados acima, podemos verificar, primeiramente, sobre a atividade antioxidante em porcentagem a partir da inibição do radical DPPH, a variação de 83,24% ± 2,63 a 39,66% ± 4,31, sendo valores semelhantes ao de Gomes et al. (2016), que obteve variações de 24.26% ± 0.54 a 64.63% ± 1.01 a partir do mel de *M. subnitida*.

A avaliação do teor de compostos fenólicos totais apresentou valores entre 32,70 mg GA.100g⁻¹ ± 5,56 e 109,47 mg GA.100g⁻¹ ± 11,86. De acordo com Rosso (2005), os compostos fenólicos encontrados no mel também apresentam propriedades antioxidantes, podendo citar, especialmente, os ácidos fenólicos, flavonoides e tocoferóis, que realizam a captura de radicais livres, como operoxil (OLIVEIRA et al., 2012). Diferentemente dos resultados obtidos acima, a pesquisa de Montenegro (2018) demonstrou os compostos fenólicos para méis de *T. angustula* a partir de 514.00 mgEAG 100g⁻¹ ± 130.66 e Silva (2011) obteve valores de 1.1 a 1.3 mg GAE.g⁻¹ para méis de *M. subnitida*.

Os valores obtidos neste trabalho para os teores de açúcares redutores foram entre 26,40% ± 1,68 e 81,91% ± 6,41, havendo uma grande variação nas %, sugestivo de erros laboratoriais ou por adulteração do produto por adição de sacarose, uma vez que a legislação brasileira considera o valor mínimo de 65% de teores de açúcares redutores para méis florais. Contrariamente, Villas-Bôas e Malaspina (2005) sugerem que, para méis de meliponíneos brasileiros, o mínimo para o teor de açúcares redutores seria de 50%.

As amostras analisadas apresentaram valores de pH ácidos, variando de 2,61 ± 0,01 a 4,13 ± 0,02, levando em consideração à presença de ácidos orgânicos presentes no mel, pela influência das substâncias mandibulares das abelhas em conjunto do pH do néctar ou solo (CAMPOS et al., 2010). Apesar desses fatores contribuintes, Saxena et al. (2010) aborda que independente de sua origem botânica do mel, seu pH será naturalmente ácido entre 3,2 e 4,5,

bem como Bandeira (2016) verificou o pH de amostras de mel de *Apis Mellifera* comercializadas no oeste do Pará entre 3,65 e 4,32 e Carvalho et al. (2005) complementa afirmando que valores de pH fora destes valores, pode indicar a ocorrência de fermentação ou adulteração do mel.

Quanto a análise para o teor de sólidos solúveis (°Brix), que indica a quantidade dos sólidos dissolvidos na água de um alimento, os valores encontrados variaram de 67.50 a 77.50 °Brix, não havendo um parâmetro na legislação brasileira para uma média padrão, e, no caso do mel, os sólidos solubilizados são majoritariamente açúcares, como a frutose e glicose. A pesquisa de Campos et al. (2010) também teve como resultado teores de sólidos entre 73.27 e 72.35 °Brix para méis de *M. scutellares*.

Em relação ao teor de umidade, os valores obtidos variaram de 19,20% a 30%, sendo que apenas 5,5% das amostras estão dentro da referência máxima permitida pela legislação brasileira, que é de 20% de umidade (BRASIL, 2000). Porém, há trabalhos que defendem e confirmam que méis de meliponíneos costumam sim apresentar porcentagens mais altas de umidade, como Nascimento (2014) que obteve valores entre 25.99% a 36.89% e Villas-Bôase Malaspina (2005) considerando méis provenientes de abelhas nativas brasileiras até 35%.

Estão sumarizados na Tabela 4 os resultados obtidos nos ensaios de atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em poços, para as amostras de mel produzidas pelas espécies de abelhas nativas sem ferrão *Apis mellifera* e *Melipona sp.* Todas as amostras apresentaram atividade inibitória satisfatória contra pelo menos dois microrganismos testado, sendo que estes mostraram diferentes respostas no ensaio.

Tabela 4. Demonstração da média da atividade antimicrobiana dos méis de abelha, de acordo com a amostra indicada, com formação de halos de inibição contra microrganismos teste listados em colunas e com o resultado dado em milímetros (Nd = sem resultado aferível).

Amostras	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. kruzei</i>
A1	21,7 ± 0,58	23,0 ± 1,0	18,0 ± 0,0	17,3 ± 0,58	Nd
A2	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
A3	Nd	Nd	14,7 ± 0,58	14,0 ± 0,0	18,0 ± 0,0
A4	20,0 ± 0,0	15,7 ± 0,58	14,0 ± 1,0	12,3 ± 0,58	14,7 ± 1,15
A5	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
A6	Nd	Nd	13,3 ± 0,58	14,0 ± 0,0	16,0 ± 0,0
A7	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
A8	15,0 ± 0,0	15,7 ± 0,58	18,0 ± 1,0	15,0 ± 1,0	16,3 ± 1,53
A9	21,1 ± 0,0	17,3 ± 0,58	19,3 ± 0,58	20,0 ± 0,0	23,3 ± 0,58
A10	19,7 ± 0,58	15,0 ± 1,0	15,0 ± 0,0	13,0 ± 1,0	21,3 ± 0,58
A11	Nd	Nd	17,0 ± 1,0	13,3 ± 0,58	21,0 ± 0,0
A12	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
A13	Nd	Nd	17,7 ± 0,58	15,0 ± 0,0	22,0 ± 1,0

A14	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
A15	Nd	Nd	14,0 ± 1,0	13,0 ± 1,0	20,7 ± 0,58
A16	Nd	Nd	14,7 ± 0,58	12,0 ± 0,0	15,0 ± 1,0
A17	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
A18	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
A19	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
A20	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
A21	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
A22	16,0 ± 1,0	20,3 ± 0,58	20,0 ± 0,0	20,7 ± 0,58	Nd
A23	Nd	Nd	12,7 ± 0,58	12,0 ± 0,0	16,0 ± 0,0
A24	Nd	Nd	15,0 ± 0,0	15,0 ± 0,0	Nd
A25	15,0 ± 0,0	15,7 ± 0,58	12,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	14,0 ± 0,0
A26	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
A27	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
A28	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
A29	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
A30	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
A31	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
A32	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
A33	12,3 ± 0,58	14,3 ± 0,58	Nd	Nd	Nd
A34	12,3 ± 0,58	15,0 ± 0,0	Nd	Nd	Nd
A35	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
A36	Nd	16,0 ± 0,0	Nd	Nd	Nd

Das amostras testadas, 25% apresentaram atividade antimicrobiana bacteriostática frente a *Staphylococcus aureus*, 27,77% frente a *Staphylococcus epidermidis*, 41,66% contra *Pseudomonas. aeruginosa* e *Escherichia coli*, e 33,33% das amostras apresentaram atividades contra *Candida. Kruzei*. Dados estes semelhantes aos obtidos por Peralta (2010) frente as bactérias, que, em seu estudo, cerca de 90% das amostras de mel tiveram atividade contra *S. aureus* e 30% contra a *E. coli*. Cruz et al. (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana de amostras de méis de abelhas sem ferrão (*Melipona compressipes*, *Melipona seminigra*) e com ferrão *Apis ultirre* coletadas no estado no Amazonas contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Chromobacterium violaceum* e *Candida albicans*. Todas as amostras apresentaram atividade antimicrobiana sobre todos os patógenos testados, em maior ou menor grau.

No presente estudo, a intensidade da atividade antimicrobiana variou, apresentando zonas de inibição entre 12,0 mm e 23,0 mm. A Figura 3 mostra os halos formados pela amostra de mel 09 contra o microrganismo *S. epidermidis*, com média de 17,3mm.

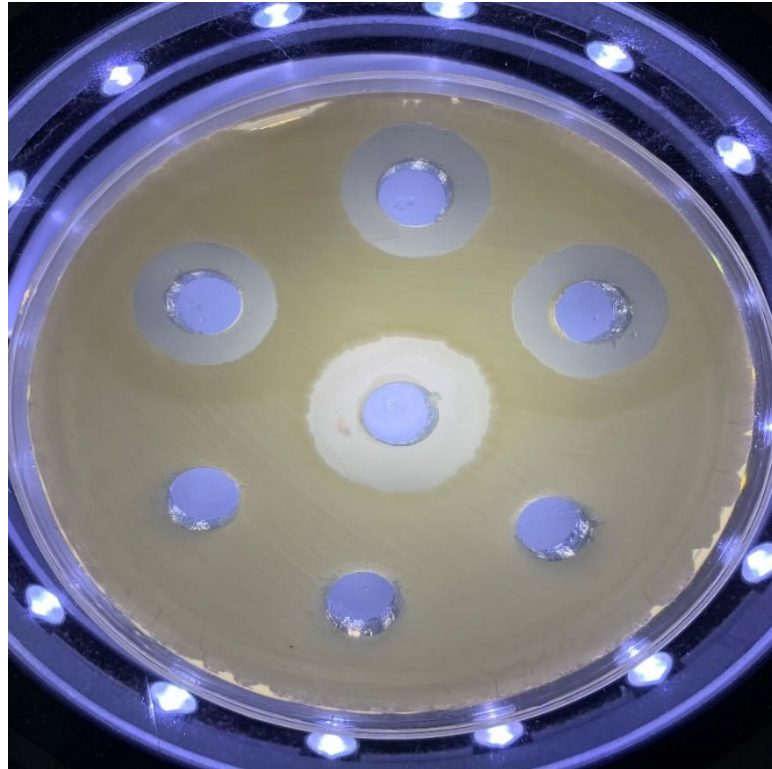


Figura 1: Halos de inibição formados pela amostra de mel 09 contra o microrganismo *S. epidermidis*.

Fonte: Arquivo pessoal.

Outros autores corroboraram a obtenção de sucesso na inibição do crescimento de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, como Serra et al. (2007) analisando amostras de mel de *Apis ulirre* e *Melipona sp.*, Gonçalves et al. (2005), analisando com o mel de *Nannotrigona testaceicornis*, Pimentel et al. (2013), ao realizar testes com o mel de *Melipona Compressipes manaoensis* advindos de Manaus, Ortiz-Vazquez et al. (2007) demonstra a inibição de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas* em fermentos contaminados, todos corroboram a atividade bactericida contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteusvulgaris* e *Klebsiella sp.*e Basualdo et al. (2007) utilizando mel diluído em 50% (v/v) verificou a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*.

A partir do entendimento das variáveis que circundam a formulação do mel percorridos ao logo do trabalho, podemos afirmar que muitos tipos de méis ainda não foram investigados, contudo, dos quais já foram testados, grande parte demonstra eficácia contra bactérias resistentes e fungos, fator que potencializa a importância da constante pesquisa sobre o tema (DASH et al., 2016; CHUTTONG et al., 2016).

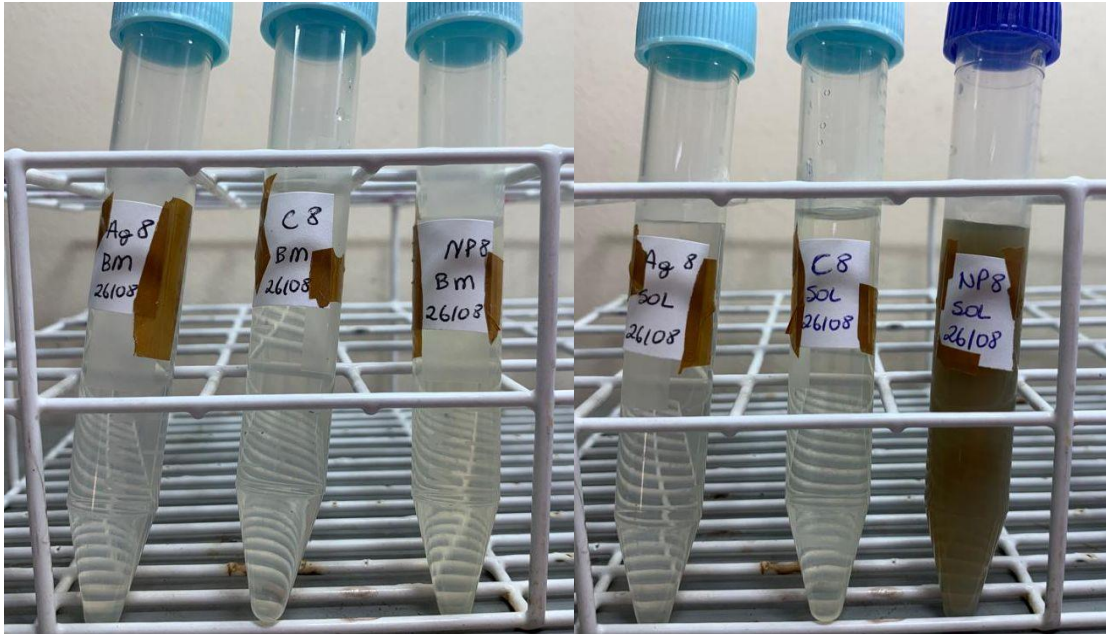


Figura 2. Imagem comparativa das soluções feitas sob as mesmas condições e de mesmo mel, mudando apenas a fonte de energia. Ao lado esquerdo soluções do teste em banho maria e à direita soluções submetidas ao sol. Fonte: Arquivo pessoal.

Os resultados do presente estudo mostraram que a junção do mel de abelha com o nitrato de prata (0,1 mM) proporcionou a coloração final da solução marrom quando exposto ao sol de amarelo no ponto inicial da adição, o que pode indicar a excitação por ressonância plasmônica de AgNPs (Verasamy e outros, 2011). A cor da mistura muda conforme o tempo passa sob a fonte de energia, mantendo-se ao final numa cor marrom.

Por outro lado, a morfologia e o tamanho e o tamanho das AgNPs biogênicas foram investigadas usando imagens SEM e TEM. Em forma de esfera com bordas lisas, por vezes formando alguns aglomerados, AgNPs bem distribuídas foram obtidas por todas as amostras trabalhadas nessa etapa, Hosny et al. (2017) e El-Deeb et al. (2015) encontraram a mesma forma e características para AgNPs preparadas por mel.

Tabela 5. Demonstração dos resultados obtidos para Diâmetro Hidrodinâmico, Índice de polidispersão e do Potencial Zeta (mV).

	Diâmetro hidrodinâmico (DH)	Índice de polidispersão (PdI)	Potencial Zeta (mV)
AgNPs (mel 8 – sol)	547,1 nm ± 105,9	0,814 ± 0,076	-10,5 mV ± 0,404
AgNPs (mel 9 – sol)	260 nm ± 11,48	0,377 ± 0,069	-11,6 mV ± 0,611
AgNPs (mel 10 – banho-maria)	283,8 nm ± 45,76	0,541 ± 0,092	-4,97 mV ± 0,7
AgNPs (mel 25 – banho-maria)	433,3 nm ± 178	0,652 ± 0,248	-4,34 mV ± 0,631

Tabela 6. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) das AgNPs produzidas por diferentes méis de abelha e condições de síntese.

Amostras	CIM / CBM (ug/mL)							
	AgNPs (mel 25 – banho maria)		AgNPs (mel 10 – banho-maria)		AgNPs (mel 8 – sol)		AgNPs (mel 9 – sol)	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	16	21,25	10,54	10,54	10,54	21,25	7,83	10,54
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	21,25	42,5	10,54	42,5	10,54	42,5	10,54	21,25

As nanopartículas de prata exercem essa atividade antimicrobiana de amplo aspecto por se ligar ao grupo tiol -SH da bactéria, bloqueando a transferência de elétrons, bem como a respiração e sistemas de transporte entre a membrana, que por fim resulta na morte celular, tornando-a eficaz no combate de infecções com esses microrganismos presentes em feridas, queimaduras e afins (HOSNY, 2017), além do seu efeito sinérgico com o mel com suas concentrações de ácido glucônico, que preconiza o peróxido de hidrogênio, seu teor de açúcar e compostos fenólicos, como também apresenta Guruvu (2021). A ação antibacteriana das

AgNPs preparadas pelos diferentes méis contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foi encontrada, os diferentes tamanhos de partículas de AgNPs detectados podem ser a principal razão para diferentes capacidades antibacterianas entre o tamanho da partícula e o nível antibacteriano do mel.

A tabela acima demonstra o CIM e CBM de menor resultado a AgNPs do mel 10 e 9 foram as com melhor atividade, testados contra as cepas bacterianas padrão (*E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923)). Apesar dessas duas amostras não terem resultados tão semelhantes em relação ao índice de polidispersão e ao potencial Zeta, ambas tem alto valor de DPPH, composição fenólica média e ao longo dos testes antimicrobianos dos méis *in natura*, as duas obtiveram resultados satisfatórios na formação dos halos de inibição contra os cinco microrganismos trabalhados. Pode-se entender que a adição do nitrato de prata potencializa o efeito antibacteriano do mel, como também comenta Guruvu (2021).

As soluções de AgNPs foram usados ao longo do CIM através do método de microdiluição em caldo e foi registrado como a concentração mais baixa não produzindo crescimento (HOSNY 2017).

Pelos dados de DLS, as amostras 10 e 9 foram as com menor DH e PdI, isso pode estar relacionado à capacidade delas em penetrar na membrana dos microrganismos e promover uma maior atividade antibacteriana. Além disso, a carga negativa de todas elas facilita essa incorporação à superfície celular bacteriana que é carregada positividade devido à presença de grupos contendo enxofre e fósforo.

Tabela 7. Demonstração da Curva de Absorção com os méis abaixo.

	C- 8	NP- 8	NPS 8	C- 9	NP- 9	NPS 9	C- 10	NP- 10	NPS 10	C- 25	NP- 25	NPS 25
350	0,143	0,462	494	0,137	0,466	505	0,152	496	545	0,148	484	503
360	0,135	0,487	491	0,135	0,489	502	0,147	489	544	0,140	476	500
370	0,128	0,481	487	0,130	0,483	501	0,144	482	544	0,135	470	507
380	0,122	0,472	483	0,125	0,475	499	0,140	476	539	0,128	461	495
390	0,115	0,465	482	0,123	0,468	495	0,136	468	537	0,125	453	490

400	0,110	0,457	479	0,119	0,461	491	0,130	460	533	0,123	446	487
410	0,105	0,451	477	0,114	0,455	492	0,122	454	532	0,117	440	483
420	0,099	0,444	473	0,111	0,448	487	0,118	447	529	0,112	434	480
430	0,093	0,438	468	0,107	0,442	485	0,110	441	524	0,101	428	476
440	0,087	0,432	465	0,104	0,436	480	0,102	435	522	0,097	421	472
450	0,080	0,427	461	0,090	0,436	480	0,096	430	518	0,090	417	469
460	0,073	0,434	481	0,085	0,431	501	0,087	435	558	0,086	424	487
470	0,070	0,429	479	0,079	0,431	496	0,080	430	555	0,080	419	482
480	0,062	0,423	475	0,072	0,425	491	0,074	425	550	0,074	414	480
490	0,058	0,419	471	0,065	0,420	491	0,065	420	545	0,070	409	477
500	0,053	0,413	466	0,057	0,416	485	0,059	416	542	0,065	404	470

Sendo as siglas **C**= Controle; **NP**= Síntese de AgNP com mel no banho maria; **NPS**= Síntese de AgNP com mel no sol.

O intervalo utilizado foi entre 350nm e 500nm durante o teste de espectroscopia UV-VIS usada para observar curva de absorção das diferentes soluções, estando o valor de absorbância ideal para medir a concentração de cada solução em negrito na tabela acima.

O preparo feito para análise por MEV foi de secagem direta sobre os stubs metálicos. No entanto, como houve resquício de meio orgânico, algumas imagens queimavam ao incidir o feixe. Para retirar o meio e lavar as nanopartículas, as suspensões foram centrifugadas a 15.000 RCF por 25 minutos (centrífuga Hermle Z 233 M-2; Núcleo Multiusuário Biotecnologia ICT-UNIFESP).

No entanto, após a centrifugação, as NPs não precipitaram ao fundo do microtubo e sim nas paredes no microtubo. O meio sobreabundante foi retirado, mas para ressuspender as NPs das paredes do tubo, foi adicionado um volume de 2 mL de etanol absoluto. Os microtubos foram agitados em banho ultrassom por 20 min, até que não fossem observados os precipitados de NPs. Após a secagem direta sobre a fita de carbono obtiveram as imagens abaixo.

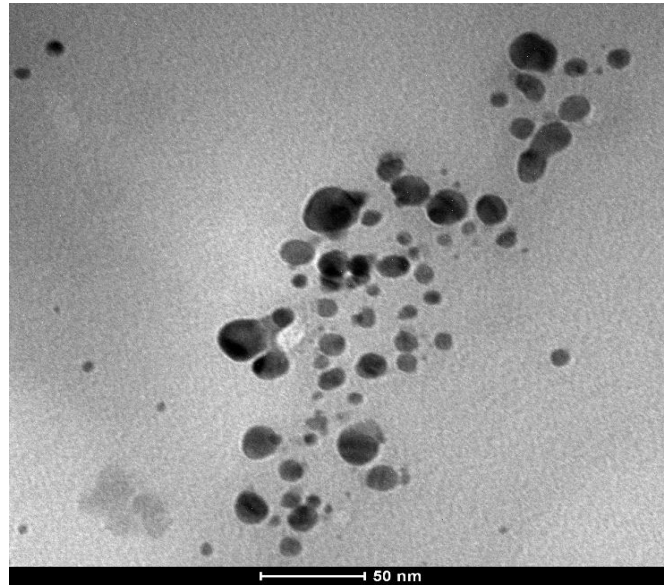


Figura 3. Micrografia obtida por MET das AgNPs-9-Sol.

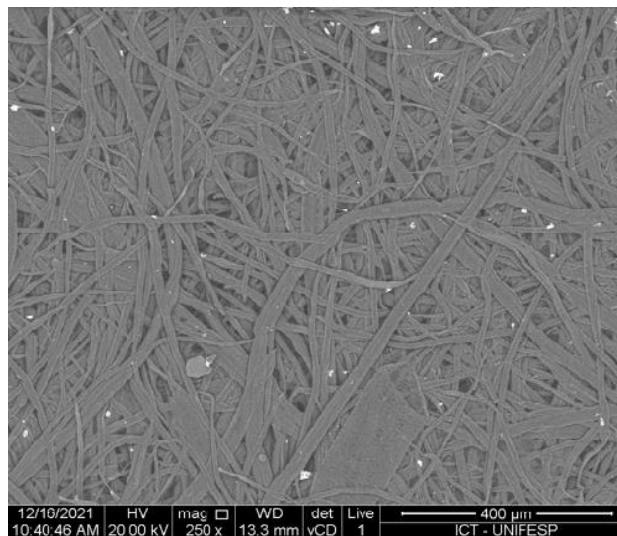


Figura 4. Micrografia obtida por MET das AgNPs-8-Sol.

As nanopartículas foram analisadas através da Microscopia eletrônica de transmissão (MET) em 120 kV FEI Tecnai disponível na IEAMar/ UNESP e também através do MEV FEI Inspect S50 da NAPCEM ICT-UNIFESP.

Através das imagens é possível observar as nanopartículas com um formato esférico e borda lisa e outros aglomerados com bordas irregulares.

CONCLUSÃO

A preocupação com bactérias resistentes vem aumentando nos últimos anos e estimula a constante pesquisa científica para encontrar alternativas para controlar esse aumento. Pelo presente estudo e todos os demais referenciados, o uso das AgNP está em exponencial crescimento e com múltiplas aplicações e benefícios, além de se mostrar capaz de suprimir crescimento microbiano em áreas contaminadas. As AgNPs preparadas biogênicas mostraram um efeito citotóxico contra células e antibacteriano contra algumas bactérias Gram positivas e negativas. A síntese verde de AgNPs usando diferentes méis pode ser uma alternativa eficiente e econômica para combater essa multirresistência bacteriana.

REFERÊNCIAS

AL-BRAHIM, J.S., MOHAMMED, A.E. **Antioxidant, cytotoxic and antibacterial potencial of biosynthesized nanoparticles using bee honey from two diferente floral sources in Saudi Arabia.** Saudi Journal of Biological Sciences. 2019.

ALMEIDA, L.F.D.; CAVALCANTI, V.W.; VIANA, W.P.; LIMA, E.O. **Screening da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre *Candida albicans*.** Revista Brasileira de Ciências da Saúde. v.14, n.4, p.51-56. 2011.

ALVES, E.M. **Identificação da flora e caracterização do mel orgânico de abelhas africanizadas das Ilhas Floresta e Laranjeira, do Alto Rio Paraná.** 63 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR. 2008.

ANDRADE, P. **Preparação e caracterização de nanopartículas de prata e de nanocompósitos poliméricos antimicrobianos.** Tese de doutorado - Instituto de Química da UNICAMP Universidade Estadual de Campinas. Campinas-SP. 2013

ANTUNES, F.; DAL'ACQUA, N.; BERGMANN, C.; GIOVANELA, M. **Síntese, caracterização e aplicação de nanopartículas de prata como agentes antimicrobianos.** Estudos Tecnológicos em Eng. 2013.

BANDEIRA, A. M. P. **Caracterização Físico-Química e Bioatividades do Mel de Abelha Produzido na Região Oeste do Estado do Pará.** Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, 2016.

BASUALDO, C.; SGROY, V.; FINOLA, M.S.; MARIOLI, J.M. **Comparison of the antibacterial activity of honey from diferente prevanance against bacteria usually isolated from skin wounds.** Veterinary Microbiology, v.124, n. 3-4, 2007.

BAZONI, M. **Atividade antimicrobiana dos méis produzidos por *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão nativas do Brasil.** Tese de doutorado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2012.

BEHRAVAN, M., PANAHI, A. H., NAGHIZADEH, A., et al, **“Facile green synthesis of silver nanoparticles using *Berberis vulgaris* leafond root aqueous extract and its antibacterial activity”**, International Journal of Biological Macromolecules. 2019.

CAMPÊLO, M.; FREIRE, D.; ABRANTES, M.; SOUSA, E.; SILVA, J. **Potencial antimicrobiano de própolis e cera de diferentes espécies de abelhas sem ferrão.** Acta Veterinaria Brasilica, v.9, n.4, p.397-400. 2015.

CAMPOS, F. S.; GOIS, G.C.; CARNEIRO, G.G. **Parâmetros Físico-Químicos Do Mel De Abelhas *Melipona scutellaris***. Paraíba. Revista, Uberaba, n.7, p. 186 – 190. 2010.

CANO, C. **Caracterização dos méis monoflorais de eucalipto e laranja do Estado de São Paulo pela análise polínica e físico-química**. São Paulo. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo. 2002.

CARVALHO, C. A. L.; SOUZA, B. A.; SODRÉ, G. S.; MARCHINI, L. C.; ALVES, R. M. O. **Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química**. Bahia: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI-BA. 2005.

CAVALCANTI, Y.W.; ALMEIDA, L.F.D.; PADILHA, W.W.N. **Atividade antifúngica de três óleos essenciais sobre cepas de *Candida***. Rev. Odontol. Bras. Central, v.20 n.52. 2011.

CHARCOSSET, C. **Preparation of emulsions and particles by membrane emulsification for the food processing industry**. Journal of Food Engineering, v.92, n.3. 2009.

CHOPRA, I. **The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern?** Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2007

CHUTTONG, B.; CHANBANG, Y.; SRINGARM, K.; BURGETT, M. **Physicochemical profiles of stingless bee (*Apidae: Meliponini*) honey from South East Asia (Thailand)**. Food Chemistry. v.192. 2016.

COSTA, N.M.B. E ROSA, C.O.B. **Alimentos Funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro: Ed. Rubio. 2010.

COUTINHO, D. **Estudos físico-químicos de méis do Curimataú Paraibano**. 25 f. Monografia (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB. 2006.

COOPER, R., WIGLEY, P, BURTON, N. **Susceptibility of multiresistant strains of *Burkholderia iacepaciato* honey**. Letters in Applied Microbiology. 2009.

DASH, N., PANIGRAHI, D. AND AL-ZAROUNI, M. **Antimicrobial Effect of Honey from the Arabian Gulf Region Against Bacterial Isolates from Pus and Wound Swabs**. Advances in Microbiology, 2016.

DA CRUZ. C, B, N; PIERI. F, A; CARVALHO-ZILSE. G A; ORLANDI. P, P; NUNES-SILVA. C, G; LEOMIL. L. **Antimicrobial activity of honeys from two stingless honeybee species and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) against pathogenic microorganisms**. VOL. 44(2) 2014: 287 – 290 Acta Amazônica. 2014.

DOI, A. M.; PIGNATARI, A. C.; EDMOND, M. B.; MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F. A. S.; ANDREOTTI, R. ET AL. **Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program.** PLoSOne, v.25, n.11, 2016.

FREITAS, Débora Gaspar Feitosa; KHAN, Ahmad Saeed and SILVA, Lúcia Maria Ramos. **Nível tecnológico e rentabilidade de produção de mel de abelha (*Apis mellifera*) no Ceará.** *Rev. Econ. Sociol. Rural.* Vol.42, n.1, pp.171-188. ISSN 1806-9479, 2004.

GELATTI, L.; BONAMIGO, R.; BECKER, A.; D'AZEVEDO, P. ***Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade.** *An. Bras. Dermatol.* 84 (5) 2009.

GÓIS, G.; RODRIGUES, A.; LIMA, C.; SILVA, L. **Composição do mel de *Apis mellifera*: Requisitos de qualidade.** *Acta Veterinaria Brasilica*, v.7, n.2, p.137-147. 2013.

GOMES, V.V.; BANDEIRA, A.M.P.; COSTA, S.C.; DOURADO, G.S.; LIMA, A.K.O.; SILVA, D.S.; VASCONCELOS, A.A.; TAUBE JÚNIOR, P.S. **Caracterização Físico-Química e Atividade Antioxidante do mel de abelha Jandaíra (*Melipona Compressipes Manaosensis*).** Mojuí Dos Campos, Pará, Brasil. 56º Congresso Brasileiro de Química, ISBN 978-85-85905-19-4. 2016.

GONÇALVES, A., FILHO, A., & MENEZES, H. **Atividade antimicrobiana do mel da abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini).** *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.72, n.4, p.455-459. 2005.

GLASSER, J., GUYMON, C., MENDE, K., WOLF, S., HOSPENTHAL, D., MURRAY, C. **Activity of topical antimicrobial agents Against multidrug-resistant bacteria recovered from burn patients.** *Journal of the international society for burn injuries.* 2012.

GURUVU, N. R., NARAPOGU, V., LALITHA, D. L., BANDURU, N. R., GOOTHY, S. S. K., RAO, D. M. M. **Synergistic antimicrobial activity for honey combined with silver nanoparticles topically applied in experimentally infected wounds in Wistar albino rats.** *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology.* 2021.

HOSNY, A.M.S., KASHEF, M. T., RASMY, S. A., ABOUL-MAGD, D.S. **Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized using honey and gamma radiation against silver-resistant bacteria from wounds and burns.** *Vietnam Academy of Science & Technology.* 2017.

JAMKHANDE, P.; GHULE, N.; BAMER, A.; et al, **“Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications”**, *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* Research, Society and Development, v. 10, n. 7. 2019.

JENKINS, R.; COOPER, R. **Synergy between oxacillin and manuka honey sensitize smethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin.** J Antimicrob Chemother 67(6):1405-7. 2012.

KERR, W. **Warwick Kerr: a Amazônia, os índios e as abelhas.** Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php>., Acesso em 15 out 2020.

LAKSHMANAN, G., SATHIYASEELAN, A., KALAICHELVAN, P. T., et al, “**Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles using fruit extract of *Cleome viscosa* L.: Assessment of their antibacterial anticancer activity**”, Karbala International Journal of Modern Science, 2018.

LANDSDOWN, A.; SILVER, I. **Its antibacterial Properties and mechanism of action.** Journal of Wound Care, 11, 125-130. 2002.

LEANDRO, L. **Avaliação da atividade antibacteriana e modulatória de extratos metanólico e hexânico da casca de *Sideroxylon Obtusifolium*.** E-ciência. 2013.

LÍRIO, F. **Caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de méis florais irradiados.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro. 2010.

MANDAL, M., MANDAL, S. **Honey: its medicinal property and antibacterial activity.** Elsevier. 2010.

MENDES, C.; SILVA, J.; MESQUITA, L.; MARACAJÁ, P. **As análises de mel.** Revista Caatinga. 2009.

MENEZES, E.A.; VASCONCELOS JÚNIOR, A.A.; CUNHA, F.A.; CUNHA, M.C.S.O.; BR AZ, B.H.L.; CAPELO, L.G.; SILVA, C.L.F. **Identificação molecular e suscetibilidade antifúngica de *Candida parapsilosis* isoladas no Ceará, Brasil.** J. Bras. Patol. Med. Lab. v.48, n.6, p.415-420, dezembro. 2012.

MOLAN, P. C. **Why honey is effective as a medicine.** The scientific explanation of its effects. Bee World, v. 82, 2001.

MONTENEGRO, H. R. **Comparação Das Características Físico-Químicas E Antioxidantes Do Mel De *Tetragonisca Angustula* (Latreille, 1811) coletado nos estados do Paraná e Rondônia.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2018.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; PFAÜER, M. **Medical Microbiology**, 5th Edition. Elsevier Inc Chap IV. 2005.

NASIR, N., HALIM, A., SINGH, K., DORAI, A., HANEEF, M. **Antibacterial activity of tualang honey and its effect in burn wound management: a comparative study.** BMC Complement Altern Med. 2010.

NOGUEIRA, N. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão.** Editora Nogueirapis. ISBN:85-86525-01-4. 445 p. 1. 1997.

OBOT, I.B., UMOREN, S.A., Jhnsn, A.S., **Sun-light-mediated synthesis of silver nanoparticles using honey and its promising anticorrosion potencial for mildsteel in acidic enviroments.** Journal of Material and Enviromental Science, 4. 2013.

OLIVEIRA, M.N., SIVIERI, K., ALEGRO, J.H.A., SAAD, S.M.I. **Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol. 38. 2002.

OLIVEIRA, PATRICIA SERTÃO; MULLER, REGINA CELI SARKIS; DANTAS, KELLY DAS GRAÇAS FERNANDES; ALVES, CLAUDIO NAHUM. **Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. Flavolineata* (Apidae, Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia.** Quim. Nova, Vol. 35, No. 9, 2012.

ORTIZ-VAZQUEZ, E.; CABALLERO, F.; CUEVAS-GLORY, L. **Antibacterial activity of *Melipona* honey from Yucatán.** Em: Apimondia International Apicultural Congress, 40., Melbourne. 2007.

PERALTA, E. D. **Atividade antimicrobiana e composição química de méis do Estado da Bahia.** 2010. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, 2010.

PEREIRA, L. L. **Análise físico-química de amostras de méis de *Apis melliferae* meliponíneos.** 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2010.

PEREIRA, A. **Caracterização do mel com vista a produção de Hidromel.** Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária. Bragança, 2008.

PIMENTEL, R. B. DE Q.; COSTA, C. A. DA; ALBUQUERQUE, P. M.; DUVOISIN JUNIOR, S. **Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona Compressipes manaosensis* and commercial honey.** BMC Complementary and Alternative Medicine. 2013.

PINHEIRO, C., ABRANTES, M., SILVA, R., OLIVEIRA JUNIOR, C. A., LOBATO, F., & SILVA, J. **Microbiological quality of honey from stingless bee, Jandaíra (*Melipona subnitida*), from the semiarid region of Brazil.** *Cienc. Rural* 48 (9), 2018.

POBIEGA, K. KRASNIEWSKA, K. GNIEWOSZ, M. **“Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review”**, *Trends in Food Science & Technology*, 2019.

RAOA, P.; KRISHNANA, K. & GAN, N. **Biological and therapeutic effects of honey produced by honey bees and stingless bees: a comparative review.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2016.

RAYOL, B. P.; MAIA, R. T. F. **Potencial da inserção de abelhas em sistemas agroflorestais no oeste do estado do Pará, Brasil.** *Rev. Bras. De Agroecologia*. 8(3): 101-108. 2013

ROSSO, R. **Avaliação das propriedades antioxidantes de derivados ésteres do ácido gálico.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – UFSC, Santa Catarina, 2005.

SAHOO, S.; PARVEEN, S.; PANDA, J. **The present and future of nanotechnology in human healthcare.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. Oxford, 2007.

SANTOS, A. **Identificação da flora microbiana em colméias de Meliponina.** 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

SAXENA, S.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. **Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys.** *Food Chem.* 118 (2): 391-397. 2010.

SEBRAE NACIONAL. **Manual de Segurança e Qualidade para Apicultura.** Informação Publicidade Ltda, 1ª edição. Brasília, 2009.

SERRA, J. L.; NASCIMENTO, A. R.; SILVA, W. A. S.; OLIVEIRA, M. B.; OLIVEIRA, F. C. C.; MARTINS, A. C. C. **Atividade antibacteriana em méis de abelhas comercializados nos municípios do Maranhão.** XLVII Congresso Brasileiro de Química. Recursos Renováveis. 2007.

SERRANO, R.B; VILLANUEVA, M.T.O.; MARQUINA, A.D. LA MIEL. **Edulcorante natural por excelência I. Origen, clasificación y propiedades.** *Alimentaria*, n. 1, 1994.

SILVA, E. **Análise físico-química dos méis de abelha (*Apis mellifera* e *Melipona scutellaris*)**. 2001. 39 f. Monografia (Graduação em Zootecnia)–Universidade Federal da Paraíba, Areia, PB. 2001.

SILVA, M.; CHAVES, J.; MESSAGE, D.; GOMES, J.; GONÇALVES, M.; OLIVEIRA, G.L. **Qualidade microbiológica de méis produzidos por pequenos apicultores de méis de entrepostos registrados no serviço de inspeção federal no estado de Minas Gerais**. Alimentos e Nutrição - Araraquara. 2008.

SILVA, G. S. da. **Avaliação dos Parâmetros Químicos e Potencial Antioxidante do Mel de Jandaíra (*Melipona Subnitida*D.)**. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

SOUSA, D. **Apicultura: Manual do agente de desenvolvimento rural**. Ed. 2, Brasília. 2007.

SOUZA, T.; SOUZA, L.; FRANCHI, L. **“Silver nanoparticles: An integrated view of green synthesis methods, transformation in the environment, and toxicity”**, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 171, pp. 691-700. 2019.

SNOW, M.; MANLEY-HARRIS, M. **On the nature of non-peroxide Antibacterial activity in New Zealand Manuka honey**. *Food Chem*, v. 84, n. 11, p. 145-147. 2004.

TAIPINA, M.; FONTES, M.; COHEN, V.; MASTRO, N. **Novas tecnologias: alimentos funcionais e a irradiação de alimentos**. *Higiene Alimentar*. 2003.

TAORMINA, P. J.; NIEMIRA, B. A.; BEUCHAT, L. R. **Inhibitory activity of honey Against food borne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of anti oxidant power**. *Int. J. Food Microbiol*. 2001.

TOSI, E.; CIAPPINI, M.; RÉ, E.; LUCERO, H. **Honey termal treatment effects on hidroxy methylfurfural content**. *Food Chem*. Amsterdam. 2002.

TRIPOLI, E.C.B.; LIMA, C.P.de. **Correlação das análises de méis da cidade de Curitiba com a atividade antibacteriana**. *Cadernos da Escola de Saúde*. v.11: p.116- 127. 2014.

VENTURIM, S. K., SARCINELLI, M. F., & SILVA, L. C. **Característica do Mel**. *Boletim Técnico*, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES. 2007.

VILLAS-BOAS J. K. & MALASPINA O. **Parâmetros físico químicos propostos para controle de qualidade do mel de abelhas indígenas sem ferrão no Brasil**. *Mensagem Doce*, 82. 2005.