



**Universidade Federal rural de Pernambuco  
Unidade Acadêmica de Serra Talhada  
Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas**

**Marcos Vinicius Figueroa**

**BACTÉRIAS DO MEL ABELHAS SEM FERRÃO (APIDAE: MELIPONINI)  
COM POTENCIAL ANTAGÔNICO A MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS  
DE INTERESSE PARA SAÚDE HUMANA**

**SERRA TALHADA- PE  
2021**

**MARCOS VINÍCIUS FIGUEROA**

**BACTÉRIAS DO MEL DE ABELHAS SEM FERRÃO (APIDAE: MELIPONINI)  
COM POTENCIAL ANTAGÔNICO A MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS  
DE INTERESSE PARA SAÚDE HUMANA.**

Trabalho apresentado ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para conclusão do curso em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Hélio de Melo Fernandes

**SERRA TALHADA- PE  
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

F475b

Figuroa , Marcos Vinicius

BACTÉRIAS DO MEL ABELHAS SEM FERRÃO (APIDAE: MELIPONINI) COM POTENCIAL  
ANTAGÔNICO A MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS DE INTERESSE PARA SAÚDE HUMANA / Marcos  
Vinicius Figuroa . - 2021.

38 f.

Orientador: Helio Fernandes de Melo.

Coorientadora: Ana Luiza da Silva.

Inclui referências e apêndice(s).

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Bacharelado em Ciências Biológicas, Serra Talhada, 2021.

1. Antagonismo. 2. resistência . 3. caatinga . 4. meliponini. I. Melo, Helio Fernandes de, orient. II. Silva,  
Ana Luiza da, coorient. III. Título

MARCOS VINÍCIUS FIGUEROA

**BACTÉRIAS DO MEL ABELHAS SEM FERRÃO (APIDAE: MELIPONINI)  
COM POTENCIAL ANTAGÔNICO A MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS  
DE INTERESSE PARA SAÚDE HUMANA.**

Monografia apresentada e aprovada em: 13 de Dezembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Hélio Fernandes de Melo

(Primeiro titular)

---

Prof. Dr. Airton Torres Carvalho

(Segundo Titular)

---

Prof. Dra. Viviane Martha Santos de Morais

(Terceiro titular)

“A ignorância gera mais frequentemente confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência.”

Charlie Darwin

## **AGRADECIMENTOS**

Inicialmente agradeço à providência divina e virgem Maria pelas forças que possuí ao longo dessa jornada.

À minha Mãe/avó Iracilda Figueroa por todo carinho e amor durante toda minha caminhada, a ela que foi além do limite para educar cada filho. Minha tia/madrinha Aparecida Figueiroa pelo amor e apoio durante cada momento da minha vida. A meu padrinho Marcelo Lira pelo carinho e ajuda ao longo da minha trajetória.

À meus primos/irmãos Daniel Lira e Erikson Lira pelos momentos que vivemos juntos.

Aos meus amigos/irmãos Beatriz Oliveira, George Nogueira, Geovannya Cavalcante e Karlana Sena por cada momento que vivemos durante todos esses anos.

Ao meu amigo/irmão e companheiro de apartamento Gabriel Rodrigues por cada conversa, risadas e desespero que passamos juntos. Você tornou essa jornada menos difícil.

À minha namorada Suany Nogueira por acreditar em mim desde o começo, pelo carinho, incentivo e parceria que ao longo do tempo cultivamos. E pelo porto seguro que és.

Aos amigos que a UAST trouxe Alanna Laurentino, Aparecida Clébia, Amanda Letícia, José Augusto, Maria Amanda, Maria da Saúde, Maria Luiza e Mariana Karen por cada momento feliz e difícil que passamos. E por cada aprendizagem que construímos.

A todos os que participaram e participam dos grupos de pesquisa GEEP (Grupo de Estudos em Ecologia e Polinização) e LAPEMI (Laboratório de Pesquisa e Extensão em Microbiologia); obrigado por todas as contribuições e aprendizado.

Ao professor Airton Carvalho pelo grande profissional e orientador que foi durante meu tempo na graduação, por cada aprendizagem. Todo carinho e admiração pelo senhor.

Ao professor Hélio pelo grande profissional e orientador que foi durante essa orientação.

Aos professores(a) Ana Luiza, Virginia Medeiros, Plínio Pereira, Valdeline Atanzio e Viviane de Moraes por cada apoio e aprendizagem.

Por fim, agradeço à universidade pública, a qual faço parte, a todas as outras que levam acesso a educação. Agradeço aos governos anteriores que lutaram para que a educação chegassem a todos. Obrigado a todos aqueles que como eu, dedicam suas pesquisas em prol da ciência e educação do país.

Grato.

## RESUMO

As colônias de abelhas sem ferrão são um reservatório natural de microrganismos que podem estar presentes no mel, no pólen e outros microambientes de todo o ninho. As abelhas, assim como outros insetos sociais, apresentam complexas interações simbióticas, que ao longo da evolução forneceu uma interação ecológica que ajudou na preservação das colmeias, favorecendo a vida desses insetos e dando-lhes vantagens de sobrevivência. Vários microrganismos associados a abelhas sem ferrão, principalmente bactérias esporulantes do gênero *Bacillus*, produzem substância que inibem o crescimento de microrganismos competidores que contaminam e deterioram o alimento estocado nas colméias. Nesse contexto, esse trabalho teve o objetivo de isolar bactérias de abelhas sem ferrão do grupo (apidae: meliponini) para verificar a capacidade da microbiota frente a microrganismos patogênicos de interesse para saúde humana *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. No teste de antagonismo foram usadas amostras de mel de *Melipona asilvai* no qual foram feitas diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  que em seguida foram submetidas a hipertermia em banho maria a 80°C. Foram selecionados 10 morfotipos bacteriano esporogênicos que foram submetidos a teste de antagonismo, porém apenas seis inibiram o crescimento de bactérias patogênicas com halo de inibição variando de 1 a 3 mm. As amostras de méis de *M. subnitida*, *scaptotrigona sp* e *Friosiomelitta* armazenadas há mais de dois anos e de *Melipona asilvai* apresentaram ausência de fungos filamentosos e coliformes fecais e totais termotolerantes. Isso mostrou que o mel possui uma capacidade de se manter asséptico de microrganismos deteriorantes. Todas as amostras de méis apresentaram bactérias aeróbias mesófilas totais, em concentrações variando de  $2,9 \times 10^4$  a  $9,79 \times 10^4$  UFC/g de mel. Embora o mel possua altas concentrações de açúcares que inibem o crescimento microbiano, várias bactérias conseguem resistir a alta pressão osmótica e sobreviver nesse substrato, tornando-o um reservatório natural de microrganismos que acabam sendo benéficos a colônia e servindo como uma barreira contra microrganismos contaminantes.

**Palavras chaves:** Antagonismo, resistência, caatinga, meliponini.

## ABSTRACT

Stingless bee colonies are a natural reservoir of microorganisms that may be present in honey, pollen and other microenvironments throughout the nest. Bees, like other social insects, have complex symbiotic interactions that, throughout evolution, provided an ecological interaction that helped preserve the hives, favouring the life of these insects and giving them a survival advantage. Several microorganisms associated with stingless bees, mainly sporulating bacteria of the *Bacillus* genus, produce substances that inhibit the growth of competing microorganisms that contaminate and deteriorate the food stored in the hives. In this context, this work aimed to isolate bacteria from stingless bees of the *apidae: meliponini* group to verify the capacity of the microbiota against pathogenic microorganisms of interest to human health. In the antagonism test, samples of honey from *Melipona asilvai* with  $10^{-1}$  to  $10^{-4}$  dilutions were used, which were then submitted to hyperthermia in a water bath at 80°C. Ten sporogenic bacterial morphotypes were selected and submitted to an antagonism test, but only six inhibited the growth of pathogenic bacteria with an inhibition halo ranging from 1 to 3 mm. Honey samples from *M. subnitida*, *scaptotrigona sp* and *Friasiomelitta* stored for more than two years and from *Melipona asilvai* showed absence of yeasts, filamentous fungi and thermotolerant total coliforms. All honey samples showed total mesophilic aerobic bacteria, in concentrations ranging from  $2.9 \times 10^4$  a  $9.79 \times 10^4$  CFU/g of honey. Although honey has high concentrations of sugars that inhibit microbial growth, several bacteria are able to resist high osmotic pressure and survive in this substrate, making it a natural reservoir of microorganisms that end up being beneficial to the colony and serving as a barrier against contaminating microorganisms.

**Keywords:** Antagonism, resistance, caatinga, meliponini.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Teste de coliformes totais termotolerantes..... 23
- Figura 2** - Na imagem (A), observa-se a retirada do disco com a bactérias isoladas do mel *Melipona asilvai* que foram submetidas ao banho maria. Na (B), colocando o disco sobre a placa contendo as bactérias enteropatogênicas..... 25
- Figura 3** - Teste de antibiograma bloco de gelose. Na imagem (A), halo de inibição contra *E.coli* de 2 mm. Na imagem (B), halo de inibição contra *S. aureus* de 1 mm..... 27

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) das bactérias aeróbias mesófilas totais a partir de amostras de méis armazenadas.....	25
.	
<b>Tabela 2:</b> Resultado do teste de antagonismo <i>in vitro</i> Bloco de Gelose com as bactérias isoladas encontrada no mel da abelha Manduri ( <i>Melipona asilva</i> ).....	26

## **SIGLAS E ABREVIATURAS**

AN- Ágar Nutriente

MH- Ágar Mueller Hinton

°C – Graus Celsius

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>5</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>10</b>
<b>SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1 Geral</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2 Específicos</b> .....	<b>16</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
<b>3.1 Abelhas sem ferrão Região da Caatinga</b> .....	<b>17</b>
3.1.2 Abelhas sem ferrão Grupo Meliponini .....	17
<b>3.2 Interação simbiótica entre insetos e microrganismos</b> .....	<b>18</b>
<b>3.3 Produtos naturais bioativos</b> .....	<b>19</b>
<b>3.4 Produtos das abelhas sem ferrão</b> .....	<b>20</b>
3.4.1 Composição mel.....	20
3.4.2 Uso medicinal do mel .....	20
<b>3.5 Bactérias indicadoras de Higienização</b> .....	<b>22</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
<b>4.1 Coleta das amostras</b> .....	<b>23</b>
<b>4.2 A Coliformes fecais totais termotolerantes</b> .....	<b>23</b>
<b>4.3 Contagem das bactérias aeróbias mesófilas totais e fungos filamentosos</b> .....	<b>24</b>
<b>4.4 Isolamento das bactérias esporogênicas antagônicas</b> .....	<b>24</b>
<b>4.5 Teste de antagonismo das bactérias esporogênicas</b> .....	<b>24</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
<b>5.1 Análise de coliformes totais e termotolerantes</b> .....	<b>26</b>
<b>5.2 Contagem de bactérias aeróbias mesófilas totais e fungos filamentosos</b> .....	<b>26</b>
<b>5.3 Teste de antagonismo das bactérias esporogênicas</b> .....	<b>26</b>

<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>30</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS .....</b>	<b>31</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O grupo das abelhas sem ferrão está presente principalmente nas zonas tropicais, no Brasil a diversidade se estende para mais de 3.000 espécies (ZANELLA, 2013; VIT, 2013; GRUTER, 2020). Os estudos envolvendo a associação de microrganismos com insetos têm descoberto várias interações mutualísticas, mostrando o quanto essa interação harmônica, ao longo da evolução desses insetos, contribuiu na proteção contra parasitas, predadores e patógenos (DA PAIXÃO MELOA et al., 2019).

Cerca de 20% dos artrópodes possui interações simbióticas com os microrganismos e essa interação desempenha um papel importante na nutrição e proteção contra doenças para os insetos (DOUGLAS, 2000; GEBHARDT, 2002). Dentre os insetos, as abelhas destacam-se como fontes de bioprospecção importantes; produtos da colmeia têm sido popularmente utilizado há décadas para tratamento de várias doenças de origem viral, bacteriana e fúngica (GONÇALVES et al., 2005). O mel e pólen são tratados como medicinal há milênios e considerado um alimento vivo e que contém uma diversidade de microrganismos benéficos tanto para as abelhas quanto para os homens (WIESE, 1987; NOGUEIRA-NETO, 1997).

Em abelhas sem ferrão (Apidae, Meliponini), o grupo mais especioso de abelhas produtoras de mel, várias espécies de bactérias e fungos, já foram encontrados nos méis, pólen, cera, própolis e no alimento larval (OLAITAN et al, 2007; GAIN, 2018). E esses microrganismos estão participando ativamente da digestão de alimentos, atuando na proteção contra infecção de agentes patógenos, parasitários e ajudando ativamente no processo de desenvolvimento da colônia (VAN ARNAM et al., 2018; ENGEL et., al 2013).

Segundo trabalho de Menegatti (2018), que isolou a bactéria *Paenibacillus polymyxa* de ninho da abelha *Melípona scutellaris*, e essa bactéria apresentou uma atividade antagonica contra dois fungos enteropatogênicos; *Beauveria bassina* e *Metarhizium anisopliae*, devido a sua alta capacidade de produção de metabólitos secundários. Ensaio *in vitro* mostraram que os méis de *Nannotrigona testaceicornis* e *Tetratrigonisca angustula* inibiram o crescimento de *Bacillus* sp, *Escherichia coli*, *Proteus* spp,

*Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus* spp., coagulase-positiva (GOLÇALVES et al., 2005; BOBANY et al., 2010). No mel de *Melipona fasciata* foram encontrados *Bacillus. circulans* e *Bacillus alvei* produtores de ácidos orgânicos, como ácido acético e antibióticos que inibem o crescimento de bactérias contaminantes no alimento estocado na colmeia (GILLIAM, 1990).

As pesquisas de produtos naturais bioativos tem ganhando importância para a manutenção da saúde de seres humanos, uma vez que bactérias patogênicas estão resistentes às drogas sintéticas atualmente usadas no combate às infecções (GUIMARÃES et al., 2010), e como a maior parte de produtos farmacêuticos terapêuticos para saúde humana, como; antibióticos, probióticos, imunossuppressores, redutores de colesterol, anticancerígenos e cicatrizantes possui sua origem química derivada de produtos naturais, pois grande parte desses efeitos biológicos advém dessa simbiose entre insetos e microrganismos.

Tendo em vista a importância e diversidade das abelhas sem ferrão, o trabalho visa encontrar futuramente microrganismos que apresentem moléculas bioativas proveniente dessa interação capazes de serem utilizadas na terapêutica.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Determinar a qualidade microbiológica do mel e isolar bactérias esporogênicas a partir do mel de abelhas sem ferrão (Apidae, Meliponini) e testar o potencial antagonista dos isolados esporogênicos contra bactérias relacionadas a infecções em seres humanos.

### **2.2 Específicos**

- Analisar a qualidade microbiológica do mel através da contagem de coliformes totais e termotolerantes.
- Analisar a qualidade microbiológica do mel através concentração de bactérias aeróbias mesófilas totais e fungos filamentosos do mel.

- Determinar a concentração de bactérias aeróbias mesófilas totais e fungos filamentosos do mel.
- Isolar bactérias esporogênicas com potencial antagônico a patógenos.
- Realizar o teste de antagonismo dos isolados esporogênicos frente as bactérias patogênicas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Abelhas sem ferrão Região da Caatinga**

A Caatinga é a segunda região semiárida mais populosa do mundo, um bioma que se estende por todos os Estados do Nordeste e parte de Minas Gerais (FRANCA-ROCHA, 2007). Segundo IBGE (1997), cobre 9,92% do território nacional e sua área é de 844. 453 km<sup>2</sup>. Entre todos os biomas do País, a Caatinga é o menos estudado cientificamente, e um dos mais ameaçados, devido ao uso inadequados dos recursos naturais (FRANCA-ROCHA, 2007).

Mas nos últimos tempos esse olhar tem mudado em relação ao estudo desse bioma, em especial quando se trata das abelhas sem ferrão e sua interação ecológica (ZANELLA, 2013). A caatinga possui muitas espécies endêmicas e raras de abelhas sem ferrão, que está relacionado aos domínios morfoclimáticos presentes na região semiárida, a existência de faixas de transição promove a caatinga ser um domínio fitogeográfico bastante diverso para diversidade de abelhas sem ferrão (ZANELLA, 2000).

No Brasil, a família Apidae, a que tem os hábitos sociais mais avançados apresentam quatro subfamílias: Apinae, Meliponinae, Bombinae e Euglossinae, e essas abelhas compartilham uma característica em comum, que é ter nas tíbias das pernas traseiras das fêmeas uma concavidade denominada corbícula onde elas carregam o pólen das flores ou outras substâncias para os seus ninhos (NOGUEIRA-NETO, 1997).

##### **3.1.2 Abelhas sem ferrão Grupo Meliponini**

As abelhas sem ferrão pertencem à ordem Hymenoptera, família Apidae, tribo Meliponini, também conhecidas como “abelhas indígenas” e “abelhas nativas”, é um grupo taxonômico antigo e diversificado de abelhas sociais,

encontradas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia, Austrália e Américas (GRUTER, 2020). Possuem aproximadamente 550 espécies, sendo que sua maior abundância de espécies é localizada em florestas tropicais de várzea, em especial na bacia amazônica (MICHENER, 2007; ASCHER & PICKERING, 2020).

No Brasil, as espécies de meliponíneos chegam a cerca de 300, distribuídas em 29 gêneros (SILVEIRA et al. 2002). Nas regiões Norte e Nordeste esse grupo ganha destaque, em virtude da criação pela população (GONÇALVES et al., 2005). Segundo Imperatriz (2004), o Norte e o Nordeste possuem uma maior apreciação por essas abelhas, pelo seu valor econômico que os produtos dessas abelhas podem gerar para a renda familiar.

Com isso, valor das abelhas sem ferrão nessas localidades não está apenas relacionado à economia, há muito tempo os produtos dessas abelhas também é usado pelas civilizações ao redor do mundo como produto medicinal (SILVA et al., 2012). Produtos da colmeia têm sido popularmente utilizados há décadas para tratamento de várias doenças de origem viral, bacteriana e fúngica (GONÇALVES et al., 2005).

### **3.2 Interação simbiótica entre insetos e microrganismos**

Os estudos envolvendo associação de microrganismos com insetos têm mostrado várias interações mutualísticas, destacando o quanto essa interação estão ligada a sobrevivência dos insetos, ajudando na proteção contra parasitas, predadores e patógenos (WEILAN GOMES et al., 2019). Essa microbiota produz compostos que ajudam na nutrição das abelhas e na proteção contra microrganismos deteriorantes do alimento estocado na colmeia, Assim dando-lhe vantagens de sobrevivência (MUTHKUMARASAMY et al., 2005; FAVIA et al., 2008; MENEZES et al., 2015).

Menezes et al. (2015), demonstrou em sua pesquisa a interação entre uma espécie de fungo que vive em simbiose dentro do disco de cria das larvas das abelhas sem ferrão da espécie *Scaptotrigona depilis*, que auxilia no desenvolvimento larval, e sem esse fungo as larvas não se desenvolvem de forma saudável ou não chegaram a completar seu ciclo. Machado (1971),

realizou um estudo entre a associação das bactérias do gênero *Bacillus* nas colônias de *Melipona quadrifasciata*, e após a aplicação de um antibacteriano (estreptomicina) ao alimento da colônia e eliminando as bactérias do microbioma a colônia morreu cerca de um mês depois, mostrando assim que as bactérias encontradas no alimento larval participa da vida e qualidade desse material.

É visto que produtos naturais isolados de microrganismos fornecem um potencial relevante para saúde humana, pois novos medicamentos, como antibióticos e antifúngicos tem sido descobertos a partir desses microrganismos (PINTO, 2002). A prospecção por novos compostos encontrados nos ecossistemas naturais vem ganhado destaque, especialmente aqueles oriundos de interações mutualísticas harmônicas, considerando que essas simbioses acabam fornecendo produtos naturais ou moléculas que apresentam ações secundárias bioativas que são de grande interesse para o homem (FAULKNER, 2000; OLIVEIRA, 2013; GUIMARÃES et al., 2010; MEINWALD, 2011).

### **3.3 Produtos naturais bioativos**

Um produto natural é uma substância química que apresente um efeito tóxico ou terapêutico, que é produzida por razões fisiológicas específicas do organismo, sendo a ecologia dos organismos produtores são que determinam esses efeitos (CONTI, 2012). E essa interação simbiótica traz uma função ecológica bastante promissora para a bioprospecção de novas moléculas biológicas com grande potencial para saúde humana (GUIMARÃES et al., 2010).

Com isso, as pesquisas têm sido voltadas para procura produtos naturais bioativos para produção de novos fármacos, em especial a resistência microbiana, que sofreu declínio no começo do século XIX, em prol da indústria que fez investimento focando nas moléculas já conhecidas, por meio das técnicas de síntese combinatória e síntese alto desempenho, que permitia fabricar em excesso e combinar os elementos para criar novas substâncias das moléculas pré-existentes, e com isso, os microrganismos adaptaram e se

tornaram resistentes a maior parte dos fármacos produzidos por essas técnicas (GUPTA et al., 2009; NEWMAN et al., 2012; CONTI; 2012).

### **3.4 Produtos das abelhas sem ferrão**

#### **3.4.1 Composição mel**

As colônias das abelhas sem ferrão possuem uma conformação estrutural diferente quando comprado a espécie de abelha *Apis mellífera*: o armazenamento do mel e pólen quando produzido é armazenado em potes de comida, essa maneira de armazenamento está ligado ao lugar onde vivem; as colônias localizadas na caatinga ou em zonas semiáridas do Norte da Austrália passam por períodos de estiagem, que leva a um período floral escasso, e assim, precisam estocar esse produto para sua sobrevivência (GRUTER, 2020).

A composição do mel dessas abelhas varia de acordo com a espécie, região geográfica e recurso floral que utilizam; isso leva uma a textura, sabor, coloração e composição química diferente para cada espécie (VIT et al., 2013). Mas essas variedades de méis de Meliponíneos também estão ligadas a outros fatores, como: o maior teor de água, que chega entre 30% a 42% do total do conteúdo, fazendo o mel ser menos viscoso e possuir maior concentração de microrganismos e uma acidez bastante elevada, que acaba levando a diferenças de odores e sabores, que são fatores que tornam esse produto tão variado (SOUZA et., 2006; VIT et., 2013; GRUTER, 2020).

O mel possui na sua composição: frutose, glicose, sacarose e maltose, sendo que a sacarose quando passado pelo processo enzimático na colônia é reduzida, e passa a ser encontrada em pequenas quantidades, nesse total o mel possui um teor de açúcar entre 68 a 73% (VIR et., 2013; CHALCOFF et al. 2017; GRUTER, 2020). Além disso, ainda possui minerais como: potássio, aminoácidos e compostos fenólicos e flavonoides (VIT et al. 2013; BILUCA et al. 2016).

#### **3.4.2 Uso medicinal do mel**

As propriedades do mel de abelhas sem ferrão, por exemplo, tem registro de sua utilização desde o tempo da civilização Maia na América

Central, o mel da *Melipona beecheei* era usado para vários tipos de doenças, e prescritos para o tratamento respiratório, cortes na pele, úlceras, feridas, e até antigas pomadas antiinflamatórias (ROSALES et al., 2013). Outros povos antigos como Egípcios, Sumérios e Aborígenes Australianos também utilizavam o mel de abelhas para as mais diversas finalidades (NOGUEIRA-NETO, 1997).

No trabalho de Alves et al (2008), foi analisado o uso tópico do mel da espécie de *Melipona subnitida* sobre feridas infectadas de ratos, e observou-se a estimulação da cicatrização e redução da infecção por bactérias gram-positivas de forma eficaz. Menezes (2005), analisou o mel de *Nannotrigona testaceicornis* e obteve resultado antimicrobiano contra *E. coli*, *Proteus spp.*, *P. aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus spp.*

Segundo Menezes et al. (2013), o processo que o mel passam dentro do ninho é que mantém esses efeitos benéficos e terapêuticos, esse produto passa por um processo de fermentação devido a atividade bacteriana, que juntos da adição de enzimas e outras substâncias secretadas pelas glândulas salivares das abelhas operárias mantém essas propriedades antioxidantes e medicinais. Segundo Fletcher (2020), relata que o dissacarídeo que é identificado como maltose é na verdade trealulose, que possui o potencial antioxidante para a saúde humana.

Essa atividade antioxidante do mel também está relacionada à presença de flavonoides provenientes do néctar das plantas visitadas (RODRÍGUEZ-MALAVÉ et al., 2009; GRUTER, 2020), e quando esse flavonoides e outros exsudatos de vegetais são incorporados ao mel e pólen, junto com a ação de enzimas e do metabolismo dos microrganismos presentes, acaba contribuindo para a modificação química desses produtos e a sua ação terapêutica (TOMÁS-BARBERÁN et al. 1993).

No trabalho Da Silva (2014), foi possível observar o potencial antioxidante do mel da abelha Jandaíra, em que foi identificado diante das análises físico-químicas as substâncias de interesse terapêutico com: 4-quinolona 1, ácido (2E,4E) abscísico 2 e ácido (2Z,4E) abscísico 3. Mercês

(2013), analisou o efeito antimicrobiano de méis de *Melipona asilvai*, *Melipona quadrifasciata anthidioides*, *Friseomelita doederleinei*, *Tetragonisca angustula* e *Plebeia* sp. e todas as amostras tiveram ação antimicrobiana contra a *Staphylococcus aureus*, E para *Escherichia coli* apenas os méis de *M. quadrifasciata anthidioides* e *Friseomelita doederleinei* apresentaram sensibilidade.

### 3.5 Bactérias indicadoras de Higienização

As bactérias do grupo dos coliformes fecais são usadas para medir a ocorrência e grau de higienização de poluição fecal em todo o alimento há cerca de 70 anos (SOUZA et al., 1983). Microrganismos indicadores são espécies que presentes em alimentos, podem fornecer informações sobre ocorrência de contaminação fecal, indicando condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção e armazenamento (FRANCO et al., 1996).

Os coliformes totais é um grupo que incluir as bactérias em forma de bastonetes Gram-negativos, não esporogênicos, anaer bios facultativos, que fermentam a lactose, com produ o de g s, em a 8 horas a C. endo encontrados em animais de sangue quente no trato gastrintestinal em humanos e animais. Os coliformes termotolerantes possuem as mesmas defini es dos totais, porém s s o capa es de fermentar a lactose com produ o de g s, em horas a , C A et al., .

Segundo Barreall (2002), para que algo seja considerado contaminado por bactérias de origem fecal, é necessário que estejam presentes em grande número nas fezes humanas e de animais. Cerca de 95% dos coliformes existentes nas fezes humanas e de outros animais são *E.coli* e, entre as bactérias de habitat fecal, dentro do grupo dos coliformes fecais a *E.coli* e a mais facilmente identificada (SILVA et al., 2004).

A *E. coli* é membro da Família Enterobacteriaceae, possui importância médica, podendo causar infecções no trato urinário, doenças diarréicas, meningite neonatal, sepse e hoje estando envolvida na maioria das infecções hospitalares (WHO, 1998; MIMS et al., 1999).

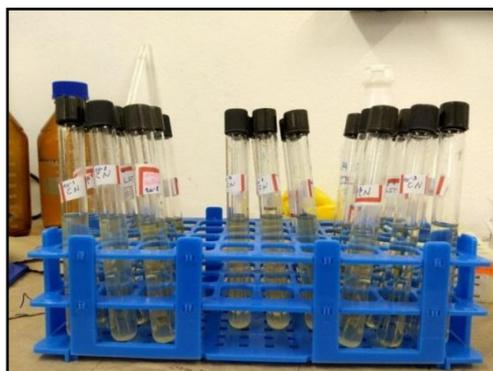
## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta das amostras

As amostras de mel foram coletadas das espécies de abelhas sem ferrão *Melipona asilvai* (manduri) do Meliponário da Unidade Acadêmica de Serra Talhada (UFRPE/UAST), com auxílio de Pipetador automático esterilizado as amostras foram colocadas em tubos de plásticos previamente esterilizados e levadas ao laboratório de pesquisa, em Microbiologia (LAPEEMI/UAST), onde foram diluídas e semeadas. Foram coletadas amostra de méis armazenadas há dois anos de *M. subnitida*, *scaptotrigona sp* e *Friosiometitta* de outros meliponários da região.

### 4.2 A Coliformes fecais totais e termotolerantes

Coliformes totais e termotolerantes foram determinados pelo método do número mais provável (NMP). Amostras de 1,0, 0,1 e 0,01 g de mel de *M. subnitida*, *scaptotrigona sp* e *Friosiometitta* foram inoculadas em series de três tubos de ensaio, totalizando nove tubos, contendo 9,0, 9,9 e 9,99 mL de Caldo Lauril Sulfato triptose (LST) (Himedia®), respectivamente, e tubos de Durhan invertidos para a realização do teste presuntivo (Foto 1). Uma alçada de cada tubo que apresentou crescimento e produção de gás no teste presuntivo foi retirada e repicada para uma nova serie de 9 tubos contendo caldo verde brilhante, que foram incubados a 35° C por 48h para determinar coliformes totais, e outra serie de nove tubos contendo caldo EC, que foram incubados a 45° C para determinar coliformes termotolerantes. As amostras de *M. asilvai* coletada do meliponário também foram submetidas teste usando mesma metodologia.



**Figura 1:** Tubos contendo 9 ml de caldo Lauril Triptose (LST) e tubos de Durhan invertidos.

### **4.3 Contagem das bactérias aeróbias mesófilas totais e fungos filamentosos**

Para a análise de bactérias aeróbias mesófilas totais e fungos filamentosos foram usados os méis armazenados a mais de dois anos *Frieseomelitta Melnina*, *Scaptotrigona sp.*, *Melipona subnitida*, *M. scutellaria*. As amostras de méis foram submetidas a diluições de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , diluindo-se 1,0 g de mel em 9,0 mL de salina 0,9%, logo em seguida foram colocadas 100  $\mu$ L de cada diluições sobre placa de Petri contendo meio ágar Padrão para a Contagem (NA), para bactérias totais e Agar Sabouraud com cloranfenicol para fungos filamentosos e leveduras, que foram espalhados com alça de Dricask. As placas foram incubadas a 35°C por 48h para o crescimento bacteriano e a 30° C por sete dias para o crescimento de fungos e leveduras, após o crescimento foi feito a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). As amostras de *M. asilvai* coletada do meliponário também foram submetidas a contagem de bactérias mesófilas totais e fungos filamentosos usando mesma metodologia acima,

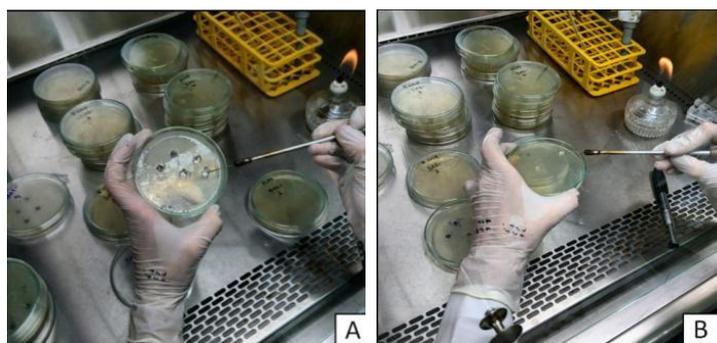
### **4.4 Isolamento das bactérias esporogênicas antagônicas**

Para isolamento das bactérias esporogênicas, foram feitas diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  das amostras de mel de *M. asilva* que em seguida foram incubadas em banho-maria a 80°C durante 20 minutos para eliminação de células vegetativas, adaptado de Vittori et al. (2008). Posteriormente 100 $\mu$ L de cada diluição foram plaqueadas em Ágar Nutriente-NA em duplicatas. As placas foram incubadas a 35°C por 72 horas para crescimento células esporogênicas. Após esse período foi selecionados 10 células bacterianas que cresceram após o banho maria.

### **4.5 Teste de antagonismo das bactérias esporogênicas**

Para o teste da atividade antagônica das bactérias que estavam presente no mel foram usadas duas bactérias patogênicas, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* ambas pertencentes ao laboratório de microbiologia da UAST que foram isoladas de casos clínicos. O teste de antagonismo foi

realizado segundo o método “bloco de gelose” descrito por Tern et al 006 . As bactérias gram-positivas isoladas foram confrontadas com as espécies patogênicas. Para isso, inicialmente, cada isolado, proveniente de uma cultura nova (máximo de 48h) foi colocado em solução salina a 0,9% e agitado em vórtex, para uma turvação de 3 ( $9 \times 10^8$  células por mL) na escala MacFarland, que possibilitasse a formação de um tapete de células na superfície do ágar Nutriente em placas de Petri. As placas foram incubadas por 24h a 35°C. Após o crescimento foram feitos discos de Agar contendo a cultura do isolado e em seguida colocados invertidos na superfície de ágar Mueller-Hinton semeado com o patógeno, mais um disco controle negativo. Para semear os patógenos-teste, as bactérias patogênicas estocadas foram previamente cultivadas em caldo nutriente a 35°C por 24-48h para revigorar as células. Em seguida, as culturas foram centrifugadas e lavadas com água destilada esterilizada. A partir do precipitado foram feitas suspensões celulares com turvação de 3 na escala de MacFarland. As suspensões foram semeadas em meio Ágar Muller-Hinton. As placas que foram semeadas com os patógenos, receptoras dos discos de cultura dos isolados (Figura 2), foram incubadas por 24-48h a 35°C. Os halos que se formaram ao redor dos discos de ágar Muller-Hilton indicaram o potencial antagonista frente aos patógenos. Os diâmetros dos halos foram mensurados em milímetro, com o auxílio de um paquímetro.



**Figura 2-** Na imagem (A), observa-se a retirada do disco com a bactérias isoladas do mel *Melipona asilvai* que foram submetidas ao banho maria. Na (B), colocando o disco sobre a placa contendo as bactérias patogênicas.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análise de coliformes totais e termotolerantes

Os méis das espécies *M. subnitidas*, *scaptotrigona* e *Friasiomelitta*, armazenados a mais de dois anos, apresentaram ausência testes presuntivos para coliformes fecais termotolerantes, assim como também o mel *M. asilvai* coletado diretamente da colônia apresentou negativo para presença.

### 5.2 Contagem de bactérias aeróbias mesófilas totais e fungos filamentosos

Em todas as amostras de méis armazenadas a mais de dois anos foi detectada a presença de bactérias aeróbias mesófilas totais em concentrações variando de  $2,9 \times 10^4$  a  $9,79 \times 10^4$  UFC/g de mel (Tabela 1). Não houve crescimento de fungos filamentosos em nenhuma das amostras.

**Tabela 1:** Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) das bactérias aeróbias mesófilas totais a partir de amostras de méis armazenadas.

Espécie	UFC/g de mel das Colmeias			MÉDIA
	Colônia 01	Colônia 02	Colônia 03	
<i>M. subnitida</i>	$9,79 \times 10^4$	$2,9 \times 10^4$	$6,82 \times 10^4$	$6,50 \times 10^4$
<i>Scaptotrigona</i>	$9,13 \times 10^4$	$8,21 \times 10^4$	$7,95 \times 10^4$	$8,43 \times 10^4$
<i>Friasiomelitta</i>	$5,72 \times 10^4$	-	-	$5,72 \times 10^4$

(-) não foi coletado amostra da colônia

O mel *M. asilvai* coletado diretamente da colônia e submetido a concentração de bactérias aeróbias mesófilas totais antes do teste esporogênico apresentou uma concentração de  $7,15 \times 10^4$  UFC/g de mel (colônia 1) e  $6,75 \times 10^4$  UFC/g de mel (colônia 2). Mostrando uma média de  $6,95 \times 10^4$  UFC/g de mel. As amostras também apresentaram negativo para crescimento de fungos filamentosos.

### 5.3 Teste de antagonismo das bactérias esporogênicas

O mel *Melipona asilvai* submetidos ao teste de esporogênico, apresentou 10 isolados contendo as possíveis bactérias antagônicas. Entres as

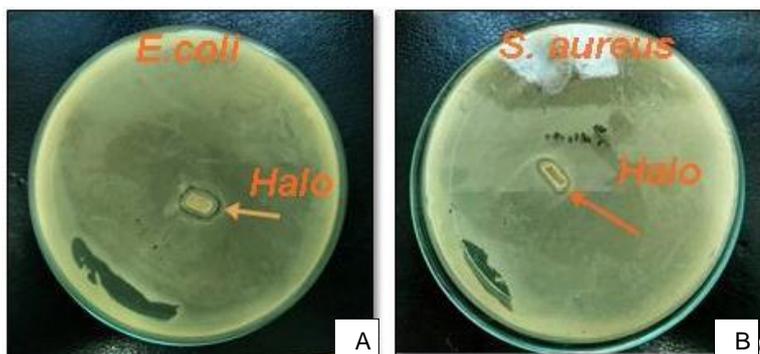
bactérias esporogênicas isoladas, 6 apresentaram resultados positivos com halo de inibição variando de 1 a 3 mm (tabela 2). Os isolados (SA1-1, SA1-3, SA1-4, SA1-5 e SA1-7) foram os que tiveram mais atividade antagônica contra o patógeno teste *Escherichia coli*. Para o patógeno teste *Staphylococcus aureus* apenas 1 isolado (SA1-6) apresentou sensibilidade.

**Tabela 2:** Resultado do teste de antagonismo *in vitro* Bloco de Gelose com as bactérias esporogênicas isoladas do mel da abelha Manduri (*Melipona asilvai*).

<b>MICROORGANISMOS PATOGENICOS</b>				
<b>Células Esporogênicas</b>				
	<b><i>Escherichia coli</i></b>	<b>Halo mm</b>	<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	<b>Halo mm</b>
SA 1-1	+	2	-	0
SA1-2	-	0	-	0
SA 1-3	+	2	-	0
SA 1-4	+	2	-	0
SA 1-5	+	3	-	0
SA 1-6	-	0	+	1
SA 1-7	+	1	-	0
SA 1-8	-	0	-	0
AS 1- 9	-	0	-	0
AS 1-10	-	0	-	0

(+) Positivo para sensibilidade ; (-) Negativo para sensibilidade

Na (figura 3), pode-se observa a sensibilidade que o mel *M. asilvai* apresentou frente a *E. coli* com halo de 2mm e frente *S. aureus* com halo de 1mm.



**Figura 3:** Teste de antibiograma bloco de gelose. Na imagem (A), halo de inibição contra *E.coli* de 2 mm. Na imagem (B), halo de inibição contra *S. aureus* de 1 mm.

## 6. DISCUSSÃO

A análise das amostras de méis armazenados há mais de dois anos e o mel coletado diretamente da colônia apresentaram ausência de coliformes fecais totais e termotolerantes, também houve ausência de fungos filamentosos. A inexistência desses microrganismos pode está relacionada aos fatores físico-químico extrínsecos que o mel das abelhas sem ferrão apresenta como temperatura, umidade, pH e atividade osmótica que acaba favorecendo condições de higiene da colmeia (MUNDO et al, 2004).

Sendo assim, a ausência dessas leveduras e fungos filamentosos e coliformes fecais, indica que os méis dessas espécies mantêm a sua qualidade microbiológica por longo período de tempo. No trabalho de Borsato (2013), foi observado, que os méis de *Melipona quadrifasciata*, *Scaptotrigona. bipunctata* e *Tretagonisca angustula*, os quais apresentam concentrações de açúcares acima de 50%, inibiram o crescimento de *E. coli*, porem não inibiram o crescimento de *S. aureus*. Esse resultado mostra que a linhagem *S. aureus* utilizado por esse autor é resistente ao estresse osmótico causado por elevadas concentrações de açúcar, porém o mel dos meliponíneos possui outros parâmetros físico-químicos que contribuem para uma longa durabilidade do mel (DE GOUVEIA et al, 2009).

Embora as concentrações de bactérias aeróbias mesófilas nas amostras tenham sido altas, variando de  $2,9 \times 10^4$  a  $9,79 \times 10^4$  UFC/g de mel, isso não significa que o mel dessas abelhas esteja contaminado por bactérias

patogênicas. O mel das abelhas sem ferrão possui naturalmente microrganismos em concentrações que variam de espécie para espécie, e se alguma outra bactéria patogênica contaminar o mel, elas acabam sendo incapazes de se reproduzir nesse substrato, devido principalmente aos elevados teores de açúcares presentes nesse alimento (PEREIRA, 2008). Foi observado que em amostras de méis de *Melipona fasciata* foram encontradas linhagens de *B. alvei* e *B. circulans* produtoras de ácidos orgânicos e antibióticos que inibem o crescimento de microrganismos contaminantes que deterioram o alimento estocado na colmeia (GILLIAM et al., 1990). Sendo assim, observa-se que essa alta concentração de microrganismo nos méis provavelmente promova proteção ao produto da colônia

Cinco isolados foram capazes de inibir o crescimento de *E. coli*. Esse resultado é promissor, uma vez que essa bactéria está relacionada a infecções em seres humanos (ROSSI, 2011). A *E. coli* é uma bactéria gram-negativa, encontrada no solo, na água, no intestino humano e de animais, sendo causadora de infecções, em especial no trato urinário e intestinais dos seres humanos (SHARMA et al., 2016).

Sendo assim, visto que as bactérias esporogênicas isoladas dos méis terem apresentado inibição contra essa cepa patogênica, demonstra o quanto o mel possui um potencial antimicrobiano que precisa ser investigado para exploração de moléculas bioativas. Segundo Gonçalves (2005), poucas pesquisas são direcionadas a conhecer as propriedades farmacológicas dos méis e produtos gerais produzidos pelas abelhas. Essas atividades farmacológicas produzidas por esses produtos das abelhas sem ferrão vão além de uma atividade microbiana, mas está influenciando diretamente na imunidade. Alves et al., (2008), demonstraram que o uso tópico do mel da espécie de *Melipona subnitida* sobre feridas infectadas de ratos, estimulou a cicatrização e redução da infecção por bactérias gram-positivas, demonstrando que o mel induz o sistema imunológico para produção de citocinas.

A menor inibição que as bactérias do mel apresentaram foi para *Staphylococcus aureus*, onde apenas 1 (um) isolado apresentou halo de inibição de 1 mm. Um dos motivos pode ser pelo fato dessa espécie de

bactéria ser gram-positiva. Esse tipo de bactéria apresenta membrana plasmática composto por varias camadas de peptidoglicano, que torna a parede celular espessa, assim dificultando penetração de substâncias antimicrobianas (TAVARES, 2000). Mas, a perda da capacidade de inativação antimicrobiana também pode estar relacionada a perda de efetividade das moléculas bioativas desses microrganismos ou a aquisição de resistência por parte do patógeno. Segundo Oliveira (2013), a capacidade dos microrganismos em produzir metabolitos secundários que forneçam uma substância natural bioativa, está relacionada a estímulos físicos, químicos e biológicos específicos que o organismo possui no ambiente onde se adaptou.

Guimarães (2010) explana que a bioprospecção é uma estratégia tradicional de realizar o isolamento de um microrganismo de seu hábitat natural, e essa técnica de isolamento pode acabar lavando a inativação do potencial bioativo. Oliveira (2013), descreveu que as técnicas genômicas evidenciam grande capacidade que os microrganismos possuem para produção de metabolitos secundários bioativos, concluindo que as técnicas tradicionais de cultivo, como a prospecção não permita acesso a essas substâncias produzidas na maior parte das vezes.

## **7. CONCLUSÃO**

- O mel das abelhas sem ferrão mantem a sua qualidade microbiológica por um período maior que dois anos. Sem a presença de coliformes fecais, fungo e leveduras que cause a deterioração do alimento.
- O mel dessas abelhas é um reservatório de bactérias aeróbias mesófilas totais, alóctones, resistentes a pressão osmótica imposta por este substrato.
- O mel dos meliponineos é um reservatório de bactérias esporogênicas que podem estar envolvidas na manutenção da sua qualidade microbiológica.
- Bactérias esporogênicas isoladas a partir do mel de Meliponíneos apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias patogênicas.

Desta maneira, esse estudo preliminar permitiu isolar bactérias méis abelhas sem ferrão, com potencial antimicrobiano que abra portas para pensar em uma nova forma de analisar este microbioma das colônias. Novas pesquisas precisam ser focadas nas técnicas genômicas e moleculares, afim que, se possa identificar a microbiota das abelhas nativas a um nível mais especioso. Assim, permitindo entender mais a ecologia dessas abelhas sem ferrão a ponto de encontrar moléculas bioativas que auxiliie na fabricação de medicamentos para saúde humana e preservação desses insetos.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLOGRÁFICAS**

ALMEIDA-MURADIAN, L. B. et al. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. **Journal of food composition and analysis**, v. 18, n. 1, p. 105-111, 2005.

ALVES, Diego Felipe Sampaio et al. Efeitos da aplicação tópica do mel de Melipona subnitida em feridas infectadas de ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 35, p. 188-193, 2008.

ANDERSON, K. E. et al. Hive-stored pollen of honey bees: Many lines of evidence are consistent with pollen preservation, not nutrient conversion. **Ecology**, v. 23, n. 23, p. 5904–5917, 2014.

BARRELL, R. et al. The microbiology of drinking water: water quality and public health. **Environment agency**, 2002.

BILUCA, Fabíola Carina et al. Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (Meliponinae). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 50, p. 61-69, 2016.

BOBANY, Denise de Mello et al. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO MEL DE ABELHAS JATAÍ (Tetragonisca angustula) EM CULTIVO DE MICRORGANISMOS DO CONDUTO AUDITIVO DE CANINOS DOMÉSTICOS (Canis familiaris). *Ciência Animal Brasileira*, v. 11, n. 2, 2010.

BORSATO, DÉBORA MARIA et al. Atividade antimicrobiana de méis produzidos por meliponíneos nativos do Paraná (Brasil). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 31, n. 1, 2013.

CHALCOFF, Vanina R. et al. Pollinator type and secondarily climate are related to nectar sugar composition across the angiosperms. **Evolutionary ecology**, v. 31, n. 4, p. 585-602, 2017.

CONTI, Raphael; GUIMARÃES, Denise O.; PUPO, Mônica T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 43-47, 2012.

DA PAIXÃO MELOA, Weilan Gomes et al. Pupa. 2019.

DA SILVA, Telma Maria G. et al. Análises químicas e potencial antioxidante do mel de Angico produzido pelas abelhas sem-ferrão jandaíra. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, p. 1370-1379, 2014.

DE GOUVEIA MENDES, Carolina et al. As análises de mel: revisão. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 2, 2009.

DOUGLAS, A. E. Symbiotic microorganisms in insects. **Encyclop. Microbiol.**, v. 4, p. 526-537, 2000.

ENGEL, Philipp; MORAN, Nancy A. A microbiota intestinal de insetos - diversidade em estrutura e função. Revisões de microbiologia FEMS , v. 37, n. 5, pág. 699-735, 2013.

FAULKNER, D. John. Destaques da química de produtos naturais marinhos (1972–1999). **Relatórios de produtos naturais** , v. 17, n. 1, pág. 1-6, 2000.

FLETCHER, Mary T. et al. Mel de abelha sem ferrão, uma nova fonte de trealulose: um dissacarídeo biologicamente ativo com benefícios para a saúde. **Relatórios científicos** , v. 10, n. 1, pág. 1-8, 2020.

FRANCA-ROCHA, Washington et al. Levantamento da cobertura vegetal e do uso do solo do Bioma Caatinga. **Anais XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. INPE, Florianópolis, SC, Brazil**, p. 2629-2636, 2007.

FRANCO, B. D. G. M., LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu 182 p. 1996.

FRIGERIO, Christian. *Optimização e influência na bioatividade do processo de secagem por radiação infravermelha de pólen apícola*. 2010.

GAIN, E. G. A metagenomic analysis of the honey bee gut microbiome following oral imidacloprid exposure. Master of Science in Biology (Middle Tennessee State University). p. 33. 2018. [www.jewlscholar.mtsu.edu](http://www.jewlscholar.mtsu.edu)

GEBHARDT, Klaus et al. Screening for biologically active metabolites with endosymbiotic bacilli isolated from arthropods. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, n. 2, p. 199-205, 2002.

GEBHARDT, Klaus et al. Triagem de metabólitos biologicamente ativos com bacilos endossimbióticos isolados de artrópodes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, n. 2, pág. 199-205, 2002.

GAM, M. Microbiology of pollen and bee bread : the genus bacillus. v. 10, n. 3, p. 269–274, 1979.

GILLIAM, M.; ROUBIK, D. W.; LORENZ, B. J. Microorganisms associated with pollen, honey, and brood provisions in the nest of a stingless bee, *Melipona fasciata*. **Apidologie**, v. 21, n. 2, p. 89-97, 1990.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Atividade antimicrobiana do mel da abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera: Apidae, Meliponini). *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 72, n. 4, p. 445-459, 2005.

GRÜTER, Christoph. *Abelhas sem ferrão*. Cham, Suíça: Springer International Publishing, 2020.

GUEDES, Débora Cristina de Pádua. **Compostos bioativos do pólen**. 2014. Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 3, 667-679, 2010. ISSN 1678-7064 online version.

GUPTA, Piyush B. et al. Identificação de inibidores seletivos de células-tronco cancerosas por triagem de alto rendimento. **Cell** , v. 138, n. 4, pág. 645-659, 2009.

IBGE. Mapa de Vegetação do Brasil. Rio de Janeiro, IBGE. 1993.

IMPERATRIZ-FONSECA, Vera Lucia; CONTRERA, Felipe Andrés León; KLEINERT, Astrid Matos Peixoto. A meliponicultura e a iniciativa brasileira dos polinizadores. In: **XV Congresso Brasileiro Apicultura/I Congresso Brasileiro Meliponicultura (Natal-RN)**. 2004. p. 1-7. *International Journal of Food Microbiology*, Geneva, v.97.

KWONG, Waldan K. et al. Evolução do microbioma dinâmico em abelhas sociais. **Science Advances** , v. 3, n. 3, pág. e1600513, 2017.

MACHADO, J. O. (1971). Simbiose entre as abelhas sociais brasileiras (Meliponinae, Apidae) e uma espécie de bactéria. *Ciência e Cultura* 23(5): 625-633.

MATARRITA-CARRANZA, Bernal et al. Evidência de associações generalizadas entre insetos himenópteros neotropicais e actinobactérias. **Fronteiras em microbiologia** , v. 8, p. 2016, 2017.

MATTILA, HR; OTIS, GW Efeitos da disponibilidade de pólen e infecção por *Nosema* durante a primavera na divisão do trabalho e sobrevivência de abelhas operárias (Hymenoptera: Apidae). **Entomologia ambiental** , v. 35, n. 3, pág. 708-717, 2006.

MEINWALD, Jerrold. Produtos naturais como mensageiros moleculares. **Jornal de produtos naturais** , v. 74, n. 3, pág. 305-309, 2011.

MELLO, H. *Bacillus cereuse* *Bacillus subtilis* na suplementação dietária de juvenis de Tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e seu efeito probiótico. 2012. 57 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Pesca: Área de concentração em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2012.

MENEGATTI, Carla et al. *Paenibacillus polymyxa* associado à abelha sem ferrão *Melipona scutellaris* produz compostos antimicrobianos contra

entomopatógenos. **Jornal de ecologia química** , v. 44, n. 12, pág. 1158-1169, 2018.

MENEZES, Cristiano et al. O papel de microorganismos úteis para abelhas sem ferrão e apicultura sem ferrão. In: **Pot-Honey** . Springer, New York, NY, 2013. p. 153-171.

MERCÊS, Manuela Dória et al. Atividade antimicrobiana de méis de cinco espécies de abelhas brasileiras sem ferrão. **Ciência Rural**, v. 43, n. 4, p. 672-675, 2013.

MICHENER, C. D. The bees of the world. p.809. Kansas, 2007.

MIMS. Et al. Microbiologia Médica. 2 ed. São Paulo: Manole, 1999.

MOLAN, P. C.; RUSSELL, K. M. Non-peroxide antibacterial activity in some New Zealand honeys. **Journal of Apicultural Research**, v. 27, n. 1, p. 62-67, 1988.

MUNDO, Melissa A.; PADILLA-ZAKOUR, Olga I.; WOROBO, Randy W. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. **International journal of food microbiology**, v. 97, n. 1, p. 1-8, 2004.

MURADIAN, Roldan; PELUPESSY, Wim. Governando a cadeia do café: o papel dos sistemas regulatórios voluntários. **Desenvolvimento Mundial** , v. 33, n. 12, pág. 2029-2044, 2005.

NEWMAN, David J .; CRAGG, Gordon M. Produtos naturais como fontes de novas drogas ao longo dos 30 anos de 1981 a 2010. **Journal of natural products** , v. 75, n. 3, pág. 311-335, 2012.

NOGUEIRA-NETO, P. 446. Vida e Criação de Abelhas Indígenas Sem Ferrão. São Paulo: Ed. Nogueirapis, 1997.

OHASHI, Kazuaki; NATORI, Shunji; KUBO, Takeo. Expressão de amilase e glicose oxidase na glândula hipofaríngea com mudança de papel dependente da idade da abelha operária (*Apis mellifera* L.). **European Journal of Biochemistry** , v. 265, n. 1, pág. 127-133, 1999.

OLAITAN, P. B.; ADELEKE, O. E.; OLA, I. O. Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. **African Health Sciences**, Kampala (Uganda), v. 7, n. 3, p. 159-165, 2007.

OLIVEIRA, Luciana Gonzaga de; PUPO, Mônica Tallarico; VIEIRA, Paulo Cezar. Explorando produtos naturais microbianos nas fronteiras da química e da biologia. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1577-1586, 2013.

PEREIRA, Ana Paula. **Caracterização de mel com vista à produção de hidromel**. 2008. Tese de Doutorado. Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária.

PINTO, Angelo C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

RIBEIRO, João G.; SILVA, R. A. Estudo comparativo da qualidade de pólen apícola fresco, recém processado, não processado e armazenado em freezer e pólen de marca comercial através de análises físico-químicas. **Tecnologia & Desenvolvimento Sustentável**, v. 1, n. 1, p. 33-47, 2007.

RODRÍGUEZ-MALAVÉ, Antonio Jesús. Atividade antioxidante do mel de maconha. In: **Pot-Honey**. Springer, New York, NY, 2013. p. 475-480.

ROSALES, Genoveva R. Ocampo. Medicinal uses of *Melipona beecheii* honey, by the ancient Maya. In: **Pot-Honey**. Springer, New York, NY, 2013. p. 229-240.

ROSSI, Flávia. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical infectious diseases**, v. 52, n. 9, p. 1138-1143, 2011.

SHARMA, G. et al. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. **Journal of applied microbiology**, v. 121, n. 2, p. 309-319, 2016.

SILVA N.; NETO R. C.; JUNQUEIRA V. C. A.; SILVEIRA N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológico de água**. Campinas: ITAL/Núcleo de microbiologia, 2004.

SILVA, N.; NETO R. C.; JUNQUEIRA V. C. A.; SILVEIRA N. F. A.; Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: **Livraria Varela**, 1997.

SILVA, Wagner Pereira; PAZ, J. R. L. Abelhas sem ferrão: muito mais do que uma importância econômica. **Natureza online**, v. 10, p. 146-152, 2012.

Silveira FA, Melo GAR, Almeida EAB. 2002. Abelhas brasileiras. Sistemática e identificação. Fundação Araucária; Belo Horizonte, Brasil. 253 pp.

SOUZA L.C.; IARIA S.T.; PAIM G.V.; LOPES, C.A.M. Bactérias coliformes totais e coliformes de origem fecal em águas usadas na dessedentação de animais. **Ver. Saúde Pública**. S. Paulo, 17:112-22, 1983.

SOUZA, Bruno A. et al. Composition of stingless bee honey: setting quality standards. **Interciencia**, v. 31, n. 12, p. 867-875, 2006.

TAVARES, Walter et al. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

TOMÁS-BARBERÁN, Francisco A.; TRUCHADO, Pilar; FERRERES, Federico. Flavonóides em méis de abelhas sem ferrão e abelhas. In: **Pot-Honey**. Springer, New York, NY, 2013. p. 461-474.

VAN ARNAM, E.B.; CURRIE, C.R.; CLARDY, J. Defense contracts: molecular protection in insect-microbe symbioses. *Chemical Society Reviews*, v. 47, p. 1638-1651, 2018.

VIT, Patricia; PEDRO, Silvia RM; ROUBIK, David (Ed.). **Pote de mel: um legado de abelhas sem ferrão**. Springer Science & Business Media, 2013.

VITTORI, Juliano et al. Qualidade microbiológica de leite UHT caprino: pesquisa de bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Bacillus* e *Clostridium*. **Ciência Rural**, v. 38, p. 761-765, 2008.

VOLLERT-NETO, A. et al. Newly emerged workers of the stingless bee *Scaptotrigona aff depilis* prefer stored pollen to fresh pollen. 2016.

WHO- World Health Organization. Guidelines for Drinking Water Quality- Vol 2, Recommendations. Geneva: WHO, p. 8-29, 1998.

ZANELLA, Fernando César Vieira; MARTINS, Celso Feitosa. Abelhas da Caatinga: biogeografia, ecologia e conservação. **Ecologia e conservação da Caatinga**, p. 75-134, 2003.

ZANELLA, Fernando CV. The bees of the Caatinga (Hymenoptera, Apoidea, Apiformes): a species list and comparative notes regarding their distribution. **Apidologie**, v. 31, n. 5, p. 579-592, 2000.