

**UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

DISSERTAÇÃO

Propriedades Prebióticas e Antimicrobianas de Mel de Abelha

Lívia Nolasco Macedo

2007



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

**PROPRIEDADES PREBIÓTICAS E ANTIMICROBIANAS DE MEL DE
ABELHA**

LÍVIA NOLASCO MACEDO

Sob a Orientação da Professora
Rosa Helena Luchese

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica - RJ
Agosto de 2007

638.16

M141p

T

Macedo, Livia Nolasco, 1982-
Propriedades prebióticas e
antimicrobianas de mel de abelha/ Livia
Nolasco Macedo. - 2007.
58 f. : il.

Orientador: Rosa Helena Luchese.
Dissertação (mestrado)- Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto
de Tecnologia.

Bibliografia: f. 46-58.

1. Mel de abelha - Teses. 2. Mel de
abelha - Microbiologia - Teses. 3.
Lactobacilo - Teses. 4. Bactérias
produtoras de ácido láctico - Teses I.
Luchese, Rosa Helena, 1957- II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Instituto de Tecnologia. III.
Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

LÍVIA NOLASCO MACEDO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27 / 08 / 2007

Rosa Helena Luchese, PhD
DTA/IT/UFRRJ
(Orientadora)

Dr. Ismael Maciel de Mancilha
Escola de Engenharia de Lorena –EEL
(membro)

Dr.^a Regina Silva de Siqueira
CTAA- Embrapa
(membro)

Dr. José Francisco Pereira Martins
DTA/IT/UFRRJ
(suplente)

Aos meus queridos pais Ana Maria e Gilson, pelo amor a mim dedicado.

*Ao meu amado Rodrigo, por ter me dado força e carinho
ao longo de oito anos.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar meu caminho e me dar forças para alcançar meus objetivos.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a **Rosa Helena Luchese**, pela confiança em meu trabalho, pela paciência, pelos ensinamentos, atenção e incentivo constante.

Aos meus preciosos pais **Ana Maria e Gilson**, que sempre colocaram a felicidade das suas filhas em primeiro lugar, sempre nos apoiando, sempre nos amando, sempre nos incentivando sempre nos ensinando. Obrigada por estarem sempre presentes em minha vida, obrigada por tudo. À vocês, a minha eterna gratidão e todo o meu amor e admiração. Tenho muita sorte de ter pais maravilhosos como vocês.

Ao meu noivo **Rodrigo**, pelo carinho, amor e companheirismo, pela paciência, dedicação, amizade e preciosos conselhos.

À minha irmã e melhor amiga **Luciana**, uma pessoa mais que especial. Obrigada por tudo, pela compreensão, atenção, conselhos, amizade, por acreditar em mim sempre e não me abandonar nunca.

À minha irmã **Laís**, uma pessoa maravilhosa, que apesar dos desentendimentos nos amamos muito, obrigada pela amizade, pelo apoio e confiança.

Ao meu **Tio Márcio**, por toda atenção prestada a mim e às minhas irmãs, por nos ter como filhas, nos incentivando, nos apoiando e nos ensinando a lutar sempre.

Às minhas queridas avós **Clara e Maria Augusta**, pelos paparcos, pelos conselhos e por fazer-me sentir amada.

Ao avô mais lindo do mundo **José** (*in memoriam*), por ter me feito rir e por me amar. Muita saudade!

Ao amigo **André**, pela grande e excelente contribuição para a realização deste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, **Rachel, Viviane, Ediná, Erlene e Rômulo** pela grande ajuda prática prestada a este trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Físico Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, **Juarez e Luciana**, pela ajuda em análises físico-químicas de Mel.

Ao apicultor **Luís** e ao meliponicultor **José Dias**, por terem fornecido as amostras de Mel pesquisadas.

Ao professor **Celso Guimarães Barbosa** pela contribuição nas análises estatísticas.

À professora **Sandra Gregório**, pelas sugestões e ajuda em análises físico-químicas.

À **Lucimar**, por todos os serviços prestados.

À **CAPES**, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos **Funcionários e Professores** do Departamento de Tecnologia e Alimentos.

Aos meus eternos amigos que mesmo longe estarão em meu coração, **Mirian, Deise, Veridiana, Sarita, Saulo, Karla, Lívia, Maíra, Cecília, Carina e Fábio**, pelos grandes momentos de alegria e descontração. Adoro muito todos vocês.

Aos **amigos** de mestrado e todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

MACEDO, Livia Nolasco. **Propriedades Prebióticas e Antimicrobianas de Mel de Abelha**. 2007. 58p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Microbiologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica- RJ, 2007.

Os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, por estimularem seletivamente a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon, as chamadas bactérias probióticas, como bifidobactérias e lactobacilos. Presume-se que o mel de abelha possa exercer efeito prebiótico sobre a microbiota colônica intestinal, por conter uma série de oligossacarídeos, compostos reconhecidos como prebióticos. Por outro lado, o mel apresenta propriedades antimicrobianas inerentes que limitam a sobrevivência e o desenvolvimento da grande maioria dos microrganismos, como alta pressão osmótica e baixo pH, entre outros. O presente estudo teve como objetivo estudar as propriedades prebióticas e antimicrobianas do mel de abelhas brasileiras e européias. Foram utilizadas as culturas probióticas *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactobacillus casei*-01 e *Bifidobacterium* BB-12 (Christian Hansen®), *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* (Sacco®), e *L. casei* Shirota. O crescimento e a viabilidade destas culturas durante o armazenamento foi determinada em leite em pó desnatado reconstituído a 12% adicionado de 3% (p/v) de mel de *Apis mellifera* previamente pasteurizado. Foram preparados controles sem mel. Em intervalos de 23; 35 e 46 dias, foram coletadas amostras para determinação do número de células viáveis, pH e acidez titulável. Todos os cultivos mantiveram-se viáveis por 46 dias a 7°C independente da adição de mel. A adição de mel ao leite não resultou em efeito prebiótico sobre as linhagens de lactobacilos. Por outro lado, as linhagens de bifidobactérias, produziram mais ácido na presença de mel ($p < 0,05$) e mostraram capacidade de adaptação em pH reduzido e altos níveis de acidez, maior que aquela normalmente aceita como limite para crescimento de bactérias bífidas, especialmente a linhagem *B. lactis* Sacco®. O maior número de células viáveis foi observado nos cultivos de *L. casei*-01 e *L. casei* Shirota contendo mel ($> 9,0 \log_{10}$ UFC/mL) e o menor crescimento ($6,11 \log_{10}$ UFC/mL) e a menor acidificação (0.30%) no 46º dia foi observada nos cultivos de *B. BB-12*, sem adição de mel. Para o teste de resistência a sais biliares foi utilizado caldo MRS adicionado de 0,3% oxgall e 3% de mel. Em intervalos de 3, 6, 12, 24, 30 e 36 horas foram feitas leituras da densidade ótica. Todos os probióticos foram parcialmente inibidos pela presença de sais biliares durante as primeiras 6 horas de incubação. O mel não contribuiu para aumentar significativamente ($p > 0,05$) o crescimento das bactérias probióticas na presença de sais biliares. A atividade antimicrobiana dos diferentes tipos de mel foi determinada pela técnica de difusão em agar, utilizando mel de *Apis* e de *Melipona* com diferentes tratamentos (filtrado e pasteurizado). As culturas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) e *Listeria innocua* foram resistentes, enquanto as culturas de *Salmonella Typhimurium* e *E. coli* ATCC 25922 apresentaram sensibilidade, sendo o efeito do mel de *Apis* resultante do aumento da pressão osmótica, já que os controles com glicose apresentaram efeito similar.

Palavras - chave: mel, lactobacilos, bifidobactérias, prebiótico.

ABSTRACT

MACEDO, Livia Nolasco. Prebiotic and Antimicrobial Properties of Honey Bee. 2007. 58p. Dissertation (M.Sc. in Food Science and Technology, Food Microbiology). Institute of Technology, Department of Food Technology. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica- RJ, 2007.

The prebiotics are non-digestible food components that improve host health by selectively stimulating, the growth and/or activity of desirable bacteria populations in the colon, such as bifidobacteria and lactobacilli. It is believed that honey bee may exert a prebiotic effect on the microbial population of the colon as it contains a series of oligosaccharides, which are well known prebiotic compounds. On the other hand, the honey presents inherent antimicrobial properties that limit the survival and the development of the great majority of the microorganisms, such as high osmotic pressure, low pH, among others factors. The aim of the work was to study the prebiotic and antimicrobial properties of honeys from Brazilian and European bees. The probiotics cultures employed were *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactobacillus casei*-01 e *Bifidobacterium* BB-12 (Christian Hansen®), *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* (Sacco®), and *L. casei* Shirota. Growth and viability of the cultures along the storage, was determined in reconstituted nonfat dry milk, containing 3% (wt/vol) of *Apis mellifera* pasteurized honey. Controls without honey were prepared. At 23, 35 and 46 day interval, samples were collected for determination of the viable cell number, pH and titrable acidity. All cultures remained viable for up 46 days at 7°C despite of being added of honey. The addition of honey to milk did not result in prebiotic effect for lactobacilli. However, bifidobacteria strains produced more acid in the presence of honey ($p < 0,05$) and shown an ability to adapt at low pH and high acidic conditions higher than that is normally accept as a limit for bifidobacteria growth, especially the strain *B. lactis* Sacco®. At the 46° day of storage, the higher cell counts was observed with *L. casei*-01 e *L. casei* Shirota ($>9,0 \log_{10}$ CFU/g) cultures in the presence of honey, whereas the lowest growth ($6.11 \log$ CFU/mL) and acidity (0,30%) was observed with *B. BB-12* in the absence of honey. Probiotic resistance to bile salts, was evaluated using MRS broth added of 0,3% oxgall and 3% honey. Optical density was measured at 3, 6, 12, 24, 30 and 36 hours intervals. All probiotics were partially inhibited by bile salts during the first 6 hours of incubation. The honey did not contribute for a significant increase ($p > 0,05$) on growth of probiotic bacteria in the presence of bile salts. The antimicrobial activity of different types of honey was determined by agar diffusion technique, using *Apis* and *Melipona* honeys (filter sterilized and pasteurized). *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) and *Listeria innocua* were resistant, whereas *Salmonella Typhimurium* and *E. coli* ATCC 25922 cultures were sensible. However the effect of *Apis* honey was due only the result of the increase of osmotic pressure, as the controls with glucose showed similar response.

Key-words: honey, lactobacilli, bifidobacteria, prebiotic.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios de açúcares redutores, umidade, atividade de água e acidez titulável de mel de <i>Apis</i> e <i>Melipona</i>	26
Tabela 2. Valores médios de contagem de células viáveis em placas, acidez titulável e pH obtidos durante armazenamento de 0, 23, 35 e 46 dias, de leite fermentado por lactobacilos.	28
Tabela 3 Valores médios de contagem de células viáveis em placas, acidez titulável e pH obtidos durante armazenamento de 0, 23, 35 e 46 dias, de leite fermentado por bifidobactérias.	29
Tabela 4. Valores médios de densidade ótica referente ao crescimento de lactobacilos em presença de mel filtrado com e sem sais biliares e sua resistência aos sais.....	34
Tabela 5. Valores médios de densidade ótica referente ao crescimento de lactobacilos em presença de mel pasteurizado com e sem sais biliares e sua resistência aos sais.....	35
Tabela 6. Valores médios de densidade ótica referente ao crescimento de bifidobactérias na presença de mel pasteurizado ou filtrado com e sem sais biliares e resistência na presença de sais.....	40
Tabela 7. Valores médios dos halos de inibição de diferentes concentrações de méis de <i>Apis</i> e de Mandaçaia em comparação com seus respectivos controles contendo diferentes concentrações de açúcar redutor.	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colônia de mandaçaia (A); abertura feita de barro por abelha mandaçaia (B).....	18
Figura 2. Purgação com nitrogênio (A); recravação dos frascos (B).....	24
Figura 3. Processo de perfuração dos poços na placa de Petri (A); distribuição das soluções de mel e glicose nos poços da placa de Petri.....	25
Figura 4. Formação de halos de inibição de mel de Mandaçaia sobre <i>Salmonella Typhimurium</i> (A); medição dos halos de inibição com auxílio de paquímetro (B).....	25
Figura 5. Crescimento de <i>L. acidophilus</i> (Chr. Han.) em 0,3% de sais biliares na presença de mel filtrado e controles com e sem glicose (A); em presença de mel filtrado e controles com e sem glicose na ausência de sais (B).....	36
Figura 6. Crescimento de <i>L. acidophilus</i> (Chr. Han.) em 0,3% de sais biliares na presença de mel pasteurizado e controles com e sem glicose (A); em presença de mel pasteurizado e controles com e sem glicose na ausência de sais (B).....	36
Figura 7. Crescimento de <i>L. casei - 01</i> (Chr. Han.) em 0,3% de sais biliares na presença de mel filtrado e controles com e sem glicose (A); em presença de mel filtrado e controles com e sem glicose na ausência de sais (B).....	37
Figura 8. Crescimento de <i>L. casei -01</i> (Chr. Han.) em 0,3% de sais biliares na presença de mel pasteurizado e controles com e sem glicose (A); em presença de mel pasteurizado e controles com e sem glicose na ausência de sais (B).....	37
Figura 9. Crescimento de <i>L. acidophilus</i> (Sacco) em 0,3% de sais biliares na presença de mel filtrado e controles com e sem glicose (A); em presença de mel filtrado e controles com e sem glicose na ausência de sais (B).....	39
Figura 10. Crescimento de <i>L. acidophilus</i> (Sacco) em 0,3% de sais biliares na presença de mel pasteurizado e controles com e sem glicose (A); em presença de mel pasteurizado e controles com e sem glicose na ausência de sais (B).....	39
Figura 11. Crescimento de <i>B. BB-12</i> (Chr. Han.) em 0,3% de sais biliares na presença de mel (pasteurizado e filtrado) e controles com e sem glicose (A); em presença de mel (pasteurizado e filtrado) e controles com e sem glicose na ausência de sais (B).....	41
Figura 12. Crescimento de <i>B. lactis</i> Sacco® em 0,3% de sais biliares na presença de mel (pasteurizado e filtrado) e controles com e sem glicose (A); em presença de mel (pasteurizado e filtrado) e controles com e sem glicose na ausência de sais (B).....	41
Figura 13. Atividade antimicrobiana de mel de <i>Apis</i> (A) e de Mandaçaia sobre <i>Salmonella Typhimurium</i> (B).....	43

Figura 14: Atividade antimicrobiana de mel de *Apis* (A) e de Mandaçaia sobre *Escherichia coli* (B).....43

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Espécies que integram os gêneros <i>Bifidobacterium</i> e <i>Lactobacillus</i>	6
Quadro 2. Composição básica do mel.....	15

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1 Objetivo Geral	2
2.2 Objetivos Específicos	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	2
3.1 Alimentos Funcionais	2
3.2 Bactérias Ácido-láticas	3
3.3 Principais Gêneros de Bactérias Lácticas Utilizadas como Probióticos	4
3.3.1 Gênero <i>Lactobacillus</i>	4
3.3.2 Gênero <i>Bifidobacterium</i>	5
3.4 Ecologia Microbiana do Trato Gastrointestinal Humano e sua Relação com os Probióticos e Prebióticos	7
3.5 Prebióticos: Definição e Efeitos Benéficos	8
3.6 Probióticos: Definição e Efeitos Benéficos	11
3.7 Mel	13
3.7.1 Definição e composição físico-química	13
3.7.2 Propriedade antimicrobiana e outras aplicações do mel	15
3.8 Mel de Abelhas Brasileiras	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Obtenção e Caracterização das Amostras de Mel	19
4.2 Microrganismos Probióticos	19
4.3 Outros Microrganismos	20
4.4 Análises Físico-Químicas dos Diferentes Tipos de Mel	20
4.4.1 Açúcares redutores	20
4.4.2 Acidez titulável	20
4.4.3 Atividade de água (Aa)	20
4.4.4 Umidade	21
4.5 Avaliação do Desempenho de Bactérias Probióticas em Leite Desnatado Adicionado de Mel	21
4.5.1 Mel	21
4.5.2 Preparação dos leites fermentados	21

4.5.3 Determinação de pH e acidez dos leites fermentados	21
4.5.4 Quantificações dos microrganismos probióticos	22
4.6 Avaliação do Crescimento e Resistência a Sais Biliares das Culturas Probióticas em Caldo MRS adicionado de Mel	22
4.6.1 Efeito do mel e dos sais biliares sobre lactobacilos	22
4.6.2 Efeito do mel e dos sais biliares sobre bifidobactérias	23
4.7 Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Diferentes Tipos de Mel	24
4.7.1 Mel	24
4.7.2 Soluções de glicose	24
4.7.3 Avaliação do efeito de inibição	24
4.8 Análise Estatística	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1 Características Físico-químicas das Amostras de Mel	26
5.2 Potencial Prebiótico de Mel Sobre o Desempenho de Bactérias Probióticas em Leite Fermentado	27
5.3 Crescimento e Resistência a Sais Biliares em Caldo MRS adicionado de Mel	33
5.3.1 Crescimento e resistência de lactobacilos	33
5.3.2 Crescimento e resistência de bifidobactérias	40
5.4 Atividade Antimicrobiana de Mel de <i>Apis mellifera</i> e de Abelha sem Ferrão (<i>Melipona quadrifasciata</i>)	42
6. CONCLUSÕES	45
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

Os consumidores vêm se tornando cada vez mais conscientes da importância da alimentação para a saúde, buscando consumir alimentos que além de saudáveis, sejam capazes de prevenir doenças.

Alimento funcional é todo alimento que oferece um efeito benéfico, além do valor nutritivo inerente à sua composição química podendo contribuir na prevenção e tratamento de doenças (ANJO, 2004). Os prebióticos e probióticos podem ser citados como um dos principais ingredientes responsáveis pela funcionalidade desses produtos.

Os probióticos são definidos como uma cultura simples ou mista de microrganismos vivos, os quais beneficiam o homem ou os animais por meio da melhoria das propriedades da microbiota intestinal (HOLZAPFEL e SCHILLINGER, 2002).

Os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, por estimularem seletivamente a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon. Adicionalmente, o prebiótico pode inibir a multiplicação de patógenos, garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro (SAAD, 2006).

Os simbióticos são produtos que contêm a mistura de probiótico e prebiótico. Por exemplo, fruto-oligossacarídeos + bifidobactéria, lactitol + lactobacilos.

Dentre os principais prebióticos que têm recebido maior atenção, destacam-se a inulina e os oligossacarídeos, especialmente os frutooligossacarídeos (USTUNOL, 2005).

Crittenden e Playne (1996) definem os oligossacarídeos como glicosídeos que contêm entre três e dez monossacarídeos. Entretanto, outros autores definem oligossacarídeos como carboidratos que possuem um baixo grau de polimerização (de 2 a 20) e conseqüentemente, baixa massa molecular (ROBERFROID e SLAVIN, 2000).

Os oligossacarídeos são açúcares encontrados como componentes naturais em muitos alimentos como frutas, vegetais, leite e mel. Alguns desses não apresentam apenas a função nutricional ou de adoçante, mas também exibem atividade fisiológica, sendo assim denominados de alimento funcional (ALMEIDA e PASTORE, 2004).

Sugere-se que o mel possa exercer efeito prebiótico sobre a população de lactobacilos e bifidobactérias do colon, por conter uma série de oligossacarídeos (LEITE et al., 2000). Segundo Anjo (2004), o mel é um alimento funcional que exerce a atividade de prebiótico e tem como efeito, a regulação do trânsito intestinal, regulação da pressão arterial, redução do risco de câncer e dos níveis de colesterol. Por outro lado o mel apresenta propriedades antimicrobianas inerentes que limitam a sobrevivência e o desenvolvimento da grande maioria dos microrganismos. Vários fatores contribuem para a atividade antimicrobiana do mel, por exemplo, alta pressão osmótica, baixa atividade de água (Aa), baixo pH, baixo conteúdo protéico, alta taxa carbono nitrogênio, baixo potencial de redox (Eh) devido ao alto conteúdo de açúcares redutores e baixo teor de oxigênio dissolvido devido à alta viscosidade que impede a formação de correntes de convecção e limita a aeração (MOLAN, 1992).

Ao mel de abelha sem ferrão, além de propriedades antimicrobianas, têm sido atribuídas propriedades terapêuticas. Entretanto, são poucos os trabalhos publicados nesta área e muitas destas atribuições ainda carece de comprovação científica.

O mel poderia exercer dois tipos de efeito prebiótico, um direto e um indireto. Primeiramente poderia estimular o crescimento de bactérias probióticas por conter várias cadeias de oligossacarídeos e, ao mesmo tempo poderia inibir microrganismos indesejáveis. Portanto, além de suas características medicinais e nutricionais possuem também características funcionais importantes. Contudo o estudo dessas propriedades benéficas devem ser melhor estudadas.

2 OBJETIVOS

2.2 Objetivo Geral

Estudar as propriedades prebióticas e antimicrobianas de mel de abelhas brasileiras e européias.

2.3 Objetivos Específicos

- Estudar o efeito do mel de *Apis mellifera* sobre o crescimento e viabilidade das culturas probióticas em leite fermentado durante 46 dias armazenados à 7°C.
- Determinar o crescimento e resistência aos sais biliares de lactobacilos e bifidobactérias em caldo MRS adicionado de mel de *Apis mellifera*.
- Verificar a atividade antimicrobiana de mel de *Apis mellifera* e *Melipona quadrifasciata* sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Salmonella Typhimurium* e *Listeria innocua*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Alimentos Funcionais

Os consumidores vêm se tornando cada vez mais conscientes da importância da alimentação para a saúde, buscando consumir alimentos que além de saudáveis, sejam capazes de prevenir doenças. Assim, se estabeleceu em muitos países o mercado dos produtos funcionais (BISTROM e NORDSTROM, 2002).

O alimento funcional, além de suas funções nutricionais como fonte de energia e de substrato para a formação de células e tecidos, possui em sua composição uma ou mais substâncias que atuam modulando e ativando os processos metabólicos. Conseqüentemente, melhora as condições de saúde pelo aumento da efetividade do sistema imunológico, promovendo o bem-estar das pessoas e prevenindo o aparecimento precoce de alterações patológicas e de doenças degenerativas (PARK, KOO e CARVALHO, 1997; SGARBIERI e PACHECO, 1999).

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 (SANDERS, 1998).

O termo alimento funcional foi primeiramente introduzido no Japão em meados da década de oitenta (HASLER, 1996). Desde então, observa-se um crescente interesse pelos

alimentos que apresentam componentes ou substâncias funcionais, ou seja, aqueles que ajustam ou modulam o sistema fisiológico do organismo de modo a promover a saúde (PARK, KOO e CARVALHO, 1997).

Segundo Stanton et al., (2005) o mercado global dos alimentos funcionais abrange crescimento significativo, com um rendimento anual estimado em mais de 50 bilhões de dólares. O maior segmento desse mercado encontra-se na Europa, Japão e Austrália e compreende alimentos contendo probióticos, prebióticos e simbióticos. No Japão pode-se encontrar mais de 53 tipos de produtos lácteos contendo microrganismos probióticos (SHAH, 2000).

No Brasil estima-se um consumo de 120 mil toneladas por ano de leites fermentados contendo microrganismos probióticos (LEITES, 2000 citado por CORRÊA, 2006). Em 1994, o mercado global dos probióticos movimentou 6,6 bilhões de dólares, liderado pelo Japão, responsável por mais de 3,3 bilhões. Em 2000, ultrapassou 17 bilhões, com maior disponibilidade desses produtos nos Estados Unidos da América, onde a legislação para esses produtos é mais favorável do que na Europa e Japão. Atualmente, o mercado global movimenta mais de 20 bilhões de dólares (FERREIRA, 2003).

A indústria de laticínios está entre as que apresentam maior crescimento na disponibilização de produtos funcionais, em especial iogurte, bebidas à base de soro de leite, e outros leites fermentados, em que essa funcionalidade é efetivada por meio da utilização de culturas probióticas e/ou adição de substâncias prebióticas, como por exemplo, oligossacarídeos (BRANDÃO, 2002; SAARELA et al., 2000).

Entretanto, o uso de culturas probióticas em leites fermentados é limitado, devido às substâncias produzidas por estes microrganismos responsáveis por sabores estranhos ou “off-flavors” nos produtos finais, além de serem extremamente sensíveis a uma série de fatores, como pH ácido e a presença de oxigênio (KAILASAPATHY e RYBKA, 1997; SHAH, 2000).

3.2 Bactérias Ácido-Láticas

As bactérias lácticas conhecidas também como ácido-láticas compreendem um grupo amplo de microrganismos que apresentam diversas características morfológicas, metabólicas e fisiológicas comuns. São microrganismos Gram-positivos na forma de coco ou bacilo, não apresentam motilidade, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos ou microaerófilos, fastidiosos, ácido tolerantes, com metabolismo estritamente fermentativo, que apresenta o ácido láctico como principal produto da fermentação de carboidratos (CATHY, 1994; MARTINS et al., 2006).

São microrganismos quase sempre catalase negativos, pois algumas espécies podem produzir uma pseudo-catalase. São organismos unicelulares e se reproduzem por fissão binária por um curto período, entre trinta e noventa minutos em condições ótimas de crescimento (FERREIRA, 2003; CATHY, 1994).

As bactérias lácticas estão amplamente difundidas na natureza, particularmente em ambientes ricos em nutrientes. Algumas delas também fazem parte da microbiota dos tratos respiratório e intestinal do homem e animais, podendo influenciar beneficemente o ecossistema microbiano desses locais. (HOLZAPFEL e SCHILLINGER, 2002).

Várias espécies de bactérias lácticas são utilizadas comercialmente para a produção de leites fermentados, produtos cárneos, iogurtes, queijos, salames, picles, entre outros. Os produtos lácteos fermentados com bactérias lácticas têm sido utilizados no tratamento de doenças do trato gastrointestinal como: intolerância a lactose, gastroenterites agudas, efeitos adversos da radioterapia, constipação, alergias alimentares, entre outras (FONDÉN et al., 2000).

As bactérias lácticas são basicamente mesófilas (com algumas linhagens termófilas) e são capazes de crescer num intervalo de temperatura de 5 a 45°C. Além da produção de ácido láctico, outros compostos antimicrobianos são produzidos, incluindo ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. A produção do peróxido de hidrogênio deve-se à carência da enzima catalase (FORSYTHE, 2002).

Por várias décadas, foram considerados como verdadeiros componentes do grupo láctico os gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* e os recém denominados *Lactococcus*. Levando em consideração as desagregações, as agregações, aparecimento de novos gêneros, atualmente são 15 os constituintes desse grupo *Aerococcus*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (FERREIRA, 2003).

As bactérias ácido-lácticas são divididas em dois grupos: as homofermentativas e as heterofermentativas. As homofermentativas produzem duas moléculas de ácido láctico para cada molécula de glicose fermentada, por exemplo, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, e alguns lactobacilos. Já as heterofermentativas produzem uma molécula de ácido láctico, etanol e CO₂, por exemplo, *Weissella*, *Leuconostoc* e alguns lactobacilos (FORSYTHE, 2002).

Bactérias lácticas isoladas do intestino do homem e dos animais constituem atualmente uma subdivisão do grupo bactérias probióticas que, consumidas em números elevados, têm a propriedade de repor a microbiota intestinal desbalanceada pela dieta, por tratamentos com antibióticos/quimioterapia ou por estresse do hospedeiro (MADDEN et al., 2005). As bactérias probióticas favorecem a saúde do homem de várias maneiras, como diminuição do colesterol sérico, aumento da resposta do sistema imunológico, e prevenção de doenças intestinais como, por exemplo, diarreia (AMORES et al., 2004).

Os benefícios nutricionais dos probióticos têm sido estudados principalmente em produtos lácteos fermentados com bifidobactérias e lactobacilos. Segundo Gomes e Malcata (1999), os leites fermentados por probióticos, contêm grande variedade de compostos dependendo do tipo de leite usado (leite de vaca, de ovelha, de cabra), do tipo de microrganismos adicionados e dos processos de fabricação empregados. Eles são caracterizados por níveis mais baixos de lactose residual e níveis mais altos de aminoácidos livres em relação ao leite comum, além da presença de certas vitaminas. Além disso, os leites fermentados pelas bifidobactérias contêm, preferencialmente, mais ácido láctico L(+) que é mais facilmente metabolizado pelos seres humanos que o ácido láctico D (-). O ácido láctico L(+) absorvido no intestino é usado como fonte de energia (FONDÉN, et al., 2000).

3.3 Principais Gêneros de Bactérias Lácticas Utilizadas como Probióticos:

3.3.1 Gênero *Lactobacillus*:

Os lactobacilos foram isolados pela primeira vez por Moro em 1900 a partir de fezes de lactentes amamentados ao peito materno. Esse pesquisador atribuiu-lhes o nome de *Bacillus acidophilus*, designação genérica dos lactobacilos intestinais (GOMES e MALCATA, 1999). Essas bactérias são bastonetes, Gram-positivos, em geral facultativos, porém preferem condições reduzidas de oxigênio. São incapazes de formar esporos e não possuem flagelos (MERK, BORELLI e KORTING, 2005).

Atualmente o gênero *Lactobacillus* compreende 56 espécies oficialmente reconhecidas. Sendo que as mais utilizadas para fins funcionais são *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus rhamnosus* (GOMES e MALCATA, 1999).

Os lactobacilos têm sido geralmente considerados seguros para o consumo humano e são tradicionalmente utilizados como probióticos (MERK, BORELLI e KORTING, 2005). Os probióticos são microrganismos vivos benéficos ao hospedeiro, os quais proporcionam equilíbrio à microbiota intestinal (HOOLIHAN, 2001). Entretanto, os alimentos contendo probióticos nem sempre garantem a reposição ideal da microbiota intestinal, principalmente porque muitas vezes as bactérias não estão viáveis no produto, no momento do consumo.

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2000a) para se obter os benefícios proporcionados pelos probióticos é necessário que os mesmos estejam viáveis e disponíveis em concentrações de no mínimo 10^6 UFC/g. Entretanto, vários fatores como acidificação do produto final, ácidos produzidos durante o armazenamento, nível de oxigênio no produto, permeação do oxigênio através da embalagem, compostos antimicrobianos e a perda de nutrientes do leite podem reduzir a viabilidade e conseqüentemente, as propriedades probióticas das culturas serão prejudicadas (ANDRIGHETTO e GOMES, 2003).

As espécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, crescem em temperaturas que variam de 2°C a 53°C, com valores ótimos, geralmente de 30°C a 40°C. São acidúricos, com pH ótimo entre 5,5 e 6,2 sendo que o crescimento pode ocorrer em pH 5,0 ou menor. O crescimento é freqüentemente reduzido em meios neutros ou alcalinos (SNEATH et al., 1986). Os lactobacilos fazem parte da microbiota colônica da vagina, boca e trato intestinal (MERK, BORELLI e KORTING, 2005). Em estudo realizado por Ahrne et al., (1998) verificaram que as contagens de *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. paracasei* na microbiota intestinal foram similares aos números de microrganismos da família *Enterobacteriaceae* e maiores que enterococcus.

Segundo Stiles e Holzapfel (1997), o gênero *Lactobacillus* é classicamente composto por espécies homofermentativas obrigatórias (produzem somente ácido láctico como principal produto da fermentação da glicose); heterofermentativas obrigatórias (produzem outros compostos desta fermentação) e heterofermentativas facultativas (produzem outros compostos além de ácido fórmico, succínico, láctico e acético).

3.3.2 Gênero *Bifidobacterium*

As bifidobactérias são caracterizadas como microrganismos Gram-positivos, não formadores de esporos, catalase negativo e anaeróbio estricto. Podem apresentar várias formas, como bacilos curtos e curvados, bacilos com forma de bastão e bacilos bifurcados.

As espécies do gênero *Bifidobacterium*, são heterofermentativas, produzindo ácido acético e láctico na proporção molar de 3:2. A temperatura ótima de crescimento oscila entre 37°C – 41°C. Em relação ao pH ótimo verificam-se valores entre 6,0 e 7,0 com ausência de crescimento a valores de pH ácidos de 4,5-5,0 ou valores de pH alcalinos de 8,0-8,5 (RASIC e KURMANN, 1983; DANONE, 1997).

Tradicionalmente, as bifidobactérias são consideradas como membros das bactérias ácido lácticas. Entretanto, essa classificação não é unânime entre os pesquisadores (WERF e VENEMA, 2001). O gênero *Bifidobacterium* foi primeiramente isolado de fezes infantis por Tissier em 1900. Este primeiro isolado recebeu o nome de *Bacillus bifidus communis*. Desde então, várias designações genéricas foram propostas para sua denominação, e finalmente a espécie foi reconhecida como um gênero à parte (POUPARD, HUSSAIN, e NORRIS, 1973).

Atualmente, há 30 espécies diferentes no gênero *Bifidobacterium*, 10 das quais são de origem humana, 17 de origem animal, 2 de efluentes e 1 de leite fermentado (GOMES e MALCATA, 1999). As espécies do gênero *Bifidobacterium* podem ser observadas no Quadro 1.

Quadro 1. Espécies que integram os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*.

<i>Lactobacillus</i>		<i>Bifidobacterium</i>
<i>L. acetotolerans</i>	<i>L. jensenii</i> *	<i>B. adolescentis</i> *
<i>L. acidophilus</i> *	<i>L. johnsonii</i>	<i>B. angulatum</i> *
<i>L. agilis</i>	<i>L. kandleri</i>	<i>B. animalis</i>
<i>L. alimentarius</i>	<i>L. kefir</i>	<i>B. asteroides</i>
<i>L. amylophilus</i>	<i>L. kefiranoferens</i>	<i>B. bifidum</i> *
<i>L. amylovorus</i>	<i>L. malefermentans</i>	<i>B. boum</i>
<i>L. avarius</i>	<i>L. mali</i>	<i>B. breve</i> *
<i>L. bifementans</i>	<i>L. minor</i>	<i>B. catenulatum</i> *
<i>L. brevis</i> *	<i>L. murinus</i>	<i>B. choerinum</i>
<i>L. buchneri</i> *	<i>L. oris</i> *	<i>B. coryneforme</i>
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> *	<i>L. parabuchneri</i> *	<i>B. cuniculi</i>
<i>L. collinoides</i>	<i>L. paracasei</i> *	<i>B. dentium</i> *
<i>L. confusus</i>	<i>L. pentosus</i>	<i>B. gallicum</i>
<i>L. coryniformis</i>	<i>L. suebicus</i>	<i>B. gallinarum</i>
<i>L. crispatus</i> *	<i>L. sharpeae</i>	<i>B. globosum</i> *
<i>L. curvatus</i>	<i>L. sanfrancisco</i>	<i>B. indicum</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. salivarius</i> *	<i>B. infantis</i> *
<i>L. farciminis</i>	<i>L. sake</i>	<i>B. lactis</i>
<i>L. fermentum</i> *	<i>L. ruminis</i>	<i>B. longum</i> *
<i>L. fructivorans</i>	<i>L. rhamnosus</i> *	<i>B. magnum</i>
<i>L. fructosus</i>	<i>L. reuteri</i> *	<i>B. merycicum</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>L. plantarum</i> *	<i>B. minimum</i>
<i>L. gasseri</i> *	<i>L. pontis</i>	<i>B. pseudocatenulatum</i> *
<i>L. graminis</i>	<i>L. viridescens</i>	<i>B. pseudolongum</i>
<i>L. halotolerans</i>	<i>L. vaginalis</i> *	<i>B. pullorum</i>
<i>L. hamsteri</i>	<i>L. vaccinoferens</i>	<i>B. ruminantium</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. intestinalis</i>	<i>B. saeculare</i>
<i>L. hilgardii</i>	<i>L. homohiochii</i>	<i>B. subtile</i>
		<i>B. suis</i>
		<i>B. thermophilum</i>

* Espécies isoladas de fonte humana.

Fonte: Gomes e Malcata, 1999.

Dentre as bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, cinco têm despertado maior interesse para a produção de leite fermentado para uso terapêutico. São elas, *B. longum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* e *B. adolescentis* (TAMIME, MARSHALL e ROBINSON, 1995).

Segundo Gomes, Malcata e Klaver, (1998a) e Gomes, Teixeira e Malcata, (1998b), produtos fermentados com bifidobactérias de origem animal têm sido bastante utilizadas em produtos destinados à alimentação humana. Essas culturas são mais facilmente cultivadas que as culturas de origem humana e podem resistir às condições adversas durante a produção industrial, como baixo pH e presença de níveis baixos de oxigênio. Recentemente, a cultura *B. lactis*, tem sido considerada como promissora, pois possui boa tolerância ao oxigênio e ao ácido.

Entretanto, foi verificado em estudo realizado por Boylston et al., (2004) que, sob condições típicas de digestão, onde o pH varia de 1,5 a 3,0, espécies como *Bifidobacterium longum* 1971 e *Bifidobacterium pseudolongum* 20097 são tolerantes às condições ácidas quando comparadas às outras 7 linhagens pesquisadas. Foi observado que após 3 horas de incubação a contagem dessas duas linhagens ácido-tolerantes decresceu menos que 1 ciclo logarítmico, enquanto a contagem das células viáveis das outras linhagens analisadas decresceu até 7 ciclos logarítmicos.

Segundo Ferreira (1996), os maiores problemas com bactérias bífidas em laticínios são as suas características de anaerobiose e exigências de grande porcentagem de inóculo, em torno de 10%.

As bifidobactérias habitantes do trato gastrintestinal têm grande importância na saúde do hospedeiro. Sua redução no intestino pode estar relacionada a um estado não saudável. Porém é sabido que a contagem de bifidobactérias diminui com o avanço da idade do hospedeiro, como um resultado da diminuição da secreção de sucos gastrintestinais que causa a perda de imunidade e doenças como câncer (TOMOMATSU, 1994). Sendo assim, torna-se de extrema importância ingerir produtos probióticos como forma de reposição da microbiota intestinal.

O aumento do número de bactérias benéficas como as bifidobactérias no intestino pode ser conseguido também com o uso de prebióticos, que são componentes da dieta não digeríveis que passam através do cólon e estimulam a atividade de bactérias desejáveis *in situ* (CUMMINGS e MACFARLANE, 2002).

3.4 Ecologia Microbiana do Trato Gastrintestinal Humano e sua Relação com os Probióticos e Prebióticos

O trato intestinal é dividido em várias regiões: boca, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso e ânus (FORSYTHE, 2002).

O trato gastrintestinal representa um ecossistema de alta complexidade, composto por mais de 500 diferentes espécies, sendo ainda limitado o entendimento desse sistema e de suas interações (CUMMINGS e MACFARLANE, 1991). A microbiota colonizadora tem um papel fundamental na saúde do hospedeiro. Entretanto, o equilíbrio dinâmico dos microrganismos colonizadores do trato gastrintestinal pode ser alterado por diversos fatores, como por exemplo, dieta alimentar, medicamentos, estresse e fatores ambientais. (HOLZAPFEL e SCHILLINGER, 2002).

A superfície da mucosa intestinal é provida de uma grande área para aderência e colonização de microrganismos. O trato gastrintestinal humano é colonizado por aproximadamente 10^{14} células microbianas, é 10 vezes mais que todas as células do tecido humano (LUCKEY e FLOCH, 1972).

A microbiota intestinal exerce influência considerável sobre uma série de reações bioquímicas do hospedeiro. Paralelamente, quando em equilíbrio, impede que microrganismos potencialmente patogênicos nela presentes, exerçam seus efeitos maléficos. Por outro lado, quando em desequilíbrio, o nível de bactérias benéficas decresce no trato intestinal, conseqüentemente, bactérias potencialmente patogênicas encontram espaço para multiplicarem e causar enfermidades (ZIEMER e GIBSON, 1998).

Segundo os autores, Guarnier (2006) e Picard, Fioramonti e François (2005) a microbiota intestinal colônica divide-se em: microbiota dominante, contendo entre 10^9 e 10^{12} UFC/mL, inclui nesta categoria as bifidobactérias; microbiota subdominante, contendo entre 10^7 e 10^8 UFC/mL, inclui nesta categoria os lactobacilos, e microbiota residual, contagem $< 10^7$ UFC/mL, em que são incluídos *Clostridium*, *Pseudomonas* e *Klebsiella*. A microbiota residual é considerada potencialmente patogênica e é mantida em níveis mais baixos graças à ação inibitória exercida pelas bactérias não patogênicas como bifidobactérias e lactobacilos.

Segundo Holzapfel et al., (1998) as bactérias probióticas são distribuídas em regiões específicas do trato gastrointestinal de acordo com as condições de cada região, como disponibilidade de nutrientes, pH, potencial redox, fatores químicos e físicos. Em função disso, os lactobacilos colonizam o intestino delgado, enquanto as bactérias bífidas colonizam o intestino grosso.

A modulação do ecossistema intestinal pelos microrganismos probióticos ocorre através de um mecanismo denominado exclusão competitiva. Através desse mecanismo, os probióticos impedem a colonização da mucosa pelos microrganismos potencialmente patogênicos, através da competição por sítios de adesão, competição por nutrientes necessários à multiplicação de microrganismos indesejáveis e/ou os efeitos antagonísticos, e através da produção de compostos antimicrobianos (GUARNER e MALAGELADA, 2003).

É possível aumentar o número de microrganismos promotores da saúde no trato gastrointestinal através da introdução de probióticos pela alimentação ou pelo consumo de suplemento alimentar prebiótico, o qual modificará seletivamente a composição da microbiota, fornecendo ao probiótico vantagem competitiva sobre as outras bactérias do ecossistema (GIBSON e ROBERFROID, 1995).

3.5 Prebióticos: Definição e Efeitos Benéficos

Os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis benéficos ao hospedeiro por estimularem seletivamente a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon. Adicionalmente, o prebiótico pode inibir a multiplicação de patógenos, o que garante benefícios adicionais à saúde do hospedeiro (SAAD, 2006).

Os prebióticos, quando ingeridos, resistem à hidrólise salivar, pancreática e intestinal e também ao suco gástrico. Por essa razão, chegam ao intestino na sua forma original, intactos, e são fermentados por bactérias naturalmente presentes no intestino. Conseqüentemente, exercem efeito positivo na saúde do hospedeiro apresentando um efeito prebiótico (ROBERFROID, GIBSON e DELZENNE, 1993).

No intestino grosso, os prebióticos são eficazmente fermentados por bactérias intestinais gerando ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como o butirato, o acetato e o propionato. Os AGCC, em especial o butirato, constituem o combustível da célula epitelial do cólon, sendo responsáveis pela geração de energia para o metabolismo celular (ROEDIGER, 1989). Também há redução do pH colônico, o que reduz o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas como os gêneros *Clostridium* e *Pseudomonas* (KOLIDA, TUOHY e GIBSON, 2002).

Dentre os principais prebióticos que têm recebido maior atenção, destacam-se a inulina e os oligossacarídeos, especialmente os frutooligosacarídeos (USTUNOL, 2005).

Crittenden e Playne (1996) definem oligossacarídeos como glicosídeos que contêm entre três e dez monossacarídeos ligados entre si. Entretanto, muitos dissacarídeos apresentam propriedades similares. Outros autores definem oligossacarídeos como carboidrato que possuem um baixo grau de polimerização (de 2 a 20) e conseqüentemente, baixa massa molecular (ROBERFROID e SLAVIN, 2000).

Os oligossacarídeos são açúcares encontrados como componentes naturais em muitos alimentos como frutas, vegetais, leite e mel. Alguns desses não apresentam apenas a função nutricional ou de adoçante, como também exibem atividades fisiológicas, sendo assim denominados de alimento funcional (ALMEIDA e PASTORE, 2004).

Há várias classes de oligossacarídeos, como por exemplo, os galacto-oligossacarídeo. Esses têm atraído atenção, por estarem presente em leite materno. A presença de galacto-oligossacarídeos no leite materno tem influência no estabelecimento da microbiota bífida no trato gastrointestinal de recém-nascidos (GOPAL, SULLIVAN e SMART, 2001).

Os oligossacarídeos são solúveis em água, levemente doces e apresentam de 0,3 a 0,6 vezes a doçura da sacarose. Esse baixo poder adoçante é dependente da estrutura química e massa molecular dos oligossacarídeos e da concentração de mono e dissacarídeos na mistura (CRITTENDEN e PLAYNE, 1996). Segundo os autores Playne e Crittenden (1996), devido às características físico-químicas e fisiológicas dos oligossacarídeos, esses têm tido grande aplicação na indústria de alimentos, em produtos utilizados para alimentação humana, como por exemplo, bebidas, adoçantes, leite em pó infantil e para alimentação animal, como, por exemplo, em ração, assim como aplicação em cosméticos, produtos farmacêuticos e produtos para diabéticos. A utilização de oligossacarídeo como alimento funcional é proposta desde 1980, sendo que sua importância consiste no estímulo da produção de bifidobactérias no intestino. Portanto, são denominados prebióticos.

Por conter uma série de oligossacarídeos, tem sido sugerido que o mel possa exercer efeito prebiótico sobre a microbiota colônica intestinal, como lactobacilos e bididobactérias. (LEITE et al., 2000).

Segundo Anjo (2004), o mel é um alimento funcional, pois contém oligossacarídeos e tem como efeito regulação do trânsito intestinal, da pressão arterial, redução do risco de câncer, dos níveis de colesterol, e também a redução da intolerância à lactose.

Os prebióticos identificados até o momento são carboidratos não digeríveis incluindo lactulose, inulina e vários tipos de oligossacarídeos que fornecem uma fonte de carboidrato fermentescível pelas bactérias benéficas do cólon (MARTINI, KUKIELKA e SAVAIANO, 1991).

Ao contrário do amido e dos monossacarídeos, os oligossacarídeos não são utilizados pela microbiota bucal para formar ácidos e poliglucanas. Conseqüentemente, são usados como açúcares de baixa cariogenicidade em confeitos, gomas de mascar, iogurtes e bebidas (TOMOMATSU, 1994).

Os frutooligossacarídeos (FOS) estão presentes como compostos de reserva energética em mais de 36.000 espécies de vegetais, sendo que muitos destes são utilizados na alimentação humana (PASSOS e PARK, 2003). As principais fontes naturais de frutooligossacarídeos incluem trigo, cebola, banana, alcachofra, alho e raízes de chicória (GIBSON, WILLIS e VAN LOO, 1994; ROBERFROID, GIBSON e DELZENNE, 1993; VAN LOO et al., 1995).

Os frutooligossacarídeos são os principais oligossacarídeos da classe dos bifidogênicos, açúcares formados de 1 a 3 moléculas de frutose ligadas à uma molécula de sacarose na posição $\beta(2-1)$. Apresentam propriedades físicas e fisiológicas que os tornam compostos de grande potencial de aplicação em alimentos para nutrição humana e animal. São açúcares não digeridos pelo organismo humano que passam através do intestino delgado sem

serem absorvidos e vão direto para o intestino grosso, onde são seletivamente utilizados pelas bifidobactérias na microbiota intestinal (MITSOUKA, 1990).

Moro et al., (2002) estudaram o efeito de uma mistura de dois prebióticos: os frutooligossacarídeos (FOS) e os galactooligossacarídeos (GOS) adicionados em fórmulas infantis, sobre o crescimento de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Foram testadas duas fórmulas infantis, as quais foram suplementadas com 0,4g/ kg corpóreo e 0,8g/kg corpóreo da mistura de oligossacarídeos. Para a avaliação do crescimento dos microrganismos probióticos, amostras fecais foram coletadas de 90 crianças alimentadas com a mistura de prebióticos. A dose de 0,8g/Kg foi a mais adequada em relação à fórmula placebo (a base de maltodextrina). A mistura de GOS e FOS teve efeito estimulante no crescimento de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, no intestino, sendo bastante promissora ao uso como suplementos em fórmulas infantis.

A inulina e a oligofrutose são frutanas polidispersas, de origem vegetal, com grau de polimerização de 2 a 60 e de 2 a 20, respectivamente. Devido à conformação estrutural das suas ligações osídicas $\beta(2-1)$, ambas resistem à hidrólise pelas enzimas digestivas. A fração de baixo grau de polimerização (GP) da inulina (2 a 20) pode ser classificada como oligofrutose ou fruto-oligossacarídeo (ROBERFROID, 1993; ROBERFROID e SLAVIN, 2000).

As diferenças no tamanho das cadeias da inulina e das oligofrutoses são também responsáveis pelas diferenças entre suas propriedades. Devido às cadeias mais longas, a inulina é menos solúvel que as oligofrutoses e possui a capacidade de formar microcristais quando misturada com água e leite (GIBSON, WILLIS e VAN LOO, 1994).

A inulina (ínulo-oligofrutose) e os frutooligossacarídeos são considerados como alimentos, ingredientes alimentares ou fibras em diferentes países. Eles têm recebido muita atenção devido ao seu efeito sobre a flora intestinal. A inulina contém em média 30 unidades de frutose, enquanto os frutooligossacarídeos (também denominados oligofrutose) contêm de 2 a 9 unidades de frutose que são ligadas à uma unidade de glicose terminal (MAKINO, 2004).

Além dos oligossacarídeos, as fibras alimentares têm sido bastante utilizadas como prebióticos. Segundo Roberfroid (1993), fibra dietética é um termo utilizado para descrever uma grande variedade de substâncias que resistem à hidrólise enzimática do sistema digestivo humano, porém são fermentadas pela microbiota intestinal. Quimicamente falando, essas substâncias pertencem ao grupo dos carboidratos e podem ser classificadas como fibras solúveis (inulina), fibras insolúveis (celulose) ou mistas.

As fibras solúveis, como por exemplo, a inulina é fermentada por uma grande variedade de bactérias anaeróbias, o que provoca aumento da biomassa bacteriana e da massa fecal, mudança no pH intestinal e produção de ácidos orgânicos de cadeia curta como produtos metabólicos finais. As fibras insolúveis, por sua vez, são apenas parcialmente fermentadas. Elas atuam quase exclusivamente como agentes formadores de volume, o que resulta em um menor tempo de trânsito e maior massa fecal (CARABIN e FLAMM, 1999; ROBERFROID, 1993). Dessa forma, os alimentos não digeríveis com maior capacidade de reterem água (fibra alimentar solúvel e amido resistente) geralmente são mais facilmente fermentados do que aqueles com menor capacidade de reter água (fibra alimentar insolúvel), estando a inulina e frutooligossacarídeos classificados em substâncias semelhantes às fibras solúveis em sua maioria (ALMEIDA e PASTORE, 2001).

Rao (2001) investigou o efeito da ingestão diária de 5g de oligofrutose em indivíduos saudáveis e comparou com o controle placebo (sacarose). Amostras fecais dos indivíduos saudáveis foram avaliadas antes de começar o tratamento. Os indivíduos mantiveram a dieta normalmente, e durante 3 semanas consumiram 5g diárias de sacarose e após este período fez-se o mesmo para oligofrutose. Após 11 dias de tratamento e após 3 semanas, amostras fecais foram avaliadas quanto ao número de bifidobactérias. Foi verificado que após 11 dias de

tratamento com oligofrutose, o número de bifidobactérias aumentou em 1 ciclo logaritmo, e nos próximos dias não foi observado novo aumento de bifidobactérias. O tratamento com placebo não teve efeito sobre o crescimento de bifidus, dessa forma os autores concluíram que os resultados são bastante promissores.

Estudo realizado por Gopal, Prasad e Gill (2003), relataram que indivíduos que consumiram leite reconstituído 12% suplementado com 2,4g de galacto-oligossacarídeo por dia, como também aqueles que consumiram leite reconstituído 12% adicionado com o 3×10^{10} UFC/mL de *B. lactis* HN019, exibiram um aumento significativo das contagens fecais de bifidobactérias e lactobacilos quando comparados com o grupo controle, onde os indivíduos consumiram leite reconstituído sem galacto-oligossacarídeo e sem *B. lactis*.

3.6 Probióticos: Definição e Efeitos Benéficos

As observações do microbiologista Metchnikoff no início do século XX sobre a importância do consumo de grandes quantidades de iogurte para manutenção da saúde, e conseqüentemente, a longevidade das pessoas, despertou o interesse científico pelas bactérias como agentes protetores às enfermidades. Metchnikoff propôs que o consumo de iogurte rico em bactérias lácticas eliminava as bactérias patogênicas do trato gastrointestinal (ALVAREZ-OLMOS e OBERHELMAN, 2001).

Desde então, pesquisadores têm se esforçado para conhecer melhor as distintas funções e mecanismo de ação dos microrganismos benéficos à saúde.

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos administrados em quantidades adequadas que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (SANDERS, 2003).

Várias funções benéficas têm sido atribuídas a ingestão de bactérias probióticas, por exemplo, produção de vitaminas, disponibilidade de minerais; produção de importantes enzimas digestivas, ex. β -galactosidase; diminuição do colesterol; estimulação do sistema imunológico; melhoria da motilidade do intestino, ou seja, alívio da constipação; aderência e colonização no epitélio intestinal, mantendo assim a integridade da mucosa (HOLZAPFEL et al., 1998).

As bactérias probióticas produzem uma importante enzima responsável pela metabolização da lactose, a β -galactosidase, a qual é benéfica, principalmente, às pessoas intolerantes à lactose. Os indivíduos intolerantes à lactose devido à redução ou ausência da enzima β -galactosidase, não podem consumir a lactose pois ela não é hidrolisada pela enzima em glicose e galactose. Conseqüentemente a lactose não consegue atravessar a parede intestinal para ir à corrente sanguínea. A lactose então, continua dentro do intestino e chega ao intestino grosso onde é fermentada por bactérias, produzindo ácido láctico e gases (PRETTO et al., 2002; PINTO e COLLARES, 1997).

Em vias normais, a lactose é hidrolisada no intestino delgado, em monossacarídeos (glicose e galactose), por ação da enzima lactase ou β -galactosidase existentes nas células epiteliais da mucosa intestinal, a qual absorve os produtos da decomposição (TRONCO, 2003).

Segundo Bannan e Levitt (1996), a utilização da lactose pela microbiota intestinal resulta na produção de ácido láctico e na diminuição do pH, o que promove o desenvolvimento da microbiota intestinal desejável, inibindo o desenvolvimento de bactérias putrefativas e patogênicas. A lactose exerce também um importante papel no intestino, ou seja, melhora a absorção do cálcio no organismo. Esse fato é explicado pela redução do pH intestinal que leva à solubilidade e à disponibilidade notavelmente maiores dos compostos de cálcio constituída para absorção.

As bactérias lácticas presentes no iogurte, *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, produzem β-galactosidase no próprio iogurte. Entretanto, essas bactérias não sobrevivem durante a passagem pelo trato intestinal, devido à intolerância à bile. Em contraste, bactérias como *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum* podem sobreviver durante a passagem intestinal e colonizar as células epiteliais, produzindo então β-galactosidase (KRASAEKOOPT, BHANDARI e DEETH, 2003).

Segundo Amores et al., (2004) são vários os mecanismos de atuação dos probióticos, como por exemplo: competição com os microrganismos patogênicos por nutrientes e espaço físico; produção de substâncias antimicrobianas como bacteriocinas, ácidos graxos voláteis de cadeia curta, peróxido de hidrogênio e ácido láctico. Dentre os mecanismos de ação dos probióticos destacam-se a “exclusão competitiva”, através da qual as bactérias probióticas impedem a colonização da mucosa por microrganismos potencialmente patogênicos, por meio de competição por sítios de adesão na mucosa, competição por nutrientes, e através da produção de compostos antimicrobianos (GUARNER e MALAGELADA, 2003).

Segundo Mitsuoka (1992), as bactérias nocivas presentes no trato gastrointestinal, podem formar uma série de compostos tóxicos ao homem. Entre esses compostos podemos citar as substâncias putrefativas (amônia, H₂S, aminas, fenol, indol, escatol e outros) e ácidos biliares secundários. Essas substâncias podem prejudicar o intestino diretamente e são também parcialmente absorvidas, contribuindo ao longo da vida do hospedeiro, para o processo de envelhecimento, câncer entre outros.

Sendo assim, a incorporação dos probióticos na alimentação do homem torna-se de extrema importância, sendo uma das formas para reduzir ou excluir a microbiota prejudicial habitante do intestino.

Os microrganismos probióticos, para serem efetivos, devem ser selecionados, uma vez que necessitam transpor várias barreiras até o local em que deverão atuar. Segundo Kurmann (1998), a seleção de culturas probióticas destinadas à alimentação humana deve atender ao requisito de serem isoladas do trato gastrointestinal, pois geralmente são mais adaptadas às necessidades fisiológicas do homem e podem colonizar mais facilmente o intestino do que culturas originárias do cólon de animais.

Alguns critérios gerais podem ser listados para seleção desses microrganismos candidatos ao uso de probióticos para a espécie humana, sendo os principais: serem isolados do trato gastrointestinal humano; serem inócuos, manter-se viáveis por longo tempo durante a estocagem e transporte; tolerar o baixo pH do suco gástrico e resistir à ação da bile e das secreções pancreática e intestinal. Além disso, os microrganismos probióticos não devem transportar genes transmissores de resistência à antibióticos e possuir propriedades anti-mutagênicas e anticarcinogênicas, assim como resistir à fagos e ao oxigênio (SALMINEN, OUWEHAND e ISOLAURI, 1998; SAARELA et al., 2000; HOLZAPFEL e SCHILLINGER, 2002).

Os lactobacilos e as bifidobactérias são freqüentemente utilizados como probióticos em alimentos destinados ao consumo humano, uma vez que têm sido isolados de todas as porções do trato gastrointestinal do homem saudável. O íleo terminal e o cólon parecem ser respectivamente, os locais de preferência para colonização intestinal dessas bactérias (CHARTERIS et al., 1998; BIELECKA, BIEDRZYCKA e MAJKOWSKA, 2002).

A capacidade de algumas linhagens probióticas de aderirem às paredes do epitélio intestinal é considerada importante, embora a não adesão de microrganismos não impeça sua proliferação, mas sim a colonização (ZIEMER e GIBSON, 1998).

Segundo Gomes e Malcata (1999), os produtos fermentados no momento do consumo, devem conter no mínimo 10⁶UFC/mL de células probióticas viáveis, devido à dose mínima terapêutica diária ser de 10⁸-10⁹ células viáveis em 100g do produto fermentado.

Entretanto, Shah et al., (1995) sugerem que para efeito terapêutico o produto deve

conter $\geq 10^5$ células/mL. Já para Vinderola e Reinheimer (2000) o consumo de 10^8 - 10^{11} UFC/dia é o recomendável para alcançar os benefícios propostos pelos microrganismos probióticos. A legislação brasileira estabelece o limite mínimo de 10^6 UFC/mL de células probióticas em produtos fermentados até o momento de serem consumidos (BRASIL, 2000a).

Além dos probióticos e prebióticos, um novo conceito tem chamado a atenção de pesquisadores. O termo simbiótico alia o fornecimento de microrganismos probióticos juntamente com substâncias prebióticas específicas (JAIN et al., 2004).

Um estudo realizado por Jain et al., (2004), teve como objetivo determinar a influência de um produto simbiótico, administrado oralmente, sobre a colonização de patógenos intestinais em 90 pacientes em estado crítico de saúde. O produto simbiótico continha *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium lactis* Bb12, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* e oligofrutose. Após uma semana de terapia com o simbiótico preparado, os pacientes tiveram uma significativa diminuição da incidência de bactérias patogênicas colonizadoras do trato gastrointestinal humano quando comparados ao grupo controle.

3.7 Mel:

3.7.1 Definição e composição físico-química

Entende-se por mel, o produto alimentício produzido pelas abelhas melíferas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colméia (BRASIL, 2000).

É a partir do néctar que é produzido a maior parte dos méis do mundo. O néctar é uma solução de açúcar e água, podendo conter sacarose pura; uma mistura de sacarose, glicose e frutose; ou apenas glicose e frutose. O néctar é transportado para a colméia, onde irá sofrer mudanças físicas e químicas responsáveis por sua maturação (CRANE, 1983).

Segundo Lengler (2007), o processo químico sofrido pelo néctar é caracterizado pela ação de enzimas como invertase, diastase, glicose oxidase, catalase e fosfatase, adicionadas durante o transporte do néctar para a colméia, por meio das secreções de várias glândulas ligadas ao aparelho digestivo das abelhas, deixando o produto pronto para ser regurgitado nos alvéolos do favo. O processo físico é caracterizado pela desidratação (evaporação na colméia e absorção no papo), ou seja, perda de água, com concentração dos componentes sólidos do mel.

Existem dezenas de variedades de mel de abelhas que podem ser diferenciadas pela florada, pelo local ou época de colheita, ou ainda, segundo as técnicas de preparação (BASTOS et al., 2002).

Segundo Doner (1991), o mel é um alimento bastante apreciado por seu sabor característico e por seu valor nutricional. A qualidade nutricional do mel como as vitaminas, minerais, valor energético elevado, suas propriedades medicinais como, por exemplo, ação antioxidante e antisséptica relacionada aos compostos fenólicos e suas propriedades sensoriais tem atraído milhares de consumidores (ZUMLA e LULAT, 1989).

Segundo Pereira et al., (2003), a produção mundial de mel situa-se em torno de um milhão e duzentas mil toneladas, sendo a China o maior produtor. Os maiores exportadores mundiais são China, Estados Unidos e Argentina. O Brasil destaca-se com uma produção de aproximadamente 22 toneladas. Entretanto, dimensionar o volume de mel produzido e

comercializado é uma tarefa difícil, pois os poucos dados confiáveis sobre o assunto são conflitantes.

O mel é um produto complexo de alta qualidade, de fácil digestão e assimilação, constituindo-se numa fonte de energia que contribui para o equilíbrio dos processos biológicos por conter em proporções adequadas, fermentos, vitaminas, ácidos, aminoácidos, substâncias bactericidas e aromáticas (KOMATSU, MARCHINI e MORETI, 2002).

Os carboidratos presentes no mel representam a maior porção de matéria seca, sendo eles os principais responsáveis pela qualidade e propriedades físicas do mel, como por exemplo, viscosidade, higroscopicidade, tendências à cristalização, valor energético e atividade antibacteriana (CRANE, 1975; WHITE, 1979).

Os níveis de frutose e glicose estão diretamente ligados à qualidade do mel, como também às suas características físico-químicas. A glicose é o monossacarídeo responsável pela cristalização do mel. A consequência dessa precipitação da glicose é o aumento do teor de umidade, o que permite a multiplicação das leveduras osmofílicas presentes naturalmente no mel, levando a fermentação do produto. Méis com elevados teores de frutose e baixos teores de glicose são menos suscetíveis à cristalização, fenômeno este que diminui a aceitação do mel pelos consumidores (MOREIRA e MARIA, 2001).

A glicose determina a tendência à cristalização, devido à sua baixa solubilidade, enquanto a frutose tem alta higroscopicidade. Geralmente, a frutose é predominante na maioria dos méis (WHITE, 1979; MOREIRA e MARIA, 2001).

Segundo Shin e Ustunol (2005), o mel é um xarope natural contendo principalmente frutose 38,5% e glicose 31,3%. Outros açúcares no mel incluem maltose 7,2%, sacarose 1,5% e uma variedade de oligossacarídeos 4,2%. Além da mistura complexa de carboidratos, encontram-se enzimas, minerais, pigmentos, cera e grãos de pólen. Ao todo já foram encontradas mais de cento e oitenta substâncias em diferentes tipos de mel (CRANE, 1983).

A presença de uma série de dissacarídeos e trissacarídeos têm sido relatadas por diversos autores (LEITE et al., 2000; SANZ, SANZ e MARTINEZ, 2004).

Dentre os dissacarídeos, a sacarose representa cerca de 2 a 3% dos carboidratos, sendo que valores superiores a esses podem indicar adulteração do mel ou colheita precoce do mesmo, ou seja, mel verde. A sacarose pertence aos oligossacarídeos (VIDAL e FREGOSI, 1984 citados por ARRUDA, 2003). Os oligossacarídeos presentes no mel podem estimular o crescimento de bactérias benéficas no trato gastrointestinal, uma vez que são considerados substâncias prebióticas.

Estudo realizado por Leite et al., (2000), constataram vários di e trissacarídeos em méis brasileiros. Entre os açúcares encontrados, a maltose apresentou-se em maiores níveis nos méis pesquisados. Outros 5 principais dissacarídeos como turanose, nigerose, melibiose, sacarose, isomaltose e 4 trissacarídeos, maltotriose, panose, melezitose e rafinose foram quantificados.

Em pesquisa realizada por Sanz, Sanz e Martinez (2004), com o objetivo de identificar di e trissacarídeos em méis espanhóis, constataram a presença de 16 dissacarídeos e 9 trissacarídeos.

Segundo Moreira e Maria (2001), a composição de glicídios no mel era considerada como uma mistura de glicose, frutose e sacarose. Entretanto, a partir da década de 20, vários estudos foram conduzidos com o objetivo de detectar di e trissacarídeos em mel. Ao todo, quinze dissacarídeos foram descritos como constituintes do mel, como também vários trissacarídeos.

O mel por conter uma série de oligossacarídeos, pode estimular o crescimento, atividade e viabilidade de bactérias probióticas.

Muitas enzimas estão presentes no mel, entre elas destacam-se a invertase, diastase e glicose-oxidase, todas elas produzidas pelas glândulas das abelhas. A invertase atua sobre a

sacarose, transformando-a em glicose e frutose. A diastase quebra o amido, sendo sua função na fisiologia da abelha ainda não claramente compreendida. Entretanto sua presença no mel é um indicativo de qualidade. Esta enzima apresenta sensibilidade à tratamentos térmicos. Sua presença ou ausência pode estar relacionada ao possível aquecimento do mel. A glicose-oxidase reage com glicose formando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio (EMBRAPA, 2003).

Segundo White e Rudyj (1978), as proteínas presentes no mel estão em quantidades traço. Os ácidos orgânicos representam uma pequena porção nos méis, menos que 0,5% dos sólidos, tendo uma influência direta no “flavor” do mel, sendo também importantes na inibição do crescimento de microrganismos (EMBRAPA, 2003).

A composição química do mel, como também aroma, coloração e propriedades medicinais, estão diretamente relacionadas com a fonte de néctar que o originou, com a espécie de abelha que o produziu, com as zonas geográficas e condições climáticas. Todos esses fatores contribuem para a grande variação encontrada em méis (SILVA, QUEIROZ e FIGUEIRÊDO, 2004; EMBRAPA, 2003).

Campos et al., (1987) citam que a composição média do mel pode ser resumida em três frações principais: açúcares, água e outros componentes minoritários. Afirmam ainda que por trás dessa aparente simplicidade, esconde-se um dos mais complexos produtos biológicos. A composição básica do mel pode ser observada no Quadro 2.

Quadro 2: Composição básica do mel

Componentes	Valores Médios	Valores extremos
Água (%)	17,20	13,4-23,9
Frutose (%)	38,20	27,2-44,3
Glicose (%)	31,30	22-40,8
Sacarose (%)	1,31	0,350-7,57
Maltose (%)	7,31	2,74-16,0
Polissacarídeos (%)	1,50	0,130-8,49
Outros (%)	3,10	0-13,2
Nitrogênio (%)	0,04	0-0,133
Mínerais (%)	0,170	0,0200-1,03
Ácidos livres (meq/Kg)	22,0	6,75-47,2
Lactonas (meq/Kg)	7,11	0-18,8
Ácidos totais (meq/Kg)	29,10	8,68-59,5
pH	3,91	3,42-6,10
Índice de diastase (U/g)*	20,80	2,10-61,2

* U/g = g de amido desdobrado/100g de mel por hora a 40°C.

Fonte: Campos et al., (1987).

3.7.2 Propriedade antimicrobiana e outras aplicações do mel

Conhecido desde a antiguidade, o mel sempre foi considerado um produto especial, não somente por suas qualidades como alimento, mas também por inúmeras propriedades terapêuticas (EMBRAPA, 2003).

O uso do mel na medicina é uma tradição antiga. Os assírios, egípcios e chineses utilizavam o mel na cicatrização de ferimentos e na cura de doenças intestinais (ZUMLA e LULAT, 1989).

A administração oral de mel contra infecções gastrintestinais como, gastrites, duodenites e úlcera gástrica causada por bactérias e rotavírus é relatada por vários autores (TALLET et al., 1977; HAFJEJEE e MOOSA, 1985; SOMAL et al., 1994; TOPHAM, 2002).

Segundo Somal et al., (1994) o mel possui grande eficácia na prevenção do crescimento de *Helicobacter pylori* no estômago, na redução de gastrites alcoólicas, e de processos cancerígenos.

Alieve et al., (2007), relataram que a utilização de métodos para conservação de ossos, como congelamento, liofilização e tintura de iodo a 2%, são eficientes. Entretanto, requerem equipamentos sofisticados e de alto custo. Esses autores revelaram que o mel foi uma opção viável e de fácil obtenção para conservar osso cortical alógeno para implantes ósseos.

O mel já foi utilizado na conservação de pele, córnea e pequenos segmentos ósseos obtendo resultados satisfatórios (GUPTA, 1977; ABRAMOV e MARKICHEVA, 1983; AMENDOLA, 2001 citados por ALIEVE et al., 2007).

Segundo Efem (1988), dentre as propriedades atribuídas ao mel, a atividade antimicrobiana tem recebido grande destaque entre os pesquisadores.

Na literatura, vários fatores são mencionados como responsáveis pela atividade antimicrobiana do mel. São eles: formação de peróxido de hidrogênio pelo sistema glicose oxidase; alta pressão osmótica; baixa atividade de água; pH baixo; baixo teor de proteínas; alta relação carbono – nitrogênio; baixo potencial redox; alta viscosidade; presença de lisozima; ácidos fenólicos e flavonóides (WHITE e SUBERS, 1964; MOLAN, 1992).

Segundo Molan (1992), o peróxido de hidrogênio pode ser destruído pelos próprios componentes do mel, como na reação com ácido ascórbico e íons metálicos e pela ação da enzima catalase, procedente do pólen e do néctar.

A enzima catalase está relacionada aos níveis de peróxido de hidrogênio presente no mel. Quanto maior a quantidade da enzima glicose-oxidase produzida pelas glândulas das abelhas, maior será a quantidade de peróxido de hidrogênio e menor a quantidade de catalase. E quando a catalase estiver presente em altos níveis, menor será a quantidade de peróxido de hidrogênio no mel (WESTON, 2000).

Uma pesquisa realizada por Alnaqdy et al., (2005), com o objetivo de avaliar o efeito inibitório *in vitro* do mel sobre a aderência de *Salmonella enteritidis* em células epiteliais intestinais, verificaram que em diluições superiores a 1:8 reduziram a capacidade de aderência da bactéria *Salmonella enteritidis* nas células intestinais.

Segundo Raupach et al., (1999) um dos pré-requisitos para patógenos causarem infecções intestinais é a capacidade de adesão e colonização desses microrganismos à mucosa intestinal.

Pesquisas sugerem que o mel é efetivo contra enfermidades causadas por bactérias, incluindo *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enteritidis*. A atividade antimicrobiana de mel é principalmente atribuída à acidez, à osmolaridade e à geração enzimática de peróxido de hidrogênio via glicose oxidase (MUNDO, ZAKOUR e WOROBO, 2004).

Shin e Ustunol (2005) avaliaram a capacidade de inibição de diferentes méis sobre o crescimento de *Clostridium perfringens* e *Eubacterium aerofaciens*. As culturas foram crescidas em caldo MRS suplementados com 5% p/v de mel. Em intervalos de 12 horas foi verificado o crescimento através de densidade óptica. Os resultados obtidos revelaram redução do crescimento.

O mel contém inúmeros componentes que agem como preservativos, como por exemplo, α -tocoferol, ácido ascórbico, flavonóides e outros fenólicos, além de enzimas como a glicose oxidase, catalase, e peroxidase (CRANE, 1975; FERRERES et al., 1993).

Antony et al., (2002), avaliaram o efeito de mel granulado sobre a oxidação em carne de peru. Os resultados obtidos revelaram que a adição de 15% de mel inibiu o desenvolvimento de compostos oxidativos no peito de peru. Os autores sugerem que o mel pode atuar como antioxidante natural.

Resultados obtidos por Nagai et al., (2006), revelaram que amostras de carnes tratadas com 5% de mel v/v e estocadas em câmaras frias a 10°C dentro de sacos de polietileno tiveram sua carga microbiana reduzida. Os autores sugerem que vários tipos de mel de diferentes origens florais possuem forte atividade antioxidativa e antibacteriana.

Segundo Effem (1988) a osmolaridade do mel é um importante fator, o qual irá determinar a eficiência do mel como agente antimicrobiano em fermentos da pele.

Vargas (2006) avaliou a atividade antimicrobiana de sete méis de diferentes fontes florais contra *S. aureus* e *E. coli*. O autor relatou que todas as amostras de méis exibiram efeito inibitório contra os microrganismos testados, sendo que o maior halo de inibição (44mm) de diâmetro foi encontrado para *S. aureus*.

3.8 Mel de Abelhas Brasileiras

A maior parte do mel produzido e comercializado no mundo vem da produção das abelhas *Apis mellifera*, as quais foram introduzidas no Brasil a partir da Europa e África (LOPES, FERREIRA e SANTOS, 2005). Entretanto, o mel de abelhas sem ferrão tem merecido destaque devido às várias propriedades atribuídas a este mel.

As abelhas nativas brasileiras possuem um ferrão atrofiado e por isso não apresentam riscos aos indivíduos. Portanto são conhecidas como “abelhas sem ferrão”. Taxonomicamente são subdivididas em duas tribos: Meliponini formada apenas pelo gênero *Melipona*, e Trigonini que agrupa um grande número de gêneros. O mel das abelhas sem ferrão apresenta composição diferente do mel de *Apis mellifera*. São mais fluidos e cristalizam lentamente (UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA, 2007).

Os meliponíneos, classificação dada às abelhas sem ferrão, são dóceis, de fácil manejo e necessitam de pouco investimento para a sua criação. É uma atividade que pode ser integrada aos plantios florestais, de fruteiras e de culturas de ciclo curto, podendo contribuir, através da polinização, com o aumento da produção agrícola e regeneração da vegetação natural (VENTURIERI, RAIOL e PEREIRA, 2003).

Segundo Couto (1998), vários estudos comprovam a contribuição das abelhas no meio ambiente, na preservação da vida vegetal e também na manutenção da variabilidade genética das espécies vegetais. Abelhas não significam somente lucro procedente de seus produtos (própolis, mel, geléia real, veneno, cera) e sim preservação da vida.

As abelhas nativas brasileiras, conhecidas também como abelhas sem ferrão, possuem ninhos que são verdadeiras obras de arte. Essas abelhas se alojam em ocos de velhas árvores, cipós ou bambus, tijolos ocos, frestas nas paredes, cabaças, panelas, entre outros. Após se alojarem, utilizam como matéria-prima o barro, a cera e a resina para o acabamento. A combinação cera e resina chamada de cerume não é casual pois une as características de maleabilidade e isolamento térmico da cera ao poder antibiótico das resinas. A entrada dos ninhos varia de acordo com a espécie, podendo ser enormes aberturas feitas de barro ou canudos de cera, estes são fechados à noite (ALONSO, 1998).

Na criação de abelhas existem duas grandes linhas de estudos: a apicultura e a meliponicultura. Dentro da apicultura, o conhecimento sobre o mel já vem sendo estudado em

várias regiões do Brasil. No entanto na meliponicultura são poucos os estudos publicados sobre as propriedades do mel dessas abelhas (RODRIGUES et al., 2005).

A meliponicultura é o nome dado à criação de abelhas indígenas sem ferrão. Ela foi desenvolvida inicialmente pelos índios e com o passar do tempo vem despertando interesse de pequenos e médios produtores, assim como produtores de base familiar. Essa atividade não apresenta riscos de acidentes com enxames e proporciona lazer e satisfação ao criador. Pode ainda representar uma renda extra através da comercialização de produtos das abelhas sem ferrão (LACERDA, 2006).

A meliponicultura é praticada principalmente na Região Nordeste. Os meliponicultores conseguem coletar de 5 a 8 litros de mel por/colônia ao ano nessa região, o que, segundo os especialistas, está muito abaixo do potencial de produção dessas abelhas. O preço, porém, é compensador, cujo litro de mel é vendido por R\$ 40,00 no Nordeste, podendo alcançar até R\$ 100,00 na região Sudeste do país. (DRUMOND, 2007).

Segundo Kerr, Carvalho e Nascimento (1996) o mel das abelhas sem ferrão é um produto que tem apresentado uma demanda crescente de mercado, obtendo preços mais elevados que o das abelhas do gênero *Apis* em diferentes regiões do Brasil. Entretanto, pouco se sabe sobre as características físico-químicas que possibilitam definir padrões de qualidade para a sua comercialização.

Na Figura 1, pode-se observar a colônia e a abertura do ninho, respectivamente, de *Melipona quadrifasciata*, mais conhecida como mandaçaia, nome vulgar.



Figura 1: Colônia de mandaçaia (A); abertura feita de barro por abelha mandaçaia (B).

Fonte: autora

Segundo Alonso (1998), vários aspectos das abelhas sem ferrão e suas criações, têm atraído a sociedade em geral, como por exemplo: mel de excelente qualidade; facilidade de criação, podendo ser até na cidade; docilidade da maioria das espécies, entre outros.

O mel produzido pelas abelhas sem ferrão contém os nutrientes básicos necessários à saúde, como açúcares, proteínas e vitaminas. Esse mel possui, também, uma elevada atividade antibacteriana e é tradicionalmente usado contra doenças pulmonares, resfriados, gripe, fraqueza e infecções de olhos em várias regiões do país (DRUMOND, 2007).

Wiese (1986) atribui a este mel efeitos antiinflamatórios, analgésico, sedativo, expectorante e hiposensibilizador.

As abelhas sem ferrão perfazem aproximadamente 300 espécies. Dentre elas, a jataí (*Tetragonisca angustula*), a mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*), a uruçú amarela (*Melipona rufiventris e monduri*), a tiúba (*Melipona compressipes*), a jandaíra (*Melipona subnitida*), e borá (*Tetragona clavipes*) são as mais populares e têm destacado maior interesse pelos criadores. No entanto, o desmatamento, o uso indiscriminado de agroquímicos e a ação

predatória de melieros estão ameaçando de extinção muitas espécies dessas abelhas no Brasil (KERR, CARVALHO e NASCIMENTO, 1996).

Sendo assim, tornam-se de extrema importância ações educativas sobre a preservação das abelhas, destacando-se a prevenção das queimadas, o controle do lixo, o extrativismo da madeira bem como outras formas de preservar as abelhas e o ambiente, garantindo um desenvolvimento sustentável e uma melhoria na qualidade de vida.

Dentre as espécies de abelhas indígenas, a mandaçaia (*Melipona quadrifasciata*) foi o alvo deste estudo.

Mandaçaia, do Tupi significa “vigia bonito”, manda = vigia e çaia = bonito. Essa abelha possui cor negra com quatro listras amarelas em seu abdômen e entre as antenas possui pêlos negros. É uma espécie de aspecto robusto, medindo aproximadamente 12mm de comprimento. Trata-se de um dos mais bonitos meliponíneos e pode ser encontrada em ocos de árvores, cupinzeiros, ninhos de João-de-barro entre outros locais. Essas abelhas podem ser encontradas em São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia (LACERDA, 2006).

Segundo Monteiro (1998), o mel produzido pela Mandaçaia é procurado principalmente por seu sabor agradável e não enjoativo. É um mel bastante fluído com alto teor de umidade. Portanto está susceptível à fermentação, por isso é recomendável que fique sob temperaturas de refrigeração. Na natureza a Mandaçaia pode produzir de 1,5 a 2,0 litros de mel em épocas de boa florada, criada racionalmente, a produção pode aumentar.

Ao mel de abelhas indígenas atribuem-se várias propriedades terapêuticas. Entretanto são pouquíssimos os trabalhos publicados quanto aos constituintes e as propriedades desses méis.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção e Caracterização das Amostras de Mel

Mel de *Apis mellifera*: Foram utilizadas duas floradas distintas de mel, sendo uma amostra de florada silvestre colhida em 26 de julho de 2006 e uma amostra de florada assa-peixe colhida em 17 de novembro de 2006, fornecidas pelo Apiário Barra Limpa, localizado em Barra do Piraí-RJ.

Mel de abelha sem ferrão: Foi utilizado mel de abelhas brasileiras nativas da espécie *Melipona quadrifasciata*, conhecido como Mandaçaia colhido em abril de 2007 e fornecido pelo Meliponário de José Dias Lacerda, localizado em Xerém, RJ.

4.2 Microrganismos Probióticos

Foram utilizadas as seguintes culturas probióticas: *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactobacillus casei*-01 e *Bifidobacterium* BB-12, doadas pela Christian Hansen®, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* doadas pela Sacco®, *Lactobacillus casei* Shirota isolada da bebida láctea comercial Yakult.

As culturas na forma liofilizada foram diluídas em caldo MRS (Himedia®) e re-isoladas por estriamento em agar MRS (Himedia®) adicionado de 0,05% de cisteína (Vetec®) e incubadas a 36°C por 72 horas. Para a incubação de bifidobactérias foi utilizado

jarra de anaerobiose, utilizando o sistema comercial de geração de atmosfera anaeróbica (Anaerobac da Probac do Brasil). Para a incubação de lactobacilos as placas foram colocadas dentro de sacolas plásticas na qual o oxigênio foi removido parcialmente por meio de bomba plástica a vácuo e em seguida foram amarradas.

As linhagens de bifidobactérias foram mantidas sob congelamento à -18°C em leite em pó desnatado (Molico, Nestlé), reconstituído 12% p/v esterilizado à 121°C por 10 minutos acrescido de glicerol (15%) (GANCEL, DZIERSZINSKI e TAILLIEZ 1997). As linhagens de lactobacilos foram mantidas refrigeradas à 7°C em meio MRS (Himedia®) semi-sólido (0,7% agar-agar) suplementado com 0,05% cisteína-HCl (Vetec®) e 1,5% de carbonato de cálcio.

4.3 Outros Microrganismos

Para verificar atividade antimicrobiana do mel foram utilizados os seguintes microrganismos: *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) H10407 sorotipo O78:H11 produtora de enterotoxina termolábil tipo I e de uma enterotoxina termoestável (LT/ST – CFA/I⁺) procedente do laboratório de Bacteriologia da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ); *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram obtidas na forma liofilizada da coleção de culturas do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS); *Salmonella Typhimurium* pertencente à coleção de culturas do DTA/UFRRJ, sendo isolado de petisco de peixe; *Listeria innocua* fornecida em um meio semi-sólido (caldo Triptose contendo 0,4% de agar), pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Todos esses microrganismos foram mantidos em agar estoque inclinado à 7°C.

4.4 Análises Físico-Químicas dos Diferentes Tipos de Mel

4.4.1 Açúcares redutores

Foram determinados segundo o método do CAC (2001), baseado na capacidade dos açúcares redutores, como glicose e frutose, reduzirem o cobre presente na solução cuproalcalina (soluções de Fehling A + Fehling B, modificadas por Soxhlet) sob ebulição, utilizando-se azul de metileno como indicador. As análises foram feitas em duplicata.

4.4.2 Acidez titulável

A análise de acidez foram realizadas de acordo com o método 962.19 (AOAC, 2000), que se baseia na determinação da acidez livre lactônica, com a titulação da amostra, com solução de NaOH 0,05M, até atingir o pH 8,5. O pH foi determinado utilizando o potenciômetro 300M da marca Analyser®. As análises foram feitas em duplicata e os resultados expressos em miliequivalente por kg (meq/kg).

4.4.3 Atividade de água (Aa)

As análises de atividade de água foram realizadas em equipamento previamente calibrado da marca AQUALAB da Decagon® à temperatura de 26°C. As análises foram feitas em triplicata.

4.4.4 Umidade

A determinação da umidade das amostras de mel foi realizada pelo método refratométrico (AOAC, 2000). O princípio desse método consiste na determinação do índice de refração do mel à 20°C. A medida refratométrica fornece o teor de substância seca presente na amostra. Para obtenção da umidade do mel, aplica-se o índice de refração à uma tabela de referência, a qual fornece os dados de umidade (%) em relação ao índice de refração (IR) encontrado nas amostras. O refratômetro de ABBE da marca Carl Zeiss® foi utilizado para as análises. As análises foram feitas em duplicata.

4.5 Avaliação do Desempenho de Bactérias Probióticas em Leite Desnatado Adicionado de Mel.

4.5.1 Mel

Para este teste foi utilizado mel de *Apis mellifera* florada assá-peixe. O mel foi diluído a 50% (p/v) e pasteurizado à 78°C por 6 minutos em banho maria. Utilizou-se frasco testemunho no controle da temperatura. O binômio tempo/temperatura de 78°C/6' é uma boa condição de pasteurização para eliminar patógenos no mel (GONNET, LAVIE e LOUVEAUX, 1964).

4.5.2 Preparação dos leites fermentados

Leites fermentados foram preparados com os microrganismos probióticos separadamente, sendo eles: *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*-01, *Lactobacillus casei* Shirota, *Bifidobacterium* BB-12 e *Bifidobacterium lactis*. Inicialmente as culturas foram reativadas por três transferências sucessivas em leite em pó desnatado (Molico, Nestlé), reconstituído a 12%, esterilizado à 121°C por 10 minutos. Tanto as linhagens de bifidobactérias como as de lactobacilos foram incubadas à 36°C por até 72 horas em atmosfera normal.

Frascos contendo 200mL de leite em pó desnatado (Molico Nestlé) reconstituído a 12% p/v e esterilizados a 121°C por 10 minutos foram adicionados de 12mL da solução de mel à 50% de forma a obter uma concentração final de 3% de mel. Os frascos foram inoculados com 2% de cada cultura probiótica separadamente.

Foram preparados frascos controles para cada cultura, ou seja, sem adição de mel, acrescidos com 12mL de água destilada esterilizada. Em seguida os frascos foram incubados à 36°C por 24 horas. Foi estabelecido o tempo de 24 horas para o término da fermentação, uma vez que as culturas comportam-se de forma diferente. O tempo de 24 horas para a fermentação foi caracterizado como tempo zero (0) e após este período os frascos foram mantidos à temperatura de 7°C por até 46 dias, sendo avaliados nos seguintes intervalos de tempo: 0; 23; 35 e 46 dias quanto ao pH, acidez titulável e determinação da viabilidade. Esse teste foi realizado em três repetições.

4.5.3 Determinação de pH e acidez dos leites fermentados

O pH foi determinado utilizando o potenciômetro 300M da marca Analyser®. A acidez titulável foi determinada de acordo com a metodologia da Federação Internacional de Laticínios - FIL (1991).

Cálculo: $\% \text{ de ácido láctico} = \frac{V \times N \times f \times 0,09 \times 100}{v}$

Onde:

V = volume da solução de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação, em mL;

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 N;

0,09 = fator de conversão para ácido láctico;

v = volume da amostra, em mL.

4.5.4 Quantificações dos microrganismos probióticos

Para verificar a influência do mel sobre o crescimento dos microrganismos probióticos, 10 mL das amostras de leite fermentado foram diluídas em 90mL de água peptonada obtendo-se a diluição 10^{-1} , e sucessivamente até 10^{-6} em 9mL de água peptonada 0,1% (MicroMed®).

Em seguida foram semeadas, em duplicata, utilizando o método de espalhamento em superfície de 0,1mL das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} em agar MRS (Himedia®) acrescido com 0,05% de cisteína (Vetec®) com auxílio de alça de Drigalsky. Em seguida foram incubadas à 36°C por 72 horas em sacolas plásticas com oxigênio reduzido para as culturas de lactobacilos e em jarra de anaerobiose para as bifidobactérias. Os resultados foram expressos em Log UFC/mL.

4.6 Avaliação do Crescimento e Resistência a Sais Biliares das Culturas Probióticas em Caldo MRS adicionado de Mel

As culturas testadas neste experimento foram *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*-01, *Bifidobacterium* BB-12 e *Bifidobacterium lactis*. Foram inoculados 2% de cada cultura probiótica separadamente, em caldo MRS (Himedia®) adicionado ou não de 0,3% de sais biliares (Ox Gall) com ou sem adição de 3% de mel de *Apis mellifera* florada silvestre.

Inicialmente as culturas foram reativadas por três transferências sucessivas em caldo MRS (Himedia®) suplementado com 0,05% de cisteína. Tanto as linhagens de lactobacilos e de bifidobactérias foram incubadas à 36°C por 24 horas, porém estas últimas foram mantidas em frascos sob anaerobiose obtida por purga com nitrogênio seguida de imediata recravação, e posteriormente esterilização.

4.6.1 Efeito do mel e dos sais biliares sobre lactobacilos

Para as linhagens de lactobacilos, os testes com mel filtrado e pasteurizado foram feitos separadamente.

Mel pasteurizado: Frascos contendo 50 mL de caldo MRS contendo ou não 0,3% de sais biliares foram esterilizados à 121°C por 15 minutos, resfriados, e adicionados de 3 mL de uma solução 50% de mel previamente pasteurizada de modo a obter uma concentração final de 3,0% de mel. Na pasteurização da solução 50% de mel utilizou-se frasco esterilizada e água destilada esterilizada e aqueceu à 78°C por 6 minutos em banho-maria, usando um

frasco testemunha. Para verificar o efeito dos açúcares redutores foi feito um controle contendo uma concentração final de 1,89% de glicose considerando a adição de 3% de um mel com 63% de açúcares redutores. Para tanto preparou-se uma solução à 31,5% de açúcar redutor (glicose) esterilizada a 121°C por 15 minutos. Posteriormente adicionou-se 3 mL dessa solução ao frasco contendo 50 mL de caldo MRS. Também foram preparados frascos controle contendo apenas MRS e/ou MRS + sais biliares aos quais foram adicionados 3mL de água destilada esterilizada.

Os frascos foram inoculados com 2% da cultura probiótica. O conteúdo de cada frasco foi distribuído asépticamente em tubos estéreis que foram incubados à 36°C. Em intervalos de 3, 6, 12, 24, 30 e 36 horas um tubo foi retirado para avaliação do crescimento celular pela medida da densidade ótica a 620nm em espectrofotômetro Spectronic 2.0 da marca Bausch & Lomb®. A densidade ótica foi lida até 1,5 de absorbância, devido à precisão do aparelho. Tubos não inoculados serviram como branco.

Mel filtrado: Como algumas substâncias existentes no mel são termolábeis, utilizou-se também mel esterilizado por filtração. Dada a impossibilidade de filtração de soluções concentradas de mel, devido à alta viscosidade, foram preparadas soluções contendo 6% de mel. Essas soluções foram então filtradas em membrana de 0,22 µm. Volumes de 25 mL das soluções de mel foram adicionadas ao frasco contendo 25mL de caldo MRS em dupla concentração previamente esterilizado à 121°C por 15 minutos. Dessa forma foi obtido concentração final de 3% de mel. Foram preparados frascos controle sem mel e com uma concentração final de 1,89% de glicose, considerando o teor de açúcares redutores de uma solução 3% de mel com 63% de açúcar redutor. Para tanto preparou-se solução de glicose à 3,8% que foi esterilizada separadamente à 121°C por 15 minutos e adicionado 25mL desta solução ao frasco contendo 25mL de caldo MRS em dupla concentração. Também foram preparados frascos controle contendo apenas MRS e/ou MRS + sais biliares em concentração dupla aos quais foi adicionado igual volume de água destilada esterilizada.

O conteúdo de cada frasco foi distribuído asépticamente em tubos estéreis que foram incubados à 36°C. Em intervalos de 3, 6, 12, 24, 30 e 36 horas um tubo foi retirado para avaliação do crescimento celular pela medida da densidade ótica à 620nm em espectrofotômetro Spectronic 2.0 da marca Bausch & Lomb®. A densidade ótica foi lida até 1,5 de absorbância, devido à precisão do aparelho. Tubos não inoculados serviram como branco.

4.6.2 Efeito do mel e dos sais biliares sobre bifidobactérias

Para as linhagens de *Bifidobacterium*, os testes com mel filtrado e pasteurizado foram feitos simultaneamente. Quantidades de 25 mL do caldo MRS em dupla concentração foram transferidas para frascos de 50 mL provido de tampa de borracha. Em seguida foram purgados com nitrogênio para expulsar o oxigênio presente e imediatamente recravados (Figura 2). Posteriormente, os frascos foram esterilizados a 121°C por 15 minutos. A adição de 25mL das soluções de mel (filtrado ou pasteurizado), glicose ou água esterilizada foram feitas com auxílio de seringa esterilizada. Da mesma forma, a inoculação dos frascos com 2% de cada cultura bífida com 24 horas de crescimento foi feita com auxílio de seringa esterilizada de 1 mL. A seguir os frascos foram incubados a 36°C. Em intervalos de 3, 6, 12, 24, 30 e 36 horas volumes de aproximadamente 3mL foram retirados com auxílio de seringa esterilizada em fluxo laminar, para leitura da densidade ótica.



Figura 2. Purgação com nitrogênio (A); Recravação dos frascos (B).

4.7 Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Diferentes Tipos de Mel

4.7.1 Mel

Para esse teste foi utilizado mel de *Apis mellifera* florada assá-peixe e mel de Mandaçaia (abelha sem ferrão). Foram preparadas soluções de mel a 15% e 25% p/v.

As soluções de mel foram submetidas à pasteurização a 78°C por 6 minutos em banho maria utilizando frasco testemunho e também filtradas em membranas com porosidade de 0,22µm.

4.7.2 Soluções de glicose

O mel de *Apis mellifera* florada assá-peixe apresentou 80% de açúcares redutores e o mel de Mandaçaia 63%. Com base nesses valores foram preparadas soluções de glicose à 12% e 20% p/v que serviram de controle para o mel de assa-peixe e 9,45% e 15,75% p/v que serviram como controle para o mel de Mandaçaia. As soluções foram esterilizadas à 121°C por 15 minutos.

4.7.3 Avaliação do efeito de inibição

A técnica de difusão em agar empregada nesta pesquisa, foi uma modificação daquela desenvolvida por Rogers e Montville (1991) para determinação de nisina. Inicialmente os microrganismos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Salmonella Typhimurium* foram reativadas por três transferências sucessivas em caldo triptona soja (Merck®) e as culturas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Listeria innocua* em caldo infuso cérebro coração – BHI (Oxoid®) com incubação à 36°C por 24 horas, com exceção desta última cuja temperatura de incubação foi de 30°C.

A seguir semeou-se 0,2mL da cultura ativa na superfície de tubos contendo 15mL de agar BHI (Oxoid®) inclinado e posteriormente incubados à 36°C por 24 horas, com exceção de cultura de *Listeria innocua* que foi à 30°C. Em seguida, com o auxílio de alça de níquel cromo foi recolhido o crescimento celular da superfície dos tubos com solução tampão fosfato e posteriormente transferidos para um tubo esterilizado. A turbidez da suspensão foi ajustada na escala quatro de MacFarland.

Foram preparados frascos erlemayer contendo 200mL de agar Mueller Hinton (Merck®) esterilizados à 121°C por 15 minutos, resfriados e posteriormente inoculados com 1mL da suspensão das culturas microbianas. A seguir, a suspensão foi homogeneizada e quantidades de 20 mL foram vertidos em placas de Petri com auxílio de pipeta graduada esterilizada. Após a solidificação do meio, foram feitos 4 a 5 poçinhos em cada placa com auxílio de furador de metal esterilizado de 6,8 mm (Figura 3). Em seguida, os poços foram preenchidos com 50µL de cada uma das soluções de mel, como também com seus respectivos controles de solução de glicose e água destilada esterilizada, em triplicata.

As placas foram mantidas à 7°C por 12 horas, com o objetivo de dispersar as soluções no agar. Após este período foram incubadas à 30°C por 24 horas para a cultura de *L. innocua* e 36°C por 24 horas para as demais culturas testadas. Os halos de inibição foram medidos com paquímetro da borda do poço até a borda do halo onde não houve crescimento (Figura 4). A medição dos raios foi expressa em centímetro. O experimento foi repetido duas vezes.

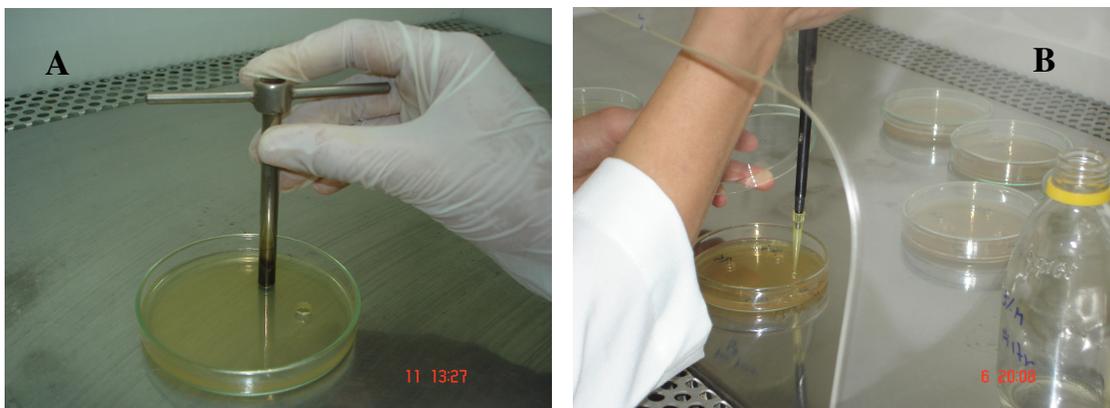


Figura 3. Processo de perfuração dos poços na placa de Petri (A); Distribuição das soluções de mel e glicose nos poços da placa de Petri (B).



Figura 4. Formação de halos de inibição de mel de Mandçaia sobre *Salmonella Typhimurium* (A); Medição dos halos de inibição com auxílio de paquímetro (B).

4.8 Análise Estatística

A partir dos resultados obtidos procedeu-se a Análise de Variância (ANOVA) e aplicou-se o teste de Tukey, mediante o programa *Statística 6.0*. Em todas as análises o valor de ($p < 0.05$) foi considerado como significante.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características Físico-químicas das Amostras de Mel

Os valores médios dos principais parâmetros físicos e químicos das amostras de mel de *Apis* e *Melipona* (Mandaçaia) estão apresentados na Tabela 1. A principal diferença observada entre os méis de *Apis* e mandaçaia foi o teor de umidade e atividade de água bem superiores neste último. O mel de abelhas nativas também apresentou uma acidez duas vezes maior que o mel de *Apis* florada assa-peixe, característica certamente importante para a sua conservação, compensando a maior atividade de água. Foi observado que o mel de mandaçaia é mais fluído e de cristalização lenta quando comparado com o mel de *Apis mellifera*, característica também observada por outros autores (ALVES et al., 2005; SOUZA et al., 2004a; SOUZA et al., 2004b).

Tabela 1. Valores médios de açúcares redutores, umidade, atividade de água e acidez titulável de mel de *Apis* e *Melipona*.

Análises	Mel			
	Legislação (Inst. Normativa nº 11 de 20/10/00)	<i>Apis mellifera</i>		<i>Melipona quadrifasciata</i>
		Silvestre	Assa-peixe	Mandaçaia
Açúcar redutor (%) **	Mínimo 65%	63,00	80,0	63,00
Umidade (%)**	Máximo 20%	18,3	17,4	21,0
Atividade de água (Aa)***	nd	0,59	0,57	0,79
Acidez (meq/Kg)**	Máximo 50meq/kg	42,94	36,69	77,50

Médias de três repetições em duplicata; *médias de três repetições em triplicata; Não determinado (nd).

Os valores encontrados para o mel de *Apis mellifera* florada assa-peixe, atendem aos parâmetros da legislação. O mel florada silvestre não atendeu a legislação somente para a porcentagem de açúcares redutores, a qual preconiza um valor mínimo de 65%, máximo de 20% para umidade e máximo de 50meq/kg de acidez titulável para mel floral (BRASIL, 2000).

A Legislação Brasileira regulamenta apenas a padronização do mel de *Apis mellifera* para fins de comercialização. Não existe padronização para o mel de meliponíneos, e estes por apresentarem características bem diferentes necessitam de novos estudos para o estabelecimento de uma futura legislação específica. Relacionando os valores do mel de mandaçaia com os padrões estabelecidos na legislação para o mel de *Apis mellifera*, pode ser observado que, estão fora dos padrões estabelecidos para açúcares redutores, umidade e acidez titulável, como apresentados na Tabela 1.

Komatsu, Marchini e Moreti (2002), relataram valores médios de 72,65% para açúcares redutores em diferentes tipos de mel. Estes valores são superiores aos encontrados nessa pesquisa para mel silvestre, o que pode estar relacionado à diferenças na umidade

ambiental das regiões produtoras. Vargas (2006) encontrou valores médios de 58,75% a 82,37% para açúcares redutores em mel.

Segundo Estupinan et al. (1998), mel com níveis de umidade igual ou superior a 20%, estão susceptíveis a fermentação por leveduras osmofílicas. Os mel do tipo “verde”, ou seja, que é colhido dos favos antes de terem seus alvéolos devidamente operculados pelas abelhas, está mais propenso a sofrer fermentação, uma vez que nessa condição apresenta alto teor de água. A umidade é uma das características mais importantes do mel e exerce grande influência sobre a sua preservação, granulação e viscosidade.

Os carboidratos presentes no mel representam a maior porção de matéria seca, sendo eles os principais responsáveis pela qualidade e propriedades físicas do mel, como por exemplo, viscosidade, higroscopicidade, tendências à cristalização, valor energético e atividade antimicrobiana (CRANE, 1975; WHITE, 1979).

Segundo Alves et al. (2005), o excesso de água encontrado no mel dos meliponíneos é devido à baixa taxa de desidratação do néctar durante o processo de transformação em mel.

Diferentemente do mel de *Apis* florada silvestre e assa-peixe, cujo índice de acidez estava dentro dos parâmetros da legislação, o mel de mandaçaia, apresentou acidez elevada, podendo vir a constituir-se num fator de inibição de microrganismos. Zumla e Lulat (1989) sugerem que o baixo pH do mel pode contribuir para o rompimento da parede celular bacteriana.

Segundo Horn (1996) os diferentes tipos de mel são ácidos, sendo o ácido glucônico produzido pela enzima glicose-oxidase sobre a glicose o mais comum. A acidez é um fator importante para a manutenção da estabilidade do mel, reduzindo o risco de desenvolvimento de microrganismos.

Os dados obtidos nesta pesquisa para o mel de mandaçaia são diferentes daqueles encontrados por Alves et al. (2005) os quais relataram valores médios de 28,76% de umidade, 74,82 de açúcares redutores e 43,48 meq/kg de acidez. Da mesma forma Souza et al. (2004a) relataram amostras de mel de *Melipona asilvai*, contendo 41,64 meq/kg para acidez, 68,89% de açúcares redutores e 29,49% de umidade, enquanto Souza et al. (2004b), observaram valores médios de 28,6% de umidade para mel de abelhas sem ferrão. Estes valores de umidade são altos para um teor relativamente elevado de açúcares redutores. Entretanto, estes autores não determinaram a atividade de água das respectivas amostras, o que possibilitaria comparar o teor de água livre disponível para o crescimento microbiano.

Rodrigues et al. (2005), estudando a composição físico-química do mel de abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em duas regiões no Estado da Paraíba, relataram que o mel de abelha nativa apresenta um maior teor de água (umidade de 25,25%) quando comparado com o mel de abelha africanizada (18,76%). A acidez total foi de 41,6 meq/kg e 28,3 meq/kg de mel, respectivamente para o mel de abelha africanizada e de abelha nativa.

5.2 Potencial Prebiótico de Mel Sobre o Desempenho de Bactérias Probióticas em Leite Fermentado.

Os resultados obtidos referentes a pH, acidez titulável e contagem de células viáveis nos leites fermentados por *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. durante 46 dias de estocagem à 7°C, estão apresentados nas Tabelas 2 e 3 respectivamente.

Tabela 2. Valores médios* de contagem de células viáveis em placas, acidez titulável e pH obtidos durante armazenamento de 0, 23, 35 e 46 dias, de leite fermentado por lactobacilos.

Análises	Tempo (dias)			
	0	23	35	46
<i>Lactobacillus acidophilus</i> SACCO®				
Contagem de células viáveis com mel (Log UFC/mL)	8,38a	8,30a	8,35a	8,33a
Controle (sem mel)	8,48a	8,70a	8,13a	7,25b
Acidez Titulável com mel (%)	1,39a	1,58a	1,69a	1,64a
Controle (sem mel)	1,33a	1,60a	1,71a	1,66a
pH com mel	3,64a	3,42a	3,57a	3,53a
Controle (sem mel)	3,63a	3,37a	3,52a	3,44a
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5 Christian Hansen®				
Contagem de células viáveis com mel (Log UFC/mL)	8,69a	8,17a	8,25a	8,24a
Controle (sem mel)	8,60a	8,36a	8,29a	7,45a
Acidez Titulável com mel (%)	0,91a	1,05a	1,22a	1,18a
Controle (sem mel)	0,69a	1,20a	1,05a	1,13a
pH com mel	4,40a	3,87a	4,06a	4,01a
Controle (sem mel)	4,87a	3,94a	4,14a	4,06a
<i>Lactobacillus casei-01</i> Christian Hansen®				
Contagem de células viáveis com mel (Log UFC/mL)	9,25a	9,21a	9,22a	9,21a
Controle (sem mel)	9,14a	9,01a	9,14a	8,79a
Acidez Titulável com mel (%)	0,81a	1,10a	1,24a	1,44a
Controle (sem mel)	0,54a	1,13a	1,02a	1,18a
pH com mel	4,47a	3,62a	3,95a	3,80a
Controle (sem mel)	5,25b	4,06a	4,18a	4,03a
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota (Yakult)				
Contagem de células viáveis com mel (Log UFC/mL)	9,26a	8,63a	8,84a	9,16a
Controle (sem mel)	9,18a	8,71a	8,77a	8,86a
Acidez Titulável com mel (%)	0,70a	1,24a	1,24a	1,43a
Controle (sem mel)	0,38a	0,94a	0,84b	0,85b
pH com mel	4,65a	3,73a	3,85a	3,80a
Controle (sem mel)	5,32b	4,13a	4,14a	4,04a

*Valores médios de 3 repetições. Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para a mesma análise quando comparada com seu respectivo controle

Tabela 3. Valores médios* de contagem de células viáveis em placas, acidez titulável e pH obtidos durante armazenamento de 0, 23, 35 e 46 dias, de leite fermentado por bifidobactérias.

Análises	Tempo (dias)			
	0	23	35	46
<i>Bifidobacterium BB-12 Christian Hansen</i>[®]				
Contagem de células viáveis com mel (Log UFC/mL)	8,12a	8,09a	7,84a	7,63a
Controle (sem mel)	6,71a	6,93a	6,60a	6,11a
Acidez Titulável com mel (%)	0,51a	0,59a	0,57a	0,61a
Controle (sem mel)	0,27b	0,27b	0,28b	0,30b
pH com mel	4,93a	5,39a	5,37a	4,92a
Controle (sem mel)	5,51a	6,11a	6,19b	5,76b
<i>Bifidobacterium lactis Sacco</i>[®]				
Contagem de células viáveis com mel (Log UFC/mL)	8,94a	8,61a	8,73a	9,11a
Controle (sem mel)	8,80a	8,21a	8,13b	8,78a
Acidez Titulável com mel (%)	0,56a	0,85a	1,02a	1,11a
Controle (sem mel)	0,40a	0,80a	0,73b	0,84b
pH com mel	4,82a	4,68a	4,22a	4,11a
Controle (sem mel)	5,38b	4,87a	4,83b	4,65b

*Valores médios de 3 repetições. Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para a mesma análise quando comparada com seu respectivo controle.

Um microrganismo para ser considerado probiótico deve atender uma série de requisitos, sendo a viabilidade um dos principais. As células viáveis do(s) probiótico(s) devem estar presentes em concentrações mínimas exigidas até o momento de consumo.

Todas as culturas mantiveram-se viáveis durante os 46 dias de armazenamento à 7°C, independente de terem sido cultivadas com ou sem mel (Tabelas 2 e 3). Dessa forma todos os microrganismos atenderam os parâmetros exigidos pela legislação vigente, que preconiza contagem mínima de 10^7 UFC/mL para leite acidófilo e 10^6 UFC/mL para leite fermentado ou cultivado (BRASIL, 2000a).

Resultados semelhantes foram obtidos por Vinderola et al, (2000) com *L. casei*, *L. acidophilus* e bifidobactérias, porém utilizadas no processamento de queijo fresco argentino, os autores observaram sobrevivência satisfatória das culturas utilizadas durante 60 dias, em níveis superiores a 10^6 UFC/g.

Lankaputhra, Shah e Britz (1996a) e Samona e Robinson, (1991), sugerem que os alimentos ou suplementos contendo probióticos, devem conter acima de 10^5 UFC/g durante todo o período de validade do produto. Outros autores sugerem que os produtos fermentados, no momento do consumo, devem conter no mínimo 10^6 UFC/mL células probióticas viáveis, devido a dose mínima terapêutica diária ser de 10^8 - 10^9 células viáveis em 100g do produto fermentado. (GOMES e MALCATA, 1999).

O maior número de células viáveis aos 46 dias de armazenamento à 7°C foram obtidos com linhagens de *L. casei* com adição de 3% mel (p/v), sendo 9,21 \log_{10} UFC/mL para *L. casei*-01 e 9,16 \log_{10} UFC/mL para a linhagem de *L. casei* Shirota (Tabela 2). Entretanto, a

influência do mel sobre o crescimento e viabilidade destas culturas não foi significativamente maior que no controle ($p > 0,05$).

Varga (2006) verificou que a adição de 1,0 e 5,0% (p/v) de mel em iogurtes refrigerados por 6 semanas a 4°C, não tiveram influência significativa nas características sensoriais do produto ou na viabilidade da cultura composta de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*.

Vários fatores como acidificação do produto final, ácidos produzidos durante o armazenamento, nível de oxigênio no produto, permeação do oxigênio através da embalagem, compostos antimicrobianos, e a perda de nutrientes do leite podem reduzir a viabilidade e, conseqüentemente, as propriedades probióticas dos microrganismos (ANDRIGHETTO e GOMES, 2003).

Ao longo de 46 de armazenamento à 7°C a acidez dos leites fermentados pelas linhagens de *L. casei* foi aumentando. Essas culturas mostraram boa capacidade de pós-acidificação, cujos valores de acidez nas fermentações com mel atingiram 1,44% e 1,43% respectivamente para *L. casei*-01 e *L. casei* Shirota, no entanto, sem efeitos inibitórios para a viabilidade celular. Não houve inibição do crescimento no cultivo de *L. casei* Shirota cujos níveis de acidez foram significativamente maiores ($p < 0,05$) na presença de mel com 35 e 46 dias de armazenamento. Portanto, o mel contribuiu para acelerar o metabolismo (fermentação) sem interferir na viabilidade da célula (Tabela 2).

Os valores de pH dos leites fermentados pelos cultivos de *L. casei* com adição de mel mostraram-se ser significativamente menores que o pH dos controles, porém apenas no tempo zero, com valores de 4,47 e 5,25 respectivamente para *L. casei*-01 e 4,65 e 5,32 para *L. casei* Shirota (Tabela 2).

Na Tabela 2 pode ser observado que o probiótico *L. acidophilus* Sacco® no 46º dia mostrou um crescimento significativamente maior ($p < 0,05$) na presença de mel. Dessa forma, o mel contribuiu para o crescimento e manutenção da viabilidade, com valores em torno de $8,33 \log_{10}$ UFC/mL durante os 46 dias, enquanto no controle houve redução de um ciclo logarítmico. Mesmo nos controles as contagens deste microrganismo foram superiores a 10^6 UFC/mL. Estes resultados foram mais satisfatórios que os obtidos por Bozanic, Rogeli e Tratnik (2001). Estes autores relataram que o *L. acidophilus* permaneceu viável em torno de 10^6 UFC/g, por 21 dias de estocagem a 4°C em leites fermentados.

Os resultados obtidos neste estudo, contradizem aos de Oliveira et al, (2002) considerando que as duas linhagens de *L. acidophilus* pesquisadas, mantiveram-se viáveis com contagens superiores a 10^6 UFC/mL em ambas as fermentações (com e sem mel).

Contudo, trabalhos apontam à perda de viabilidade desses microrganismos quando estocados por longos dias sob temperatura de refrigeração. Oliveira et al, (2002) relataram a redução de 1,0 ciclo logarítmico nas contagens de *L. acidophilus* após 28 dias de estocagem a 4°C em fermentação apenas com este microrganismo.

Apesar da viabilidade dos probióticos observados neste trabalho, o mel não estimulou significativamente o probiótico *L. acidophilus* LA-5 Christian Hansen® (Tabela 2).

A constante produção de ácidos, chamada também de pós-acidificação (OLIVEIRA e DAMIN, 2003) foi principalmente observada para as linhagens de *L. acidophilus* e *L. casei*, (Tabela 2) enquanto que as linhagens de bifidobactérias com menor capacidade de pós-acidificação. O leite fermentado pela linhagem de *B. BB-12* adicionado de mel apresentou 0,61% de acidez com 46 dias de armazenamento, e a linhagem de *B. lactis* 1,11%, dados que podem ser observados na Tabela 3.

O ácido láctico é o principal produto do metabolismo das bactérias lácticas (cerca de 70 a 90% dos compostos gerados) e é sintetizado durante todo o processo de fermentação da lactose (FERREIRA, 2003). A produção de ácido láctico nos leites fermentados, contribui para a desestabilização das micelas de caseína e, conseqüentemente, para a formação do gel, além

de proporcionar o seu sabor ácido característico, podendo também acentuar o aroma do produto. Durante a estocagem refrigerada dos produtos lácteos fermentados, pode haver aumento da acidez titulável. Estas mudanças na acidez estão relacionadas com vários fatores, por exemplo: temperatura de refrigeração, tempo de armazenamento e poder de pós-acidificação das culturas utilizadas (GURGEL e OLIVEIRA, 1995).

Nesta pesquisa pode ser observado, que a maior produção de ácido láctico entre todos os microrganismos testados, ocorreu com *L. acidophilus* Sacco[®], que com 46 dias de estocagem atingiu 1,64% de acidez e pH 3,53. Sendo assim, este microrganismo possui facilidade de adaptação em meios ácidos, já que manteve-se em níveis de 8,33 log₁₀ UFC/mL durante os 46 dias de estocagem (Tabela 2).

Não houve diferenças significativas de acidez e pH nos intervalos de tempo de 0, 23, 35 e 46 dias de armazenamento para as duas linhagens de *L. acidophilus* em relação aos seus controles sem mel. Foi observado um aumento constante da acidez e redução do pH em ambas as fermentações (com e sem mel) até o trigésimo quinto dia, havendo redução dos níveis de acidez com e sem mel no 46º dia. A acidez não interferiu no crescimento dos lactobacilos, pois mesmo em níveis elevados, os microrganismos mantiveram sua viabilidade em torno de 8,0 log₁₀ UFC/mL na presença de mel e em torno de 7,0 log₁₀ UFC/mL na ausência. Os valores médios de acidez nos leites acidófilos (com e sem adição de mel) atenderam os parâmetros da legislação, a qual preconiza 0,6-2,0g de ácido láctico/100g (BRASIL, 2000a) (Tabela 2).

Estudos similares foram realizados por Curda e Plockova (1995), que avaliaram o efeito do mel em concentrações de (0, 1, 3, 5 e 10%) adicionados em leite sobre o crescimento de *Lactobacillus acidophilus* e cultura de bactérias mesófilas consistindo de *Lactococcus lactis*, subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis*, subsp. *cremoris* e *Lactococcus lactis*, subsp. *lactis*, biovar. *diacetylactis*, através da técnica de impedância. O mel foi esterilizado a 121°C por 15 minutos e como controle utilizou-se o mel sem tratamento. Os resultados revelaram que *L. acidophilus* foi inibido em concentrações superiores a 5% de mel, independente do tratamento, enquanto as culturas mesófilas foram inibidas somente pela concentração 10% de mel não tratado, não sendo inibidas por nenhuma das concentrações de mel esterilizado.

Barreto et al, (2003) avaliaram a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em 177 amostras de 15 marcas de produtos probióticos comercializados no Brasil. Em 52% dos produtos contendo o probiótico *L. acidophilus*, as contagens estavam abaixo de 10⁵ UFC/g e em 64% das amostras apresentaram contagens de bifidobactérias abaixo de 10⁵ UFC/g.

O mel exerceu efeito positivo significativo (p<0,05) sobre a cultura de *Bifidobacterium lactis* Sacco[®] com 35 dias de armazenamento à 7°C. A acidez dos leites fermentados adicionados de mel com 35 e 45 dias foi significativamente maior em relação ao controle. E quanto aos valores de pH, o mel exerceu efeito positivo nos tempo 0, 35 e 46 dias de armazenamento (Tabela 3).

A acidez dos leites adicionados de mel fermentados por *Bifidobacterium* BB-12, durante os 46 dias de armazenamento foi significativamente maior em relação ao controle (Tabela 3).

Os resultados obtidos nesta pesquisa corroboram com os resultados relatados por Kajiwara, Gandhi e Ustunol (2002) que verificaram o crescimento de bifidobactérias em meio de cultura suplementado com 5% de mel por 48 horas de incubação a 37°C sob anaerobiose. Esses autores relataram que houve aumento do crescimento das culturas em meio suplementado com mel ou oligossacarídeos.

Ustunol e Gandhi (2001) verificaram a viabilidade de linhagens de *Bifidobacterium* spp. em leites adicionados de mel, sacarose, frutose ou glicose. Os resultados obtidos pelos autores revelaram que a viabilidade de *Bifidobacterium* spp foi maior comparada aos controles dos açúcares comerciais, por um período de 14 dias de estocagem sob refrigeração.

Os menores valores quanto ao número de células viáveis com 46 dias foram encontrados para *Bifidobacterium* BB-12, que passou de 8,12 log₁₀ UFC/mL no tempo zero para 7,63 após 46 dias de armazenamento nos cultivos com mel e de 6,71 a 6,11 log₁₀ UFC/mL nos cultivos sem mel (Tabela 3).

Por outro lado, nos cultivos de *Bifidobacterium lactis* Sacco® não foi detectada redução da viabilidade. O número de células viáveis passou de 8,94 log₁₀ UFC/mL no tempo zero para 9,11 após 46 dias de armazenamento nos cultivos com mel e de 8,80 a 8,78 log₁₀ UFC/mL nos cultivos sem mel. Aos 46 dias de estocagem à 7°C, o pH destes cultivos foi de 4,11 e 1,11% de acidez (Tabela 3). Pode-se concluir que esta linhagem possui boa capacidade de adaptação em pH reduzido e níveis altos de acidez. Entretanto a linhagem BB-12, apesar de ser da mesma espécie, teve um comportamento bem diferente. Dessa forma podemos concluir que a seleção de linhagens específicas é de suma importância para a utilização em produtos probióticos. Esses dados corroboram com aqueles relatados por Gomes, Malcata e Klaver, (1998a) e Gomes, Teixeira e Malcata, (1998b). Estes autores relataram que algumas espécies de bifidobactérias de origem animal, são mais facilmente cultivadas e podem resistir ao baixo pH como também a baixos níveis de oxigênio. Citam ainda que *B. lactis*, é considerada uma das mais promissoras, pois possui boa tolerância ao oxigênio e ao ácido.

Os oligossacarídeos exercem efeitos comprovadamente prebióticos sobre a microbiota benéfica intestinal. Com esse intuito, Villaluenga et al, (2006) avaliaram a influência da rafinose, um trissacarídeo, sobre a sobrevivência de *Bifidobacterium lactis* Bb-12 e *Lactobacillus acidophilus* La-5 em leites fermentados durante 21 dias refrigerados a 4°C. A cultura de *Bifidobacterium lactis* Bb-12 provou ser mais sensível que o *L. acidophilus* La-5. O aumento da resistência dos probióticos a temperatura de 4°C foi mostrado na presença de rafinose, com médias de aproximadamente 7 log₁₀ células viáveis com 21 dias e 6,2 log₁₀ sem a rafinose.

Na Tabela 3, pode ser observado que no 35º dia de armazenamento a 7°C, tanto os resultados das contagens como os de acidez titulável e o pH obtidos com *Bifidobacterium lactis* foram significativamente diferentes (p<0,05) dos obtidos nos controles. Estes resultados comprovam que esta cultura apresenta boa tolerância a acidez, já que o metabolismo mais acentuado em presença de mel não interferiu, e até estimulou o crescimento.

A cultura *Bifidobacterium* BB-12, apesar de também ser da espécie *lactis*, apresentou maior sensibilidade à acidez comparada a linhagem de *B. lactis* Sacco®. A acidez foi aumentando ao longo dos 46 dias, porém os valores obtidos não atendem a legislação, a qual estabelece valores de 0,6 - 2,0 gramas de ácido láctico/100g (BRASIL, 2000a), e somente no quadragésimo sexto dia a acidez produzida na fermentação com mel atendeu aos parâmetros da legislação, com valor de 0,61% (Tabela 3).

O mel por conter um alto teor de carboidratos fermentáveis, propicia maior produção de ácido e conseqüente abaixamento do pH. Os valores médios de pH obtidos nos cultivos de *Bifidobacterium* BB-12 em presença de mel foram significativamente diferentes dos controles sem mel (p<0,05). Entretanto, os valores de pH e acidez não afetaram a viabilidade deste probiótico (Tabela 3).

As espécies de bifidobactérias apresentam baixa capacidade de pós-acidificação durante estocagem (GOMES e MALCATA, 1999). Os relatos desses autores corroboram com os dados observados nesta pesquisa com as duas linhagens de bifidobactérias, principalmente por *Bifidobacterium* BB-12 Christian Hansen.

Segundo Rasic e Kurmann (1983) e Danone (1997), os valores ótimos de pH para o crescimento de bifidobactérias estão entre 6,0-7,0, com ausência de crescimento em valores de pH ácidos de 4,5-5,0. Os dados obtidos nesta pesquisa contradizem os relatos desses autores, considerando que *Bifidobacterium* BB-12, permaneceu viável com 7,63 log₁₀

UFC/mL em pH 4,92 e 0,61% de acidez e *Bifidobacterium lactis* com 9,11 log₁₀ UFC/mL em pH 4,11 e 1,11% (Tabela 3).

Chick, Shin e Ustunol (2001) avaliaram a influência do mel e outros açúcares quanto a acidez e viabilidade de quatro culturas: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrukei* subsp *bulgaricus*, e *Bifidobacterium bifidum*. Os microrganismos foram inoculados em leite reconstituído 12% suplementado com 5% de mel, 5% de frutose e 5% de sacarose, separadamente. As amostras foram analisadas nos tempos 0 e 24h. Todas as culturas permaneceram viáveis na presença de mel e nos outros açúcares, porém a viabilidade não foi significativamente diferente entre os meios. A adição de 5% de mel nos leites não foi inibitório para as culturas. A produção de ácido láctico por *Bifidobacterium bifidum* foi significativamente maior na presença de mel, quando comparado com outros açúcares. Segundo os dados obtidos, os autores descartaram a hipótese de que a frutose presente no mel possa ser um fator contribuinte para o aumento da produção de ácido láctico por bifidobactéria, sugerindo que os oligossacarídeos presentes no mel são os responsáveis pelo aumento da produção de ácido láctico.

Em estudo realizado por Ustunol (2005), foi verificado que a adição de 3% e 5% de mel em leites fermentados por *Bifidobacterium* Bf-1 e *Bifidobacterium* Bf-6 *Bifidobacterium infantis* (Rhone Poulenc Inc.), *Bifidobacterium infantis* (Chr.Hansen) *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium bifidum*, aumentaram a taxa de crescimento durante a fermentação e a viabilidade quando comparados com o controle e outros açúcares na maioria das linhagens. Foi também comparado com oligossacarídeos comerciais, como inulina, frutooligossacarídeo e galactooligossacarídeo. A viabilidade foi testada durante 28 dias sob refrigeração a 4°C. O autor concluiu que a influência do mel no crescimento e viabilidade é específica para cada linhagem e que não houve diferenças significativas no crescimento das seis linhagens na presença de mel comparados com oligossacarídeos comerciais.

Zacarchenco e Massaguer-Roig (2004) avaliaram o pH, acidez titulável e contagens de células viáveis de três leites fermentados armazenados por 21 dias a 4°C. A maior acidez e menor pH foram obtidos no leite fermentado por *S. thermophilus*, enquanto o leite fermentado por *B. longum* apresentou a menor acidez e maior pH. As contagens de células viáveis de *S. thermophilus* foi de (10⁹ e 10⁸ufc/ml) e *B. longum* (10⁸ufc/ml), tanto no leite fermentado elaborado pela mistura como nos isolados, mantiveram-se constantes por 21 dias de estocagem. Houve redução um ciclo logarítmico, nas contagens *L. acidophilus* que permaneceu em 10⁷ UFC/mL por 21 dias.

Por outro lado, Lankaputhra, Shah e Britz (1996b) relataram que a viabilidade de *Bifidobacterium infantis* em leite reconstituído 12% à pH 4,3 mostrou uma diminuição de 30% no crescimento com 12 dias de estocagem a 4°C e mais de 82% de redução com 24 dias.

5.3 Crescimento e Resistência a Sais Biliares em Caldo MRS adicionado de Mel

5.3.1 Crescimento e resistência de lactobacilos

Os resultados de crescimento e resistência aos sais biliares de lactobacilos na presença de mel filtrado estão apresentados na Tabela 4 e Figuras 5, 6 e 9, e na presença de mel pasteurizado na Tabela 5 e Figuras 7, 8 e 10.

Tabela 4. Valores médios* de densidade ótica referente ao crescimento de lactobacilos em presença de mel filtrado com e sem sais biliares e sua resistência aos sais.

Microrganismos	Tempo					
	3h	6h	12h	24h	30h	36h
<i>L. acidophilus</i> (Sacco) em 0,3% de sais						
	Densidade ótica (620nm)					
3% de mel	0,08a	0,10a	0,10a	0,12a	0,12a	0,14a
1,89% de glicose	0,12a	0,13a	0,14a	0,24a	0,26a	0,29a
Controle	0,10a	0,15a	0,17a	0,60a	0,60a	0,61a
<i>L. acidophilus</i> (Sacco) na ausência de sais						
3% de mel	0,40a	0,74a	1,05a	1,50a	1,09a	1,26a
1,89% de glicose	0,48a	0,88a	1,29a	1,50a	1,50a	1,50a
Controle	0,49a	0,95a	1,36a	1,50a	1,50a	1,50a
<i>L. acidophilus</i> LA-5 (Chr. Han.) em 0,3% de sais						
3% de mel	0,01a	0,02a	0,08a	0,55b	0,71b	0,80b
1,89% de glicose	0,01a	0,05a	0,25a	1,41a	1,42a	1,48a
Controle	0,02a	0,06a	0,33a	1,44a	1,46a	1,50a
<i>L. acidophilus</i> LA-5 (Chr. Han.) na ausência de sais						
3% de mel	0,01a	0,07a	0,43a	1,43a	1,49a	1,49a
1,89% de glicose	0,03a	0,08a	0,45a	1,16a	1,08a	1,25a
Controle	0,01a	0,11a	0,45a	1,11a	1,14a	1,13a
<i>L. casei</i> -01 (Chr. Han.) em 0,3% de sais						
3% de mel	0,16a	0,16a	0,17a	0,46b	0,62b	0,60b
1,89% de glicose	0,16a	0,22a	0,32a	1,49a	1,50a	1,50a
Controle	0,21a	0,35a	0,70a	1,50a	1,50a	1,50a
<i>L. casei</i> -01 (Chr. Han.) na ausência de sais						
3% de mel	0,54a	1,07a	1,45a	1,50a	1,50a	1,50a
1,89% de glicose	0,61a	1,13a	1,46a	1,50a	1,50a	1,50a
Controle	0,69a	1,19a	1,50a	1,50a	1,50a	1,50a

*Valores médios de 3 repetições. Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para cada microrganismo na presença ou ausência de sais biliares.

Tabela 5. Valores médios* de densidade ótica referente ao crescimento de lactobacilos em presença de mel pasteurizado com e sem sais biliares e sua resistência aos sais.

Microrganismos	Tempo					
	3h	6h	12h	24h	30h	36h
<i>L. acidophilus</i> (Sacco) em 0,3% de sais						
	Densidade ótica (620nm)					
3% de mel	0,00a	0,01a	0,02a	0,05a	0,05b	0,06b
1,89% de glicose	0,01a	0,03a	0,05a	0,06a	0,05b	0,07b
Controle	0,00a	0,03a	0,03a	0,07a	0,66a	0,71a
<i>L. acidophilus</i> (Sacco) na ausência de sais						
3% de mel	0,02a	0,09a	0,91a	1,36a	1,50a	1,50a
1,89% de glicose	0,02a	0,11a	1,00a	1,50a	1,50a	1,50a
Controle	0,03a	0,09a	1,03a	1,50a	1,50a	1,50a
<i>L. acidophilus</i> (Chr. Han.) em 0,3% de sais						
3% de mel	0,01a	0,12a	0,90a	1,40a	1,50a	1,50a
1,89% de glicose	0,01a	0,14a	1,01a	1,50a	1,50a	1,50a
Controle	0,01a	0,16a	1,11a	1,50a	1,50a	1,50a
<i>L. acidophilus</i> (Chr. Han.) na ausência de sais						
3% de mel	0,02a	0,19a	1,02a	1,50a	1,50a	1,50a
1,89% de glicose	0,03a	0,20a	1,03a	1,50a	1,50a	1,50a
Controle	0,04a	0,39a	1,16a	1,50a	1,50a	1,50a
<i>L. casei</i> (Chr. Han.) em 0,3% de sais						
3% de mel	0,04a	0,15a	0,87a	1,50a	1,50a	1,50a
1,89% de glicose	0,02a	0,17a	1,12a	1,50a	1,50a	1,50a
Controle	0,02a	0,23a	1,15a	1,50a	1,50a	1,50a
<i>L. casei</i> (Chr. Han.) na ausência de sais						
3% de mel	0,05a	0,45a	1,50a	1,50a	1,50a	1,50a
1,89% de glicose	0,08a	0,53a	1,50a	1,50a	1,50a	1,50a
Controle	0,09a	0,55a	1,50a	1,50a	1,50a	1,50a

*Valores médios de 3 repetições. Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para cada microrganismo na presença ou ausência de sais biliares.

De maneira geral, não foi observada influência significativa do mel, tanto pasteurizado como filtrado sobre o crescimento dos lactobacilos, tanto na presença como na ausência de sais (Tabelas 4 e 5). Nenhum dos méis com diferentes tratamentos (filtrado e pasteurizado) tanto na presença como ausência de sais biliarens estimularam o crescimento das espécies de lactobacilos. Exceção para *L. acidophilus* (Chr. Han.), que na presença de mel filtrado sem sais biliarens apresentou maior crescimento a partir de 24 horas de incubação, porém estas diferenças não foram significativas ($p>0,05$) (Tabela 4).

Os cultivos de *L. acidophilus* (Chr. Han.) (Figura 5A) e *L. casei* (Figura 7A), foram inibidos pela presença de sais e mel filtrado a partir de 24 horas de incubação. Este efeito foi significativo ($p<0,05$) denotando presença de componente termolábil com ação antimicrobiana neste mel, já que o mesmo não foi observado em presença de mel pasteurizado.

Entre os fatores antimicrobianos existentes no mel, o peróxido de hidrogênio é um dos mais importantes. Este é formado pelo sistema glicose oxidase, cuja enzima glicose oxidase, originária das glândulas hipofaríngeas das abelhas (EMBRAPA, 2003) converte a glicose em gliconalactona, esta última é então metabolizada a ácido glicônico e peróxido de hidrogênio, um comprovado agente antimicrobiano (MOLAN, 1992). A enzima glicose oxidase é termolábil e pode ser destruída através do tratamento térmico de pasteurização, que comumente é aplicado ao mel (WHITE, SUBERS e SCHEPARTZ, 1962).

É possível que o maior crescimento observado em presença de mel pasteurizado deva-se ao menor teor de peróxido de hidrogênio neste mel reduzido pelo tratamento térmico ao qual foi submetido (Tabelas 4 e 5 e Figuras 6 e 8).

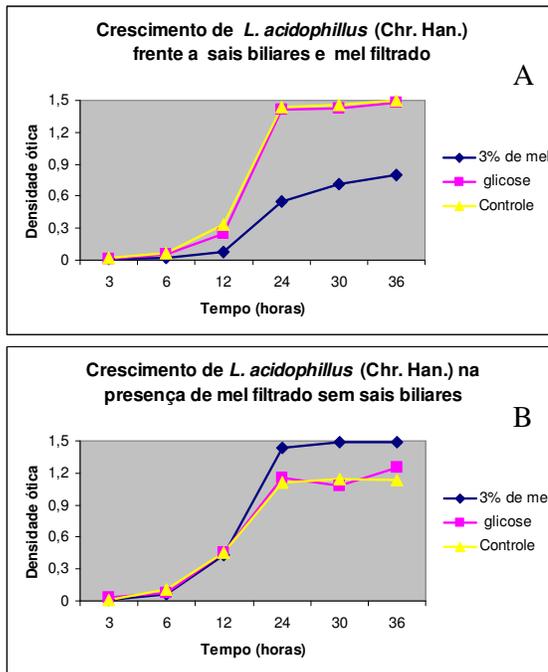


Figura 5: Crescimento de *L. acidophilus* (Chr. Han.) frente a 0,3% de sais biliarens na presença de mel filtrado e controles com e sem glicose (A); em presença de mel filtrado e controles com e sem glicose na ausência de sais (B).

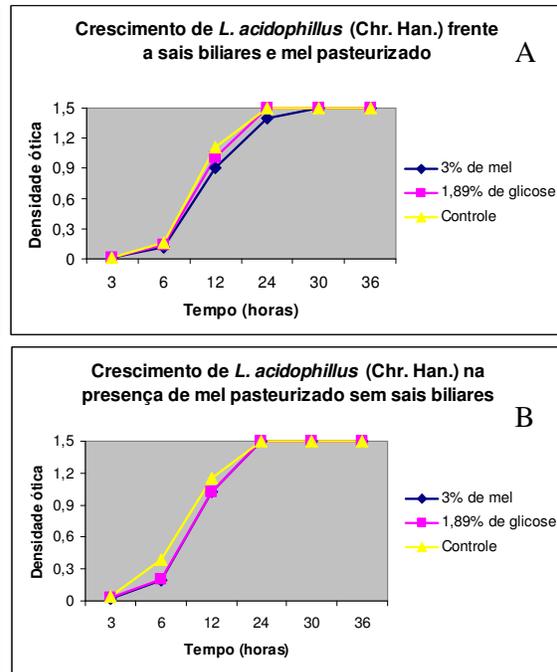


Figura 6: Crescimento de *L. acidophilus* (Chr. Han.) frente a 0,3% de sais biliarens na presença de mel pasteurizado e controles com e sem glicose (A); em presença de mel pasteurizado e controles com e sem glicose na ausência de sais (B).

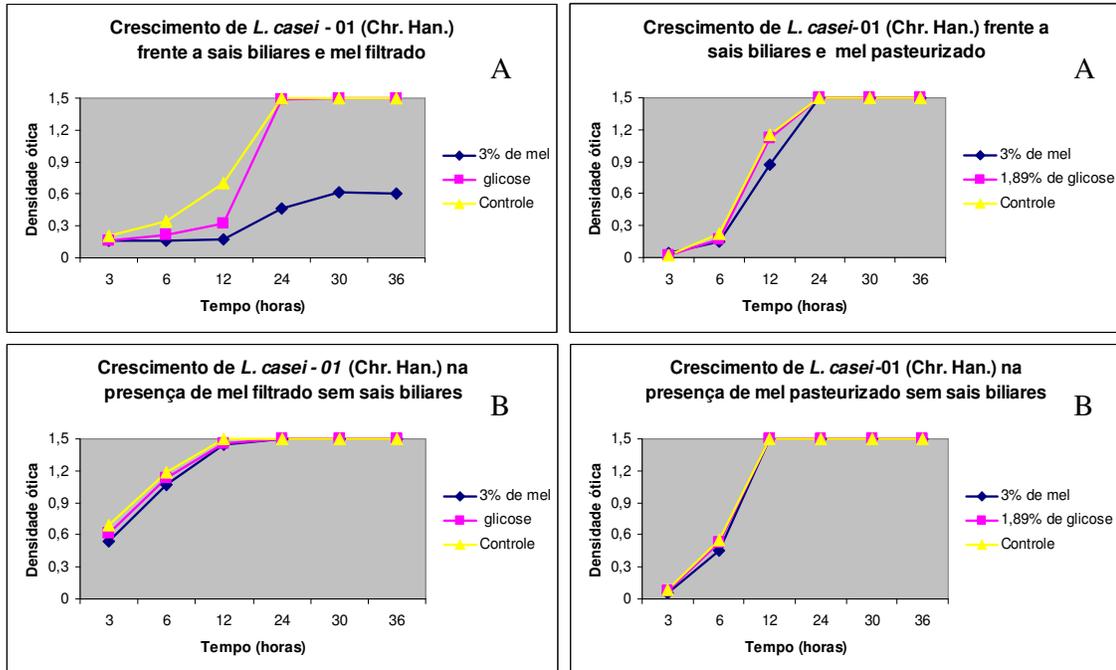


Figura 7: Crescimento de *L. casei* - 01 (Chr. Han.) frente a 0,3% de sais biliares na presença de mel filtrado e controles com e sem glicose (A); em presença de mel filtrado e controles com e sem glicose na ausência de sais (B).

Figura 8: Crescimento de *L. casei* -01 (Chr. Han.) frente a 0,3% de sais biliares na presença de mel pasteurizado e controles com e sem glicose (A); em presença de mel pasteurizado e controles com e sem glicose na ausência de sais (B).

A bile é uma solução aquosa de cor amarela esverdeada composta por substâncias orgânicas e inorgânicas e seu pH varia de 7,5-8,0. Os principais componentes da bile são: ácidos biliares, colesterol, fosfolípidos e pigmentos biliares. Sua principal função no organismo é atuar como um detergente biológico, o qual emulsifica e solubiliza gorduras (BEGLEY, GAHAN e HILL, 2005).

Os ácidos biliares constituem aproximadamente 50% dos componentes orgânicos da bile. Eles são sintetizados no fígado a partir do colesterol através de processos multi-enzimáticos. Os ácidos biliares primários (cólico e chenodeoxicólico) são sintetizados no fígado pelo colesterol, estes podem ser modificados pelas enzimas bacterianas presentes no intestino a ácidos biliares secundários (ácido deoxicólico e litocólico) (BEGLEY, GAHAN e HILL, 2005).

Os ácidos biliares secundários podem prejudicar o intestino diretamente e são também parcialmente absorvidos, contribuindo ao longo da vida do hospedeiro, para o processo de envelhecimento, câncer entre outros (MITSUOKA, 1992).

Os probióticos utilizados como adjuntos da dieta devem ser linhagens que sobrevivam as condições do estômago e do duodeno, para posteriormente chegar ao intestino. Dessa forma, a tolerância à bile é considerada uma importante propriedade de bactérias probióticas, pois possibilita que o microrganismo sobreviva durante o longo trânsito intestinal, para subsequentemente, crescer e colonizar o epitélio intestinal (ZAVAGLIA et al., 2002).

O mecanismo da tolerância e o nível mínimo aceito para os microrganismos probióticos permanecem desconhecidos segundo Klaenhammer e Kullen (1999). A maioria das bactérias é destruída quando passa pelo estômago humano em função da presença do suco gástrico que é um dos nossos melhores mecanismos de defesa contra microrganismos

patogênicos. A motilidade intestinal e o efeito inibitório dos sais biliares dificultam a colonização no intestino delgado (NAIDU, BIDLACK e CLEMENS, 1999).

Segundo Goldin, Gorbach e Saxelin (1992) e Neumann e Ferreira (1995), o microrganismo probiótico deve ser capaz de crescer em concentrações de 0,15 a 0,3% de sais biliares, visto que o intestino delgado e o cólon, um dos principais habitats desses microrganismos apresentam altas concentrações de ácidos biliares, os quais podem inibir ou inativar os probióticos.

O mel por conter uma série de oligossacarídeos e outros sólidos solúveis, poderia proteger a célula microbiana da ação dos sais biliares e assim contribuir para aumentar a resistência dos probióticos frente aos mesmos. Para tanto, empregou-se tanto mel pasteurizado como filtrado, tendo em vista a possibilidade de inativação de algum componente importante ou a formação de compostos tóxicos durante o aquecimento.

Em presença de sais biliares as culturas probióticas não apresentaram crescimento suficiente para atingir o valor mínimo de absorbância sugerido por Neumann e Ferreira (1995) de 0,3 de absorbância com 6 horas de incubação, tanto na presença como na ausência de mel. Com exceção dos controles sem mel ou glicose de *L. casei*-01, que com 6 horas de incubação apenas o controle atingiu densidade ótica de 0,3 na presença de sais, e só após 24 horas na presença de mel filtrado (Figura 7A) e após 12 horas na presença de mel pasteurizado (Figura 8A). Dessa forma não houve contribuição do mel filtrado e pasteurizado sobre o crescimento de *L. casei*- 01 (Tabelas 4 e 5).

Por outro lado, na ausência de sais biliares, esta cultura atingiu valores maiores que 0,3 já nas 3 primeiras horas (Figuras 7B e 8B).

A cultura de *L. acidophilus* Sacco® mostrou crescimento cuja densidade ótica foi maior que 0,3 a partir de 6 horas, enquanto a linhagem *L. acidophilus* LA-5 levou 12 horas para uma resposta de crescimento equivalente (Tabela 4).

A linhagem *L. acidophilus* Sacco®, mostrou a maior sensibilidade aos sais biliares quando comparados com os outros probióticos testados. Este microrganismo não atingiu absorbância mínima de 0,3 ao longo de 36 horas de incubação na presença de mel (filtrado/pasteurizado) ou de glicose com 0,3% de sais. Inclusive nos controles, valores de densidade ótica maiores que 0,3 só foram alcançados com 24 horas de incubação quando em presença de sais biliares (Tabelas 4 e 5; Figuras 9 e 10). Como esta inibição foi observada também com glicose, conclui-se que seja resultado do aumento da pressão osmótica.

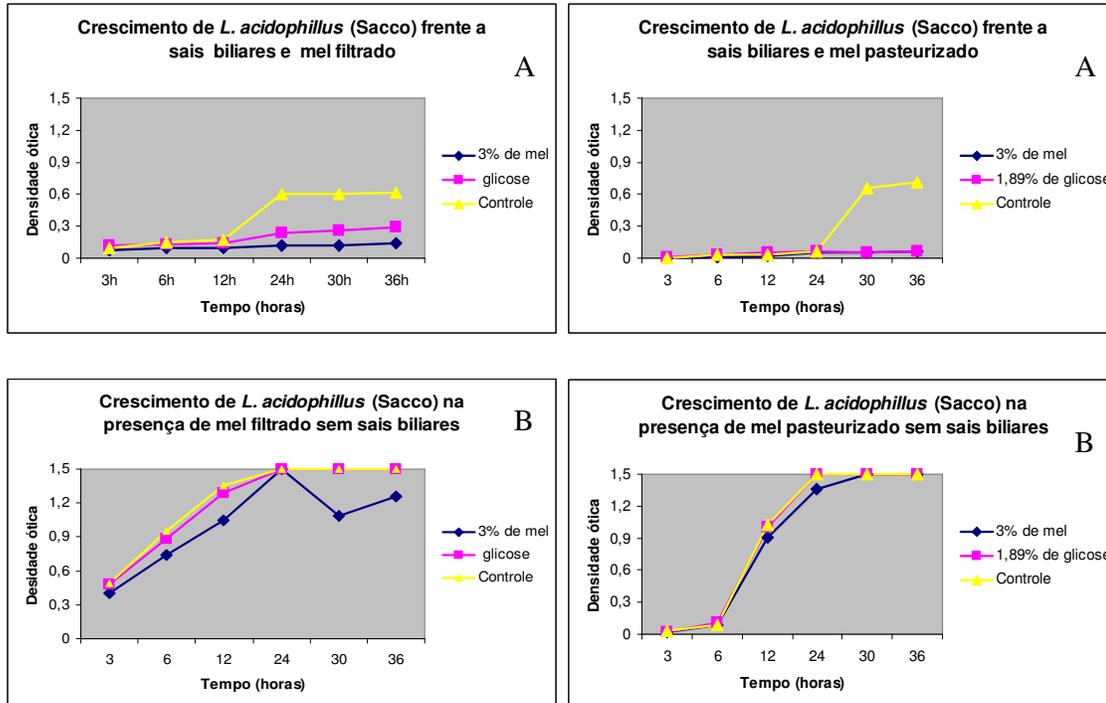


Figura 9: Crescimento de *L. acidophilus* (Sacco) frente a 0,3% de sais biliares na presença de mel filtrado e controles com e sem glicose (A); em presença de mel filtrado e controles com e sem glicose na ausência de sais (B).

Figura 10: Crescimento de *L. acidophilus* (Sacco) frente a 0,3% de sais biliares na presença de mel pasteurizado e controles com e sem glicose (A); em presença de mel pasteurizado e controles com e sem glicose na ausência de sais (B).

Gilliland, Staley e Bush (1984) avaliaram a resistência de sete linhagens de lactobacilos isolados de bezerros a 0,3% de sais biliares (Oxgall). Os autores relataram que todas as linhagens pesquisadas foram sensíveis à bile, pois não alcançaram 0,3 de absorvância depois de seis horas de incubação a 37°C.

A cultura *L. acidophilus* (Chr. Han.) mostrou-se sensível aos sais biliares, e mesmo nos controles, valores de densidade ótica maiores que 0,3 só foram verificados a partir de 12 horas de incubação. Em presença de sais biliares, a adição de mel causou inibição significativa do crescimento ($p < 0,05$), que foi maior em presença de mel filtrado, e não significativa em presença de mel pasteurizado ($p > 0,05$) (Tabelas 3 e 4 e Figuras 5 e 6). Além do alto teor de carboidratos, no mel existem outras substâncias com poder inibitório, como por exemplo, peróxido de hidrogênio, um comprovado agente antimicrobiano (WHITE e SUBERS, 1964; MOLAN, 1992).

Pereira, Luchese e Valadão (2004) avaliaram o comportamento de *L. plantarum*, *L. casei* Shirota, *L. acidophilus* e *L. fermentum* na presença de 0,3% de sais biliares (Oxgall). Os autores relataram que na ausência de sais, a densidade ótica variou de 0,9 a 0,85, quando em presença de sais biliares o crescimento foi reduzido para 0,75 a 0,53 após 6 horas de incubação, e após 12 horas de incubação variou de 1,35-1,95 na ausência de sais e de 1,0 a 1,2 na presença de sais biliares. Desta forma, concluíram que houve redução significativa do crescimento em presença de sais biliares.

Jacobsen et al. (1999), estudaram a atividade de 47 culturas de *Lactobacillus* spp. à concentração de 0,3% de sais biliares. Os autores relataram que o crescimento de 16 culturas

foi retardado de 1 para mais de 4 horas. O restante das culturas testadas não cresceu, mas todas as culturas com exceção de uma sobreviveram a 4 horas em 0,3% oxgall.

Segundo Tuomola et al. (2001) variações intraespécies da habilidade de crescimento em presença de bile são freqüentemente observadas entre culturas potencialmente probióticas e testes *in vitro* podem ser usados para a seleção das melhores culturas.

5.3.2 Crescimento e resistência de bifidobactérias

Os resultados de crescimento e resistência a sais biliares de bifidobactérias na presença de mel, tanto pasteurizado como filtrado são mostrados na Tabela 6 e Figuras 11 e 12.

Tabela 6. Valores médios* de densidade ótica referente ao crescimento de bifidobactérias na presença de mel pasteurizado ou filtrado com e sem sais biliares e resistência na presença de sais.

Microorganismos	Tempo					
	3h	6h	12h	24h	30h	36h
<i>Bifidobacterium</i> BB-12 (Chr. Han.) em 0,3% de sais						
	Densidade ótica (620nm)					
3% de mel pasteurizado	0,08a	0,22a	0,31a	0,46a	0,51a	0,56a
3% de mel filtrado	0,07a	0,18a	0,32a	0,43a	0,50a	0,62a
1,89% de glicose	0,06a	0,21a	0,31a	0,43a	0,46a	0,48a
Controle	0,04a	0,21a	0,32a	0,42a	0,46a	0,49a
<i>Bifidobacterium</i> BB-12 (Chr. Han.) na ausência de sais						
3% de mel pasteurizado	0,15a	0,34b	1,24a	1,50a	1,50a	1,50a
3% de mel filtrado	0,17a	0,36ab	1,17a	1,50a	1,50a	1,50a
1,89% de glicose	0,14a	0,32b	1,24a	1,50a	1,50a	1,50a
Controle	0,17a	0,57a	1,37a	1,50a	1,50a	1,50a
<i>Bifidobacterium lactis</i> (Sacco) em 0,3% de sais						
3% de mel pasteurizado	0,16a	0,23a	1,05a	1,42a	1,50a	1,50a
3% de mel filtrado	0,11a	0,25a	0,98a	1,35a	1,50a	1,50a
1,89% de glicose	0,14a	0,22a	0,97a	1,40a	1,50a	1,50a
Controle	0,14a	0,21a	1,01a	1,40a	1,50a	1,50a
<i>Bifidobacterium lactis</i> (Sacco) na ausência de sais						
3% de mel pasteurizado	0,20a	0,78a	1,31a	1,50a	1,50a	1,50a
3% de mel filtrado	0,22a	0,80a	1,26a	1,50a	1,50a	1,50a
1,89% de glicose	0,20a	0,75a	1,31a	1,50a	1,50a	1,50a
Controle	0,24a	0,90a	1,38a	1,50a	1,50a	1,50a

*Valores médios de 3 repetições. Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$) para cada microrganismo na presença ou ausência de sais biliares

Os cultivos de bifidobactérias em presença de sais biliares não chegaram a atingir 0,3 de absorbância com 6 horas de incubação, mas ultrapassou este valor na ausência de sais (Figuras 11B e 12B). O crescimento destas bactérias na presença de mel e sais biliares, não foram significativamente maiores ($p>0,05$) quando comparados aos respectivos controles ou com glicose. Dessa forma, o mel não exerceu efeito protetor sobre a célula bacteriana na presença de sais biliares, dados que podem ser observados na Tabela 6 e Figuras 11 e 12.

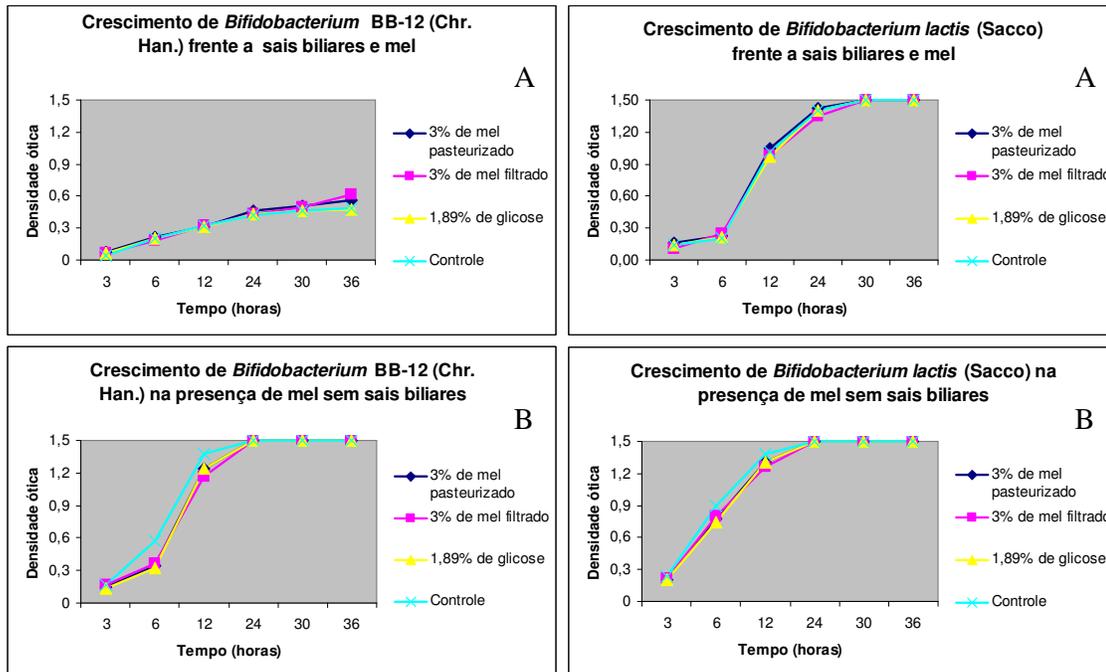


Figura 11: Crescimento de *B. BB-12*(Chr. Han.) (A) frente a 0,3% de sais biliares na presença de mel (pasteurizado e filtrado) e controles com e sem glicose; (B) em presença de mel (pasteurizado e filtrado) e controles com e sem glicose.

Figura 12: Crescimento de *B. lactis* Sacco® (A) frente a 0,3% de sais biliares na presença de mel (pasteurizado e filtrado) e controles com e sem glicose; (B) em presença de mel (pasteurizado e filtrado) e controles com e sem glicose.

Neumann e Ferreira (1995) avaliaram a resistência de três linhagens de lactobacilos (*L. acidophilus* NCFM-S, *L. acidophilus* NCFM-R₁ e *L. acidophilus* NCFM-R₂) na presença de sais biliares (Oxgall). Foi inoculado 1,0% de cada cultura separadamente, em tubos contendo 5mL de caldo MRS suplementados com 0,3% de oxgall, posteriormente os tubos foram incubados a 37°C e em intervalos de 4 e 8 horas foi feita a avaliação do crescimento celular pela medida da densidade ótica a 620 nm. Os autores relataram que as três linhagens de lactobacilos foram sensíveis à bile, pois somente depois de oito horas de incubação as linhagens alcançaram o nível de absorbância mínima de 0,3. Entretanto, eles ressaltam que apesar das culturas terem se mostrado sensíveis *in vitro* não quer dizer que serão também sensíveis *in vivo*.

Sanders et al. (1996), avaliaram culturas probióticas de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* frente a sais biliares. Os autores concluíram que todas as culturas de lactobacilos e a maior parte das culturas de bifidobactérias foram resistentes às concentrações de sais biliares (1,0 a 3,0%), e sugerem que a bile não foi considerada uma barreira crítica para o crescimento das culturas estudadas.

5.4 Atividade Antimicrobiana de Mel de *Apis mellifera* e de Abelha sem Ferrão (*Melipona quadrifasciata*).

De acordo com os resultados obtidos os microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) e *Listeria innocua*, foram resistentes ao mel de *Apis* e de *Melipona* (Mandaçaia) em concentrações de 15% e 25%, assim como nos controles com glicose.

Os microrganismos *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella Typhimurium* apresentaram sensibilidade ao mel, os resultados desta atividade antimicrobiana estão representados na Tabela 7 e Figuras 13 e 14.

O mel de *Apis* e de Mandaçaia apresentou atividade antimicrobiana sobre *E. coli* e *S. Typhimurium*. Aparentemente, o mel de mandaçaia apresenta maior potencial antimicrobiano que o de *Apis*.

O mel de *Apis* que apresenta uma maior concentração de glicose, o efeito de inibição parece ter sido decorrente apenas do efeito osmótico, já que os controles com glicose mostraram inibição equivalente ou maior.

Laurino e Gelli (1991) compararam a atividade antimicrobiana de mel de alguns meliponíneos com o mel de *Apis mellifera*. Os autores relataram que o mel de meliponíneos apresentam uma atividade nitidamente superior aos méis de *A. mellifera* encontrada na literatura.

Tabela 7: Valores médios* dos halos de inibição de diferentes concentrações de méis de *Apis* e de Mandaçaia em comparação com seus respectivos controles contendo diferentes concentrações de açúcar redutor.

Origem do Mel e Concentração (%)	Tratamentos	Microrganismos	
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Salmonella</i> <i>Typhimurium</i>
		Halo de inibição (mm)	
Mel de <i>Apis</i> 15%	Filtrado	3,83a	4,08b
	Pasteurizado	3,60a	4,86ba
	Controle (glicose 12%)**	3,85a	5,43a
Mel de Mandaçaia 15%	Filtrado	3,00a	3,93a
	Pasteurizado	1,86ba	4,80a
	Controle (glicose 9,45%***)	0,00b	3,23a
Mel de <i>Apis</i> 25%	Filtrado	4,50a	5,44b
	Pasteurizado	5,48a	6,24ba
	Controle (glicose 20%)**	5,41a	6,91a
Mel de Mandaçaia 25%	Filtrado	5,06a	5,63a
	Pasteurizado	4,69a	5,80a
	Controle (glicose 15,75%***)	4,10a	6,41a

*Valores médios de triplicatas de 2 repetições. ** Para o mel de *Apis* os cálculos dos controles contendo glicose foram realizados com base em 80% de açúcar redutor no mel; *** Para o mel de Mandaçaia os cálculos dos controles contendo glicose foram realizados com base em 63% de açúcar redutor no mel.

Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes (p<0,05).

Dos microrganismos que apresentaram sensibilidade, a cultura de *Salmonella* mostrou-se mais sensível, apresentando halos de inibição maiores que os observados com *E. coli* (Tabela 7) e (Figuras 13 e 14). Na concentração de 15%, o mel de mandaçaia foi o que apresentou maior inibição, seguido do mel filtrado e controle com glicose.

O maior halo de inibição (6,91mm) foi observado para *Salmonella Typhimurium* em 20% de glicose (controle). Esta inibição foi significativamente maior que na presença de 25% de mel filtrado de *Apis mellifera*, porém não é significativamente maior quando comparado com 25% de mel pasteurizado. (Tabela 7 e Figura 13A).

Em relação a cultura de *Escherichia coli*, o maior halo de inibição (5,48mm) foi observado na presença de 25% de mel pasteurizado de *Apis*. *E. coli* não foi inibida por até 9,45% de glicose, diferentemente da cultura de *S. Typhimurium* que foi inibida em todas as concentrações de glicose (Figura 14).

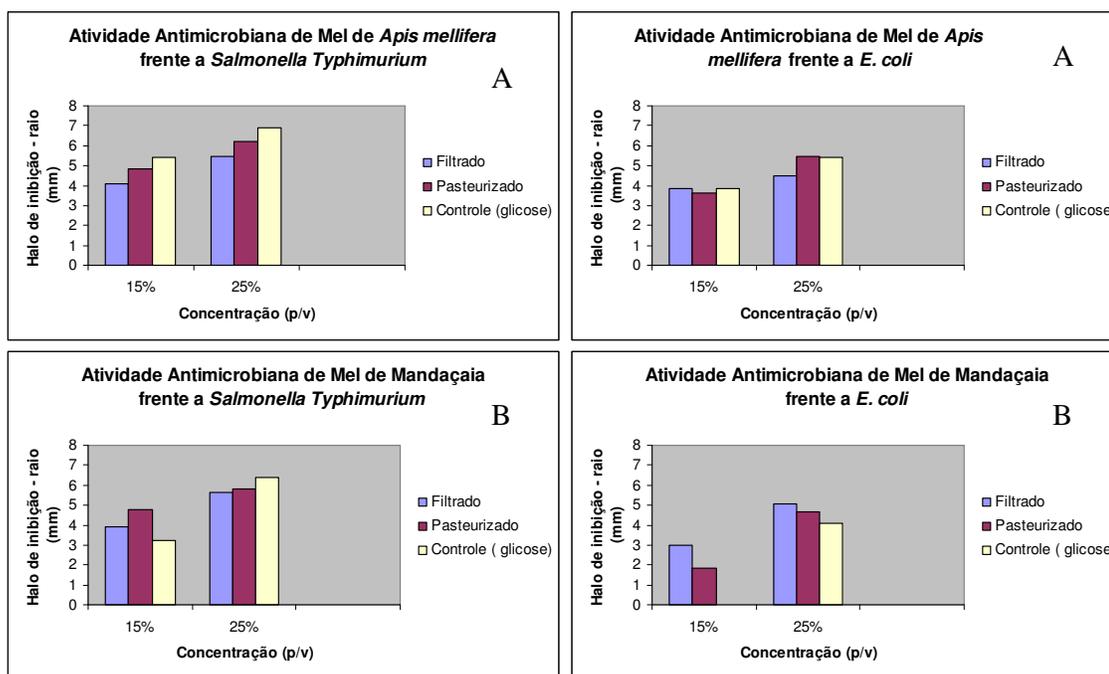


Figura 13: Atividade antimicrobiana de mel de *Apis* (A) e Mandaçaia (B) sobre *Salmonella Typhimurium*.

Figura 14: Atividade antimicrobiana de mel de *Apis* (A) e Mandaçaia (B) sobre *Escherichia coli*.

Mundo, Zakour e Worobo (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana de diferentes tipos de mel sobre sete microrganismos deterioradores de alimentos (*Alcaligenes faecalis*, *Aspergillus niger*, *Bacillus stearothermophilus*, *Geotrichum candidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Penicillium expansum* e *Pseudomonas fluorescens*) e sobre cinco patógenos de origem alimentar (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* e *Staphylococcus aureus*). A técnica utilizada foi o método de difusão em agar, onde discos foram embebidos com 0,1g de mel não diluído e posteriormente aplicados sobre meios de cultura em placas de Petri. Estes autores consideraram que as culturas que apresentaram halos com zonas de inibição maiores que 1mm de diâmetro foram sensíveis ao mel.

Os resultados dessa pesquisa corroboram com Mundo, Zakour e Worobo (2004), pois os halos de inibição encontrados foram maiores que 1mm de diâmetro.

Segundo Molan (1992), um dos principais fatores que contribuem para a atividade antimicrobiana do mel são: alta pressão osmótica, baixa atividade de água e peróxido de hidrogênio.

Não houve diferenças significativas da inibição causada pelo mel filtrado comparado com o mel pasteurizado tanto de *Appis* como de *Melipona*. Dessa forma o tratamento térmico utilizado em ambos os tipos de mel, não afetou o seu poder inibitório contra *Salmonella* e *Escherichia coli*.

Os resultados obtidos nessa pesquisa, contradizem aos relatos de White e Subers (1964), os quais constataram que mel aquecido tem sua ação antimicrobiana reduzida e uma concomitante redução de peróxido de hidrogênio bem como da atividade catalítica da invertase.

É sabido que o peróxido de hidrogênio é formado pelo sistema glicose-oxidase, esta enzima por sua vez é termolábil, portanto quando o mel é tratado termicamente os níveis de peróxido podem diminuir, e desta forma sua eficiência como inibidor é também afetada.

As propriedades antimicrobianas do mel, como as características químicas e físicas estão diretamente relacionadas com a fonte de néctar que o originou, com a espécie de abelha que o produziu, com as zonas geográficas e condições climáticas. Todos esses fatores contribuem para a grande variação encontrada em diferentes tipos de mel (SILVA, QUEIROZ e FIGUEIRÊDO, 2004; EMBRAPA, 2003).

Zumla e Lulat (1989) sugerem que o efeito osmótico e o baixo pH do mel contribuem para o rompimento da parede celular bacteriana. Neste estudo verificou-se que a cultura de *Salmonella* mostrou-se bastante sensível a pressão osmótica e possivelmente a compostos resultantes do aquecimento, já que o mel pasteurizado teve um efeito inibitório maior que o filtrado.

Estudo realizado por Martins, et al. (1997) verificaram a ação antibacteriana de mel de abelhas *Apis* e de abelhas sem ferrões. Estes autores utilizaram a técnica de difusão em agar, por meio de discos de 6mm de diâmetro embebidos com méis e posteriormente aplicados sobre placas de Petri contendo agar Muller-Hinton. Os diferentes tipos de mel foram testados sobre *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis*. Os autores relataram que as culturas de *S. aureus* e *E. coli* foram as mais sensíveis cujos halos variaram de 22 a 25mm e de 20 a 28mm de diâmetro, respectivamente. Relataram também que os dois tipos de mel apresentaram atividade antibacteriana em níveis semelhantes, este último relato vai de encontro aos resultados obtidos nessa pesquisa.

Em pesquisa realizada por Lusby, Coombes e Wilkinson (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana de mel a 0,1%, 1%, 5%, 10% e 20% (m/v) sobre *Cândida albicans*, *Alcaligenes faecalis*, *Citrobacterfreundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium phlei*, *Salmonella califórnia*, *Salmonella enteritidis*, *SalmonellaTyphimurium*, *Serratia marcescens*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. Os autores relataram que todos os tipos de mel testados tiveram ação antimicrobiana a partir de concentrações de 5% sobre todos os microrganismos testados, exceto para *C. albicans* e *S. marcescens*. Relatam ainda que a maior inibição foi verificada em soluções a 20% de mel.

Taormina, Niemira e Beuchat (2001) estudaram a atividade antimicrobiana de seis tipos de mel de abelhas sobre *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella sonnei* e *Bacillus cereus*. O objetivo do estudo foi comparar soluções de mel tratados com catalase com aqueles que não receberam este tratamento. Foram testadas soluções de mel à 0%, 2,5%, 5%, 10%, 15%, 20% e 25% v/v. Foi utilizado a técnica de difusão em agar. Os resultados revelaram que *Bacillus cereus* foi o menos afetado, e que a inibição do crescimento de *Shigella sonnei* e *Listeria monocytogenes* em soluções a 25% de mel tratado com catalase, foram significativamente reduzida, indicando

que o peróxido de hidrogênio contribui para a atividade antimicrobiana de méis. Dos microrganismos testados, *S. aureus* mostrou-se ser o mais sensível. As populações de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* foram aumentadas significativamente na presença de mel tratado com catalase quando comparadas com méis não tratados.

Gonçalves, Alves Filho e Menezes (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana de mel de abelha sem ferrão (*Nannotrigona testaceicornis*) empregando a técnica de difusão em agar sobre microrganismos obtidos de infecção clínica (*Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus* spp. *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp. coagulase-negativa, *Streptococcus* á-hemolítico e *Streptococcus pyogenes*. Resultados revelaram que, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* á-hemolítico foram resistentes ao mel de abelha sem ferrão, já as culturas de *E. coli*, *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus* spp. coagulase-negativa foram sensíveis ao mel. Esses autores concluíram que o mel de abelha sem ferrão possui forte ação antimicrobiana contra a maioria dos microrganismos testados.

6 CONCLUSÕES

- Todos os cultivos de lactobacilos e bifidobactérias em leite, independentemente de terem sido adicionados de mel, mantiveram-se com número de células viáveis superiores ou iguais aos exigidos pela legislação por 46 dias a 7°C.
- A adição de mel ao leite não influenciou significativamente ($p>0,05$) o crescimento de lactobacilos e de bifidobactérias, com exceção da linhagem *B. lactis* Sacco® no 35º dia de armazenamento à 7°C e *L. acidophilus* Sacco® no 46º dia.
- A adição de mel ao leite contribuiu para aumentar significativamente a acidificação por ambas as linhagens de bifidobactérias e pela linhagem de *L. casei* Shirota, caracterizando, portanto, efeito prebiótico.
- As linhagens de bifidobactérias mostraram uma capacidade de adaptação em pH reduzido e altos níveis de acidez maior que aquela normalmente aceita como limite para crescimento de bactérias bífidas, especialmente a linhagem *B. lactis* Sacco®.
- A adição de mel em caldo MRS não estimulou o crescimento dos probióticos (lactobacilos e bifidobactérias) como também não aumentou a resistência aos sais biliares.
- As culturas (lactobacilos e bifidobactérias) apresentaram crescimento satisfatório em presença de 0,3% de sais biliares, somente após 6 horas de incubação, exceção a linhagem *L. acidophyllus* Sacco® que esteve inibida durante todo o período de incubação, portanto não cumprindo com este pré-requisito.

- As culturas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) e *Listeria innocua* foram resistentes frente aos méis (*Apis* e Mandaçaia) enquanto as culturas de *Salmonella Typhimurium* e *E. coli* ATCC 25922 apresentaram sensibilidade, sendo que o efeito frente ao mel de *Apis* foi considerado resultante do efeito osmótico já que os controles com glicose apresentaram efeito similar.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHRNE, S.; NOBAEK, S.; JEPSSON, B.; ADLERBERTH, I.; WOLD, A.E.; MOLIN, G. The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. **Journal Applied Microbiology**, v. 85, p. 88-94, 1998.

ALIEVI, M.M.; SCHOSSLER, J.E.W.; GUIMARÃES, L. D.; OLIVEIRA, A.N.C.; TRAESLEL, C.K.; FERREIRA, P.A. Implante ósseo cortical alógeno conservado em mel na reconstrução de falha óssea diafisária em fêmur de cães: avaliação clínica e radiográfica. **Ciência Rural**, v.37, n.2, p.450-457, 2007.

ALMEIDA, M.M.; PASTORE, G.M. Açúcares funcionais galactooligossacarídeos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 32, p. 10-14, 2004.

ALMEIDA, M.M.; PASTORE, G.M. Galactooligossacarídeos Produção e Efeitos benéficos, **Boletim SBCTA**, v.35, n.1/2, p.12-19, 2001.

ALNAQDY, A; AL-JABRI, A.; MARROQUÍ, Z.A.; NZEAKO, B.; NSANZE, H. Inhibition effect of honey on the adherence of *Salmonella* to intestinal epithelial cells in vitro. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, p. 347-351, 2005.

ALONSO, W.J. **Abelhas sem ferrão: centenas de espécies para polinização, produção de mel, lazer e educação**. Sociedade Nacional de Agricultura - Artigos técnicos, n. 626, 1998. Disponível em: www.sna.agr.br/artitec_abelhas.htm. Acesso em: 15 jun. de 2007.

ALVAREZ-OLMOS, M.I; OBERHELMAN, R.A. Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 1567-1576, 2001.

ALVES, R.M.O.; CARVALHO, C.A.L.; SOUZA, B.A.; SODRÉ, G.S.; MARCHINI, L.C. Características físico-químicas de amostras de mel de *melipona mandacaiá* smith (hymenoptera: apidae). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 644-650, 2005.

AMORES, R.; CALVO, A.; MAESTRE, J.R.; HERNANDEZ, D.M. Probióticos. **Revista Espanhola de Quimioterapia**, v. 7, n. 2, p. 131-139, 2004.

ANDRIGHETTO, C.; GOMES, M.I.F.V. Produção de picolés utilizando leite acidófilo. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 2, p. 267-271, 2003.

- ANJO, D.F.C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 2, 2004.
- ANTONY, S.M.; HAN, I.Y.; RIECK, J.R.; DAWSON, P.L. Antioxidative effect of maillard reaction products added to turkey meat during heating by addition of honey. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 1719-1724, 2002.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**, 17 ed. Gaithsburg, MD, 2000.
- ARRUDA, C.M.F. Características físico-químicas e polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera, apidae) da região da chapada do Araripe, município de Santana do Cariri, Estado do Ceará. 2003, 96p. **Dissertação** (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- BANNAN, P.M.; LEVITT, M.D. Calcium, dairy products and osteoporosis: implications of lactose intolerance. **Research Veterans Affairs Medical Center**. v.3, n.4, p. 146-151, 1996.
- BARRETO, G.P.M.; SILVA, E.N.; BOTELHO, L.; YIM, D.K.; ALMEIDA, C.G.; SABA, G.L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 1, p. 119-126, 2003.
- BASTOS, D.H.M.; FRANCO, M.R.B.; DA SILVA, M.A.A.P.; JANZANTTI, N.S.; MARQUES, M.O.M. Composição de voláteis e perfil de aroma e sabor de méis de eucalipto e laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.22, p.122-129, 2002.
- BEGLEY, M.; GAHAN, C.G.M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 625-651, 2005.
- BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Research International**, v. 35, n.2-3, p. 125-131, 2002.
- BISTROM, M.; NORDSTROM, K. Identification of key success factors of functional dairy foods product development. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 372-379, 2002.
- BOYLSTON, T.D.; VINDEROLA, C.G.; GHODDUSI, H.B.; REINHEIMER, J.A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 5, p. 375-387, 2004.
- BOZANIC, R.; ROGELI, I.; TRATNIK, L.J. Fermented acidophilus goat's milk supplemented with inulin: comparison with cow's milk. **Milchwissenschaft**. v. 56, n. 11, p. 618-622, 2001.
- BRANDÃO, S.C.C. Novas gerações de produtos lácteos funcionais. **Indústria de Laticínios**, v. 6, n. 37, p. 64-66, 2002.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000. Regulamento técnico de identidade e qualidade de mel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 out. 2000, Seção I, p. 16-17.

- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Resolução n. 5, de 13 de novembro de 2000a. Padrões de identidade e qualidade de leites fermentados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jan. 2001, Seção I, p. 19-22.
- CAC- Codex Alimentarius Commission. **Revision Codex Standard for Honey**, n. 12, p. 1-7, 2001.
- CAMPOS, R. G. M. Contribuição para o estudo do mel, pólen, geléia real e própolis. **Boletim da Faculdade de Farmacia de Coimbra**, vol.11, n.2, p.17-47, 1987.
- CARABIN, I.G.; FLAMM, W.G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 30, p. 268-282, 1999.
- CATHY, J.S.C. Lactic acid bacteria. **Danone World Newsletter**, n. 5, p. 1-17, 1994.
- CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal of Dairy Technology**, v. 51, n. 4, p. 123-136, 1998.
- CHICK, H.; SHIN, H.S; USTUNOL, Z. Growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria grown in skim milk containing honey. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 3, p. 478-481, 2001.
- CORRÊA, S.B.M. Desenvolvimento de manjar branco potencialmente probiótico. 2006. 92p. **Dissertação** (Mestrado em Tecnologia Bioquímica Farmacêutica) Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2006.
- COUTO, R. H. N. As abelhas na manutenção da biodiversidade e geração de rendas. In: **XII Congresso Brasileiro de Apicultura**, Salvador – BA, 1998. p.101.
- CRANE, E. **Honey: a comprehensive survey**. London: Heinemann, 1975, 608p.
- CRANE, E. **O livro do mel**. 2. ed. São Paulo: Nobel, 1983, 226p.
- CRITTENDEN, R. G., PLAYNE, M. J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science & Technology**. v.7, n.11, p.353–361, 1996.
- CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. Gastrointestinal effects of prebiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 87, Suppl. 2, p. S145-S151, 2002.
- CUMMINGS, J.H.; MACFARLANE, G.T. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. **Journal Applied Bacteriology**, v.70, p.443-459, 1991.
- CURDA, L.; PLOCKOVA, M. Impedance measurement of growth of lactic acid bacteria in dairy cultures with honey addition. **International Dairy Journal**, v. 5, p. 127-133, 1995.
- DANONE WORLD NEWSLETTER. **Bifidobacteria**. Newsletter, n. 16, nov. 1997. Disponível em: http://www.danonevitapole.com/nutri_views/newsletter/eng/news_16/sum.html. Acessado em: jul. de 2006.

DONER, L. W. Verifying the authenticity of plant-derived material by stable isotope ratio and chromatographic methodologies. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v.74, p.14-9, 1991.

DRUMOND, P. **Abelhas indígenas sem ferrão**. Disponível em: <http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./natural/index.html&conteudo=./natural/artigos/semferrao.html>. Acesso em: 03 jun. de 2007.

EFEM, S.E.E. Clinical observations on the wound healing properties of honey. **British Journal of Surgery**, v.75, p.679-681, 1988.

EMBRAPA. Produção de mel. **Mel: Definição e origem, composição e propriedades terapêuticas**. Embrapa Meio Norte, jul. 2003. Disponível em: <http://www.cpamn.embrapa.br/pesquisa/apicultura/mel/mel.htm>. Acesso em 28 jun. de 2007.

ESTUPINAN, S.; SANJUAN, E.; MILLAN, R.; GONZALEZ, C.A.M. Parâmetros de calidad de la miel II. Composicions química. **Alimentaria**, n. 297, p. 117-122, 1998.

FEDERAÇÃO INTERNACIONAL de LATICÍNIOS –FIL 150:1991. **Yogurt: determination de l'acidity titratable**. Bruxelles, 1991.

FERREIRA, C.L.L. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Viçosa, 2003, 205p.

FERREIRA, C.L.L.F. Produtos lácteos de terceira geração: importância de produtos contendo bactérias bífidas. **Leite & Derivados**, v.29, p.22-28, 1996.

FERRERES, F.; VIGUERA, G.C.; LORENTE, T. F.; BARBERÁN, T. F. A. Hesperetin: a marker of the floral origin of citrus honey. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 61, p. 121-123, 1993.

FONDÉN, R.; MOGENSEN, G.; TANAKA, R.; SALMINEN, S. Effect of culture-containing dairy products on intestinal microflora, human nutrition and health – current knowledge and future perspectives. **Bulletin FIL-IDF (Belgium) International Dairy Federation**. n. 352, p. 5–30. 2000.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002, 424p.

GANCEL F., DZIERSZINSKI F., TAILLIEZ R. Identification and characterization of *Lactobacillus spp.* isolated from fillets of vacuum packed smoked and salted herring, **Journal of Applied Microbiology**, v. 82, n. 6, p. 722–728, 1997.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GIBSON, G.R.; WILLIS, C.L.; VAN LOO, J. Non-digestible oligosaccharides and bifidobacteria: implications for health. **International Sugar Journal**, v. 96, n. 1150, p. 381-387, 1994.

GILLILAND, S.E.; STALEY, T.E.; BUSH, L.J. Importance of bile tolerance of *L. acidophilus* used a dietary adjunct. **Journal Dairy Science**, v. 67, p. 3045-3051, 1984.

- GOLDIN, B.R.; GORBACH, L.; SAXELIN, M. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. **Dig. Dis. Sci.**, v. 37, n. 1, p. 121-128, 1992.
- GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus acidophilus*: biological, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 139-157, 1999.
- GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X.; KLAVER, F.A.M. Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* Bo and *Lactobacillus acidophilus* Ki by milk hydrolyzates. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2817-2825, 1998a.
- GOMES, A.M.P.; TEIXEIRA, M.G.; MALCATA, F.X. Viability of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in milk: sodium chloride concentration and storage temperature. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 22, p. 221-240, 1998b.
- GONÇALVES, A.L.; ALVES 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.
- GONNET, M.; LAVIE, P.; LOUVEAUX, J. La pasteurization des miels. **Annals of Abeilles**, v. 7, p. 81-102, 1964.
- GOPAL, P.K.; PRASAD, J.; GILL, H.S. Effects of the consumption of *Bifidobacterium lactis* HN019 (DR10TM) and galacto-oligosaccharides on the microflora of the gastrointestinal tract in human subjects. **Nutrition Research**, v. 23, p. 1313-1328, 2003.
- GOPAL, P.K.; SULLIVAN, P.A.; SMART, J.B. Utilisation of galacto-oligosaccharides as selective substrates for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR10 and *Lactobacillus rhamnosus* DR20. **International Dairy Journal**, 11, p.19-25, 2001.
- GUARNIER, F.; MALAGELADA, JR. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, v. 360, p. 512-519, 2003.
- GUARNER, F. Enterica flora in health and disease. **Digestion**, v. 73, (Suppl 1), p. 5-12, 2006.
- GURGEL, M. S. C. C. A., OLIVEIRA, A. J. Avaliação das características físico-químicas do iogurte. **Leite & Derivados**, São Paulo, v. 4, n. 22, p. 38-43, 1995.
- HAFFEJEE, I.; MOOSA, A.E. Honey in the treatment of infantile gastroenteritis. **British Medical Journal**, n.290, p. 1866-1867, 1985.
- HASLER, C.M. Functional foods: the western perspective. **Nutrition Reviews**, v. 54, n. 11, p. S6-S10, 1996.
- HOLZAPFEL, W.H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS INT VELD, J.H.J. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 85-101, 1998.
- HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre and probiotics. **Food Research International**, v. 35, p. 109-116, 2002.

- HOOLIHAN, L.K. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 101, n. 2, p. 229-241, 2001.
- HORN, H. Méis Brasileiros: resultados de análises físico-químicas e palinológicas. In: **XI Congresso Brasileiro de Apicultura**, Teresina, PI, 1996. p. 403-429.
- JACOBSEN, C.N., NIELSEN, V.R., HAYFORD, A.E., MOLLER, P.L., MICHAELSEN, K.F., PAERREGAARD, A., SANDSTRÖM, B., TVEDE, M., JAKOBSEN, M. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Applied and Environmental Microbiology**. v.65, n.11, p. 4949-5956, 1999.
- JAIN, P.K.; MCNAUGHT, C.E.; ANDERSON, J.M.; MITCHELL, C.J. Influence of symbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium lactis* Bb 12, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and oligofructose on gut barrier function and sepsis in critically ill patients: a randomized controlled trial. **Clinical Nutrition**. 23, p.467-475, 2004.
- KAILASAPATHY, K.; RYBKA, S. *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. – their therapeutic potential and survival in yoghurt. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 52, p. 28-35, 1997.
- KAJIWARA, S.; GANDHI, H.; USTUNOL, Z. Research Note: Effect of Honey on the Growth of and Acid Production by Human Intestinal Bifidobacterium spp.: An In Vitro Comparison with Commercial Oligosaccharides and Inulin. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 1, p. 214–218, 2002.
- KERR, W.E.; CARVALHO, G.A.; NASCIMENTO, V.A. **Abelha uruçú: biologia, manejo e conservação**. Belo Horizonte : Acangaú, 1996. 144p.
- KLAENHAMMER, T.R. and KULLEN, M.J. Selection and design of probiotics. **International Journal Food Microbiology**, v. 50, p. 45-57, 1999.
- KOLIDA, S.; TUOHY, K.; GIBSON, G.R. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. **British Journal Nutrition**, v. 87, Suppl 2, p. S193-S197, 2002.
- KOMATSU, S.S.; MARCHINI, L.C.; MORETI, A.C.C.C. Análises físico-químicas de amostras de méis de flores silvestres, de eucalipto e de laranjeira, produzidos por *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera, apidae) no estado de São Paulo. Conteúdo de açúcares e de proteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 143-146, 2002.
- KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. . **International Dairy Journal**, v. 13, p. 3-13, 2003.
- KURMANN, J.A. Starters for fermented milks: starters with selected intestinal bactéria. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 227, p. 41-55, 1998.
- LACERDA, J.D. **Guia do meliponicultor**. 1. ed. Rio de Janeiro, 2006, 44p.
- LANKAPUTHRA, W.E.V., SHAH, N.P., BRITZ, M.L. Evaluation of media for selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* species. **Food Australia**, v. 48, n. 3, p. 113-118, 1996a.

- LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.; BRITZ, M. Survival of bifidobacteria during refrigerated storage in presence of acid and hydrogen peroxide. **Milchwissenschaft**, v. 17, p. 65-70, 1996b.
- LAURINO, C. M.; GELLI, D.S. Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action des miéis d'abellies africanisées *Apis mellifera* et de Méliponinés du Brésil. **Apidologie**, v.22, p.61-73, 1991
- LEITE, J.M, C. TRUGO, L.C.; COSTA, L.S.M.; QUINTEIRO, L.M.C.; BARTH, O.M.; DUTRA, V.M.L.; MARIA, C.A.B. Determination of oligosaccharides in Brazilian honeys of different botanical origin. **Food Chemistry**, v. 70, p. 93-98, 2000.
- LENGLER, S. **Inspeção e controle de qualidade do mel**. Disponível em: http://www.sebraern.com.br/agricultura/pesquisas/inspeção_mel01.doc. Acesso em: 29 de abril de 2007.
- LOPES, M.; FERREIRA, J.B.; SANTOS, G. Abelhas sem ferrão: a biodiversidade invisível. **Agriculturas**, v. 2, n. 4, 2005.
- LUCKEY, T.D.; FLOCH, M.H. Introduction to intestinal microecology. **American Journal of Clinical Nutrition**. 25, p.1291-1295, 1972.
- LUSBY, P.E.; COOMBES, A.L.; WILKINSON, J.M. Bactericidal Activity of Different Honeys against Pathogenic Bactéria. **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 464-467, 2005.
- MADDEN, J.A.J.; PLUMMER, S.F.; TANG, J. GARAIOVA, I.; PLUMMER, N.T.; HERBISON, M.; HUNTER, J.O.; SHIMADA, T.; CHENG, L.; SHIRAKAWA, T. Effect of probiotics on preventing disruption of the intestinal microflora following antibiotic therapy: A double-blind, placebo-controlled pilot study. **International Immunopharmacology**, v. 5, p. 1091-1097, 2005.
- MAKINO, Y. Seleção de linhagens de *Kluyveromyces* produtoras de inulinase visando a obtenção de frutooligossacarídeos: Caracterização da enzima e otimização das etapas de produção e purificação. 2004. 178p. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, 2004.
- MARTINI, M.C., KUKIELKA, D., SAVAIANO, D.A. Lactose digestion from yogurt: influence of a meal and additional lactose. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 53, n.5, p.1253-1258. 1991.
- MARTINS, A.D.O.; MENDONÇA, R.C.S.; SILVA, D.L.; RAMOS, M.S.; MARTINS, M.C., DONZELE, J.L.; ANDRADE, N.J. Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagonista frente a microrganismos indicadores. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.5, n.1, p. 53-59, 2006.
- MARTINS, S.C.S.; ALBUQUERQUE, L.M.B.; MATOS, J.H.G.; SILVA, G.C.; PEREIRA, A.I.B. Atividade antibacteriana em miéis de abelhas africanizadas (*Apis mellifica*) e nativas (*Meliponas scutellaris*, *Meliponas subnitida* e *Scaptotrigona bipunctata*), do estado do Ceará. **Revista Higiene Alimentar**, v. 11, n. 52, p. 50-53, 1997.

- MERK, K.; BORELLI, C.; KORTING, H.C. Lactobacilli bacteria host interactions with special regard to the urogenital tract. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 9-18, 2005.
- MITSOUKA, T. Bifidobacteria and Their Role in Human Health. **Journal Industrial Microbiology**, v. 6, p. 263-268, 1990.
- MITSUOKA, T. Intestinal flora and aging. **Nutrition Reviews**, v. 50, p. 438-446, 1992.
- MOLAN, P.C. The antibacterial activity of honey. **Journal Bee World**, v.73, p. 5-28, 1992.
- MONTEIRO, W.R. Meliponicultura (criação de abelhas sem ferrão): A mandaçaia. Associação Paulista de Apicultores e Criadores de Abelhas Melíferas Européias. **Mensagem Doce**, n. 57, 1998. Disponível em: www.apacame.org.br/mensagemdoce/57/nativas.htm. Acesso em: 20 jun. 2007.
- MOREIRA, R.F.A.; MARIA, C.A.B. de. Glicídios no mel. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 516-525, 2001.
- MORO, G.; MINOLI, I.; MOSCA, M. FANARO, S. JELINEK, J.; STAHL, B.;BOEHM, G. Dosage-Related bifidogenic effects of galacto- andfructooligosaccharides in formula-Fed term infants. **Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition**. v.34, n.3, p.291–295, 2002.
- MUNDO, M. A.; ZAKOUR, O.I.P.; WOROBO, R.W. Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. **International Journal of Food Microbiology**. 97, p.1-8, 2004.
- NAGAI, T.; INOUE, R.; KANAMORI, N.S.; NAGASHIMA, T. Characterization of honey from different floral sources. Its functional properties and effects of honey species on storage of meat. **Food Chemistry**, v. 97, p. 256-262, 2006.
- NAIDU, A.S.; BIDLACK, W.R.; CLEMENS, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**., v. 38, n. 1, p.13-126, 1999.
- NEUMANN, E.; FERREIRA, C.L.L.F. **Revista de Microbiologia**, v. 26, p. 59-65, 1995.
- OLIVEIRA, M.N.; DAMIN, M.R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23(Supl), p. 172-176, 2003.
- OLIVEIRA, M.N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; TISSIER, J.P.; CORRIEU, G. Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. **Journal of Food Science**. v. 67, n. 6, p. 2336-2341, 2002.
- PARK, Y.K.; KOO, M.H.; CARVALHO, P.O. Recentes progressos dos alimentos funcionais. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 5, n. 31, p. 200-206, 1997.
- PASSOS, L.M.L.; PARK, Y.K. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v. 33, n.2, p.385-390, 2003.
- PEREIRA, C.A.S.; LUCHESE, R.H.; VALADÃO, R.C. **Alimentaria**, p. 53-59, abril -2004

- PEREIRA, F.M.; LOPES, M.T.R.; CAMARGO, R.C.R.; VILELA, S.L.O. Embrapa **Produção de Mel**, jul. 2003. Embrapa Meio Norte. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Mel/SPMel/mel.htm>. Acesso em: 28 jun. de 2007).
- PICARD, C. FIORAMONTI, J.; FRANÇOIS, A. Bifidobacteria as probiotic agents physiological effects and clinical benefits. **Aliment. Pharmacol. Ther**, v. 22, p. 495-512, 2005.
- PINTO, E.A.L.C.; COLLARES, E.F. Chronic lactose intake modifies the gastric emptying of monosaccharides but not of disaccharides in weanling rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. n.30, p. 723-726, 1997.
- PLAYNE, M.J.; CRITTENDEN, R. Commercially Available Oligosaccharides. **Bulletin of the IDF**, 313, 10-22., 1996.
- POUPARD, J.A.; HUSSAIN, I.; NORRIS, R. Biology of the bifidobacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 37, n. 2, p. 136-165, 1973.
- PRETTO, F.M.; SILVEIRA, T.R.; MENEGAZ, V.; OLIVEIRA, J. Má absorção de lactose em crianças e adolescentes: diagnóstico através do teste do hidrogênio expirado com o leite de vaca como substrato. **Jornal de Pediatria**, v.78, n.3, p. 213-218, 2002.
- RAO, V.A. The prebiotic properties of oligofructose at low intake levels. **Nutrition Research**, v. 21, p. 843-848, 2001.
- RASIC, J.L.; KURMAN, J.A. **Bifidobacteria and Their Role**. Basel:Birkhäuser Verlag, 1983, 295p.
- RAUPACH, B.; MECASAS, J.; HECZKO, U.; FALKOW, S.; FINLAY, B.B. Bacterial epithelial cell cross talk. **Current Topics in Microbiology and immunology**, v. 236, p. 137-161, 1999.
- ROBERFROID, M. Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comaring their physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 33, n.2, p. 103-148. 1993.
- ROBERFROID, M.; GIBSON, G.R.; DELZENNE, N. The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: an approach to calculate its caloric value. **Nutrition Reviews**. v.51, n.5, p.137-146, 1993.
- ROBERFROID, M.; SLAVIN, J. Nondigestible oligosaccharides. **Critical Reviews in Food Sceince and Nutrition**. v.40, n.6, p.461-480. 2000.
- RODRIGUES, A.E.; SILVA, E.M.S.; BESERRA, E.M.F; RODRIGUES, M.L. Análise físico-química dos méis das abelhas *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris* produzidos em duas regiões no Estado da Paraíba. **Ciência Rural**, v. 35 n. 5, p. 1166-1171, 2005.
- ROEDIGER, W. The utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. **Gastroenterology**, v. 83, p. 424-429, 1989.

- ROGERS A. M.; MONTVILLE T. J. Improved agar diffusion assay for nisin quantification. **Food Biotechnology**. v. 5, n. 2, p. 161-168, 1991.
- SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.1, 2006.
- SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDEM, R.; MATTO, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197-215, 2000.
- SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.C. ISOLAURI, E. Clinical applications of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5-6, p. 563-572, 1998.
- SAMONA, A., ROBINSON, R.K. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 44, n. 3, p. 64-66, 1991.
- SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 341-347, 1998.
- SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.
- SANDERS, M.E., WALKER, D.C., WALKER, K.M., AOYAMA, K., KLAENHAMMER, T.R. Performance of commercial culture in fluid milk applications. **Journal Dairy Science**, v.79, p. 943-955, 1996.
- SANZ, M.L.; SANZ, J.; MARTINEZ, C.I. Gás chromatographic-mass spectrometric method for the qualitative and quantitative determination of disaccharides and trisaccharides in honey. **Journal of Chromatography A**, n. 1059, p. 143-148, 2004.
- SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M.T.B. Alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, n. 2, p. 7-19, 1999.
- SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 4, p. 894-907, 2000.
- SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V.; BRITZ, M.L.; KYLE, W.S.A. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, v. 5, n. 5, p. 515-521, 1995.
- SHIN, H.S. USTUNOL, Z. Carbohydrate composition of honey from different floral sources and their influence on growth of selected intestinal bacteria: An in vitro comparison. **Food Research International**. 38, p.721-728, 2005.
- SILVA, C.L.; QUEIROZ, A.J.M.; FIGUEIRÊDO, R.M.F. Caracterização físico-química de méis produzidos no estado do Piauí para as diferentes floradas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.8, n.2/3, p. 260-265, 2004.
- SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, vol.2. Baltimore: Williams e Wilkins, p. 1209-1234, 1986.

- SOMAL, N.; COLEY, K.E.; MOLAN, P.C., HANCOCK, B.M. Suceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of manuka honey. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.87, p. 9-12, 1994
- SOUZA, B.A.; CARVALHO, C.A.L.; SODRÉ, G.S.; MARCHINI, L.C. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona asilvai* (Hymenoptera: Apidae). **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1623-1624, 2004a.
- SOUZA, R.C.S.; YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J.P.L.; OLIVEIRA, F.P.M. Valor nutricional do mel e pólen de abelhas sem ferrão da região amazônica. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 2, p. 333-336, 2004b.
- STANTON, C.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; VAN SINDEREN, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 198-203, 2005.
- STILES, M.E.; HOLZAPFEL, W.H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, p. 1-29, 1997.
- TAIPINA, M.S.; FONTES, M.A.S.; COHEN, V.H.; MASTRO, N.L.D. Novas tecnologias: alimentos funcionais e a irradiação de alimentos. **Higiene Alimentar**. v. 17, n.112, p.31-34, 2003.
- TALLET, S.; MACKKENZIE, C.; MIDDLETON, P.; KERZNER, B.; HAMILTON, R. Clinical, laboratory and epidemiologic features of viral gastroenteritis in infants and children. **Pediatrics**, v. 60, p. 217-222, 1977.
- TAMIME, A.Y.; MARSHALL, V.M.E.; ROBINSON, R.K. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. **J. Dairy Res.**, v. 62, p. 151-187, 1995.
- TAORMINA, P.J.; NIEMIRA, B.A.; BEUCHAT, L.R. Inhibitory activity of honey against foodborne pathogens as influenced by the presence of hydrogen peroxide and level of antioxidant power. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, p. 217-225, 2001.
- TOMOMATSU, H. Health effects of oligosaccharides. **Food Technology**. v. 48, n. 10, p.61-65, 1994.
- TOPHAM, J. Why do some cavity wounds treated with honey or sugar paste heal without scarring? **Journal of Wound Care**, v. 11, p. 53-55, 2002.
- TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 2. ed. Santa Maria: UFSM, 2003, 192p.
- TUOMOLA, E.; CRITTENDEN, R.; MARTIN, P.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. **Am. Journal Clinical Nutrition**, v. 73 (suppl), p.393S-8S, 2001.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. **Características gerais**. Disponível em: www.ufv.br/dbg/bee/caractergerais.htm. Acesso em: 13 de jun. de 2007.

- USTUNOL, Z. The effect of honey on the growth of bifidobacteria. **National Honey Board**. p.1-8. Disponível em: <<http://www.nhb.org.htm>>. Acesso em: 15 mar. 2005.
- USTUNOL, Z.; GANDHI, H. Growth and Viability of Commercial Bifidobacterium spp. in Honey-Sweetened Skim Milk. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 11, p. 1775-1779, 2001.
- VAN LOO, J.; COUSSEMENT, P.; LEENHEER, L.D.; HOEBREGS, H.; SMITS, G. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the western diet. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 35, n. 6, p. 525-552, 1995.
- VARGA, L. Effect of acacia (*Robinia pseudo-acacia* L.) honey on the characteristic microflora of yogurt during refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 272-275, 2006.
- VARGAS, T. Avaliação da qualidade do mel produzido na região dos Campos Gerais do Paraná. 2006. 148p. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa, 2006.
- VENTURIERI, G.C.; RAIOL, V.F.O.; PEREIRA, C.A.B. Avaliação da introdução da criação racional de *Melipona Fasciculata* (Apidae: Meliponina), entre os agricultores familiares de bragança - Pa, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 3, n. 2, p. 1-7, 2003.
- VILLALUENGA, C.M.; FRIAS, J.; GOMEZ, R.; VALVERDE, C.V. Influence of addition of raffinose family oligosaccharides on probiotic survival in fermented milk during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 768-774, 2006.
- VINDEROLA, C.G.; PROSELLO, W.; GHIBERTO, D.; REINHEIMER, J.A. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and non probiotic microflora in Argentinian fresco cheese. **Journal Dairy Science**. v. 83, n. 9, p. 1905-1911, 2000.
- VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *Lactobacillus acidophilus* and lactic starter in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 271-275, 2000.
- WERF, M. J.D.; VENEMA, K. Bifidobacteria: genetic modification and the study of their role in the colon. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 49, p. 378-383, 2001.
- WESTON, R.J. The contribution of catalase and other natural products to the antibacterial activity of honey: a review. **Food Chemistry**, v. 71, p. 235-239, 2000.
- WHITE, J.W., JR., SUBERS, M.H.; SCHEPARTZ, A.T. The identification of inhibine the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 73, p. 57-79, 1962.
- WHITE, J.W.; RUDYJ, O.N. The protein conten in honey. **Journal of Apicultural Research**, 1784, 234-38, 1978.
- WHITE, J.W.; SUBERS, M.H. Studies on honey inhibine: Effect of heat. **Journal of Apicultural Research**, v.3, n.1, p. 45-50, 1964.

WHITE, J.W.JR. Methods for determining carbohydrates, hydroxymethylfurfural and praline in honey. **Journal of the Association of the Official Analytical Chemistry**, v. 62, n. 3, p. 515-526, 1979.

WIESE, H. **Nova Apicultura**. 7. ed. Porto Alegre: Agropecuária. 1986, 493p.

ZACARCHENCO, P.B.; MASSAGUER-ROIG, S. Avaliação sensorial, microbiológica e de pós-acidificação durante a vida de prateleira de leites fermentados contendo *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum* e *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 674-679, 2004.

ZAVAGLIA, A.G.; KOCIUBINSKI, G.; PEREZ, P.; DISALVO, E.; ANTONI, G.D. Effect of bile on the lipid composition and surface properties of bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 794-799, 2002.

ZIEMER, C.J.; GIBSON, G.R. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 473-479, 1998.

ZUMLA, A.; LULAT, A. Honey: a remedy rediscovered. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 82, p. 384-385, 1989.