



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO
UNIVERSIDADE DO PORTO

Investigação preliminar das propriedades prebióticas de méis da Ilha

Terceira, Açores

Preliminary investigation of the prebiotic properties of honeys of Terceira Island,
Azores

Beatriz Ferreira da Silva

Orientado por: Prof.^a Doutora Maria de Lurdes Enes Dapkevicius

Coorientado por: Dr.^a Marta Filipa Barbosa Gomes

Trabalho de Investigação

Ciclo de estudos: 1.º Ciclo em Ciências da Nutrição

Instituição académica: Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da

Universidade do Porto

Porto, 2018

Resumo

O interesse pelos prebióticos e probióticos tem vindo a crescer, por serem eficientes no mantimento da integridade da microbiota, com efeitos positivos sobre a saúde do hospedeiro.

O mel, produzido pela *Apis mellifera*, é constituído maioritariamente por açúcares simples. No entanto, são os oligossacáridos presentes no mel que estão associados a efeitos prebióticos.

Neste estudo, o objetivo foi avaliar méis da Ilha Terceira quanto ao seu potencial prebiótico, usando como estirpes probióticas duas Bactérias do Ácido Láctico (BAL) isoladas a partir de Queijo Artesanal do Pico, face à atividade da *Listeria monocytogenes*, em caldo e numa matriz láctea. Foi também avaliado o efeito do pH estomacal (2,5) sobre a sobrevivência das BAL e da *L. monocytogenes* quando incluídas numa matriz láctea, com ou sem adição de mel.

A adição de mel a uma matriz láctea promoveu o crescimento de probióticos e favoreceu a ação inibitória contra a *L. monocytogenes*. O mesmo não se verificou sem a adição de mel, tendo a *L. monocytogenes* aumentado consideravelmente a sua proliferação. No ensaio para a simulação do meio estomacal, verificou-se um sinergismo entre o mel e as BAL em relação à sensibilização do patógeno em estudo ao baixo pH.

Este trabalho comprovou a existência de méis da Ilha Terceira com potencial prebiótico. São, contudo, necessários mais estudos para confirmar este potencial e permitir a sua aplicação prática.

Palavras-Chave

Mel; atividade prebiótica; bactéria do ácido láctico; *Listeria monocytogenes*.

Abstract

The interest in prebiotics and probiotics has been growing because they are efficient in maintaining the integrity of the microbiota, positively affecting the health of the host.

Honey, produced by *Apis mellifera* bees, consists mainly of simple sugars. However, it is the oligosaccharides present in honey which are associated with prebiotic effects.

In this study, the objective was to evaluate honeys of Terceira Island in relation to their prebiotic potential, using as probiotic strains two lactic acid bacteria (LAB) isolated from Pico's Cheese, in relation to the activity of *Listeria monocytogenes*, in broth and in a dairy matrix. The effect of stomach pH (2.5) on the survival of LAB and *L. monocytogenes* when included in a milk matrix, with or without honey, was also evaluated.

The addition of honey to a dairy matrix promoted the growth of probiotics and favored the inhibitory action against *L. monocytogenes*. The same did not occur without the addition of honey, whereas *L. monocytogenes* numbers increased considerably.

In the assay for the simulation of the stomach environment, a synergism between honey and BAL was observed, with sensitization of the pathogen under study to the low pH values.

This work demonstrated the existence of honeys of Terceira Island with prebiotic potential. However, further studies are required to confirm this potential and allow for its practical application.

Key-words

Honey; prebiotic activity; lactic acid bacteria; *Listeria monocytogenes*.

Índice

Resumo.....	i
Palavras-Chave	i
Abstract.....	ii
Key-words	ii
Introdução.....	1
Objetivos	4
Material e Métodos	4
Resultados.....	8
Discussão e Conclusões.....	14
Referências Bibliográficas.....	16

Introdução

A microbiota intestinal é um conjunto de microrganismos que constituem um ecossistema complexo(1), presente nos diferentes compartimentos do trato gastrointestinal, onde habitam em simbiose com o hospedeiro. A microbiota de cada indivíduo é única(2) e a sua constituição é influenciada pela idade, dieta e, sobretudo, pelo uso de antibióticos(1). É responsável por uma variedade de funções intestinais e desempenha um papel fundamental na nutrição, na manutenção da integridade da barreira epitelial e no desenvolvimento da imunidade da mucosa(1). Os probióticos e prebióticos são conhecidos por terem um papel na prevenção de algumas doenças, apesar de a sua eficácia ainda não ter sido comprovada(3).

Os prebióticos, definidos como substâncias oligossacáridas e polissacáridas não digeríveis, mas fermentáveis, afetam benéficamente a saúde do hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e a atividade de uma ou mais espécies de bactérias residentes no cólon, como os lactobacilos ou bifidobactérias(1, 4). E por isso, resistem à acidez gástrica, hidrólise pelas enzimas e absorção intestinal (5). Vários estudos sugerem que os prebióticos protegem contra o cancro do cólon, doenças cardiovasculares e síndromes metabólicas (6).

O mel é um produto natural e complexo produzido por abelhas, *Apis mellifera*, a partir do néctar de flores ou exsudados de árvores e plantas, devido à ação das enzimas(7). É constituído maioritariamente por hidratos de carbono, sendo os principais açúcares, monossacáridos como, a frutose e a glucose, mas também oligossacáridos(8). Além disso contém inúmeros compostos, como ácidos orgânicos, proteínas, aminoácidos, minerais, polifenóis, vitaminas e compostos aromáticos(7).

Contudo, são os oligossacáridos não digeríveis que foram associados a efeitos benéficos na digestão humana, associados a efeitos prebióticos, estimulando seletivamente o crescimento de bactérias no cólon intestinal, como as bactérias probióticas(7, 9).

Desde 1892, o mel tem sido descrito como um agente antibacteriano, pois possui efeitos bacteriostáticos e bactericidas. Isso deve-se ao baixo pH, à presença de peróxido de hidrogénio e substâncias não peroxidadas e, à baixa atividade da água (10, 11).

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro, mantendo a microbiota intestinal em homeostase e protegendo-a contra patógenos gastrointestinais (1, 12). Apesar do número adequado ainda não ser bem definido, sugerem-se níveis entre 10^6 a 10^9 unidades formadoras de colónias (ufc) por grama, de modo a que sejam eficazes a conferir benefícios ao hospedeiro, após a passagem e sobrevivência pelo trato gastrointestinal(13). Além disso, reforçam o sistema imunológico, sendo essencial na prevenção e terapia de doenças infecciosas, mas também na inflamação crónica no trato gastrointestinal. Melhoram a biodisponibilidade de nutrientes, reduzem sintomas de intolerância à lactose, diminuem a prevalência de alergias em indivíduos suscetíveis, reduzem o risco de certos cancros e ajudam no controlo dos níveis séricos de colesterol (12).

As bactérias do ácido láctico (BAL) são bactérias probióticas, encontrados em vários alimentos fermentados, conhecidas por terem uma interação próxima com o sistema imunitário intestinal(14). São bactérias Gram-positivas, não esporuladas, catalase negativas e oxidase negativas, que produzem substâncias antimicrobianas como as bacteriocinas e substâncias poliméricas, como os

exopolissacáridos (EPS), que promovem a colonização do trato-gastrointestinal por bactérias probióticas (15, 16). Produzem também biossurfactantes, com elevada atividade antimicrobiana. As suas propriedades antiadesivas reduzem a adesão dos patógenos à parede gástrica(3).

A *L. monocytogenes* é um patógeno gram-positivo, anaeróbio facultativo, com características de crescimento como temperatura de 1 a 45 ° C e alta tolerância ao sal (15). Este patógeno sobrevive ao pH baixo do estômago e resiste a altos níveis de sais biliares(17). É o principal agente etiológico da listeriose (18), capaz de causar infecção do feto em gestantes, meningite, meningoencefalite ou gastroenterite febril em indivíduos não gestantes (19, 20). É encontrado na maioria em produtos lácteos(21, 22).

O Queijo do Pico é um queijo curado produzido na Ilha do Pico, Açores, feito a partir de leite de vaca cru sendo por isso, propício à contaminação por *L. monocytogenes*(15, 21). No entanto, a produção de bacteriocinas, associados às BAL, presentes no Queijo artesanal do Pico, pode afetar o crescimento do patógeno(15).

Em sistemas alimentares simbióticos, o mel, como agente prebiótico, mostrou apoiar o crescimento de probióticos quando incubados em condições ótimas com leite, aumentando a eficácia probiótica contra patógenos (9).

No presente estudo, foi avaliado o potencial prebiótico de méis da Ilha Terceira, com duas BAL isoladas a partir do Queijo do Pico, *Leuconostoc citreum* (L3C1E7) (14) e *Lactococcus lactis* (L3A21M1) (23), em simbiose, em cultura de estirpe única, e face à *L.monocytogenes*.

Objetivos

O objetivo deste estudo foi:

- Avaliar méis produzidos na Ilha Terceira quanto ao seu potencial prebiótico, usando como estirpes probióticas duas BAL isoladas a partir de Queijo artesanal da Ilha do Pico (Açores);
- Avaliar o efeito da inclusão de mel em leite desnatado sobre o comportamento da *Listeria monocytogenes* e de duas BAL probióticas isoladas a partir de Queijo artesanal da Ilha do Pico;
- Avaliar o efeito do pH estomacal sobre a sobrevivência das BAL probióticas em estudo e da *Listeria monocytogenes* quando incluídas numa matriz láctea com ou sem a adição de mel.

Material e Métodos

Microrganismos e condições de crescimento

Utilizou-se uma estirpe de *Ln. citreum* (L3C1E7) e uma estirpe de *Lc. lactis* (L3A21M1), ambas isoladas a partir de Queijo artesanal da Ilha do Pico, utilizadas como culturas antimicrobianas. As culturas foram reativadas em caldo MRS (MERCK) a 30°C, durante 24h (14, 23).

Como cultura-alvo foi utilizada uma estirpe de *L. monocytogenes* (ATCC 7466), reativada em Caldo Nutritivo (AES Laboratoire) durante 18h a 37° C (23).

Amostras de mel

No Quadro 1, apresentam-se os dados relativos à identidade das amostras de mel estudadas.

Quadro 1 - Identificação das amostras de mel, quanto ao código, zona de produção, lote e data da cresta

Mel	Código	Zona de produção	Lote	Data de cresta
1		São Pedro		13/06/2017
2	82554	Caldeira-Lajes	8255420170628	03/07/2017
3	189226	Serreta	18922629170402	23/04/2017
4	166502	Fontinhas	16650220170402	13/04/2017
5	694337	Feteira	69433720170914	18/06/2017
6	282726	São Pedro	28272620170914	15/09/2017
7	200981	Fontinhas/Aqualva	20098120170930	13/11/2017
8	166502	Aqualva	166502201700402	13/04/2017
9	205814	Cinco Ribeiras	20581520170613	14/06/2017
10	166502	Aqualva		12/10/2017
11				
12	166502	Fontinhas	16650220171007	12/10/2017
13	282726	São Pedro	28272620170613	14/06/2017

Ensaio de atividade prebiótica

1) Efeito da adição de mel a um sistema modelo (caldo MRS e caldo nutritivo) sobre o crescimento de BAL e de *L. monocytogenes*

Nas amostras sem mel, inoculou-se 10 ml de caldo MRS (Biokar diagnostics) com cultura ativada de BAL (1%, v/v) e 10 ml de caldo nutritivo com a cultura ativada de *L. monocytogenes* (1%, v/v). Procedeu-se de igual modo para as amostras com mel, tendo apenas suplementado os caldos com 5% (v/v) de cada uma das treze amostras de mel em estudo. Todas as amostras foram incubadas à temperatura ótima para cada tipo de bactéria (30 °C para as BAL, 37 °C para a *L. monocytogenes*), durante 24 h.

Às zero e 24h foram tiradas amostras para contagem do número de microrganismos viáveis por plaqueamento nos meios de cultura adequados. As diluições necessárias foram feitas com Solutio de Ringer (Biokar Diagnostics) e plaqueadas em MRS Agar (Biokar diagnostics), para a contagem de BAL e em Agar Nutritivo (Biokar diagnostics), para a contagem de *L. monocytogenes*. As placas foram incubadas a 30 °C e a 37 °C, durante 48h em aerobiose. Findo o período de incubação, procedeu-se à contagem das colónias e ao cálculo do número de ufc/ml.

2) Efeito da adição de mel a um sistema lácteo (Skim milk) sobre o crescimento de BAL e de *L. monocytogenes*

Inicialmente foi feito um ensaio de triagem das amostras de mel quanto à sua atividade prebiótica numa matriz láctea, utilizando culturas ativadas da BAL em estudo e da *L. monocytogenes*. Prepararam-se amostras com e sem mel, para as quais se inoculou Skim Milk Powder (Oxoid) reconstituído de acordo com as instruções do fabricante, esterilizado, com 1% de cada uma das bactérias em estudo, conforme o protocolo descrito para os testes em sistema modelo. As amostras com mel foram suplementadas com 5% (v/v) de cada uma das treze amostras de mel. Todas as amostras foram incubadas à temperatura ótima para cada tipo de bactéria (30 °C para as BAL, 37 °C para a *L. monocytogenes*), durante 24 h.

Às zero e 24h foram tiradas amostras para contagem do número de microrganismos viáveis por plaqueamento nos meios de cultura adequados. As diluições necessárias foram feitas com Solutio de Ringer e plaqueadas em MRS Agar, para a contagem de BAL e em Agar Nutritivo, para a contagem de *L. monocytogenes*. As placas foram incubadas a 30 °C e a 37 °C, durante 48h em

aerobiose. Findo o período de incubação, procedeu-se à contagem das colónias e ao cálculo do número de ufc/ml.

3) Estudo da atividade prebiótica da amostra 7 de mel numa matriz láctea

Utilizando 1% de cada cultura, inoculou-se 10 ml de Skim Milk, reconstituído e esterilizado, com as culturas/combinções de culturas em estudo, como indica o quadro 2. Para as mesmas combinações repetiu-se a inoculação, com e sem mel 7 a 5% (v/v).

Quadro 2 – Culturas e combinações de culturas para inoculação em Skim Milk.

Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6	Amostra 7
L.monocytogenes	L.monocytogenes + L3C1E7 + L3A21M1	L.monocytogenes + L3C1E7	L.monocytogenes + L3A21M1	L3C1E7	L3A21M1	L3C1E7 + L3A21M1

Às zero e 24h foram tiradas amostras para contagem do número de microrganismos viáveis por plaqueamento nos meios de cultura adequados. As diluições necessárias foram feitas com Solutio de Ringer e plaqueadas em MRS Agar, para a contagem de BAL e em PALCAM (MERCK KGaA), para a contagem de *L. monocytogenes*. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 48h em aerobiose. Findo o período de incubação, procedeu-se à contagem das colónias e ao cálculo do número de ufc/ml.

4) Efeito do pH estomacal sobre a sobrevivência das BAL e da *L. monocytogenes* na presença e na ausência de mel

Para avaliar uma matriz láctea como veículo para as BAL probióticas em estudo e para a *L. monocytogenes*, nas condições de pH prevalentes no estômago, preparou-se culturas/combinções destas bactérias, como descrito para os ensaios

descritos no ponto 3. Após a incubação de 24h, a 37°C, retirou-se uma alíquota (2 ml) de Skim Milk inoculado, contendo cada BAL e/ou a *L. monocytogenes*, e adicionou-se a um tubo de ensaio contendo PBS ácido (pH 2,5). Os conteúdos dos tubos foram bem agitados no vórtex e seguidamente incubados em agitação a 37°C (Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Alemanha). A sobrevivência das bactérias foi determinada às 0, 1, 2 e 3 h, refletindo o tempo de digestão, removendo uma alíquota de 1 ml no final de cada um destes períodos de amostragem(24). Prepararam-se diluições em série, em Solutio de Ringer e procedeu-se à contagem das BAL e/ou da *L. monocytogenes* como indicado no ponto 4.

Resultados

1) Efeito da adição de mel a um sistema modelo (caldo MRS e caldo nutritivo) sobre o crescimento de BAL e de *L. monocytogenes*

De acordo com os dados da contagem em placas, a *L. monocytogenes* apresentou comportamentos diferentes consoante o tipo de mel considerado. Quando inoculado com mel 7, o patógeno cresceu de modo semelhante ao que se verificou no Caldo Nutritivo sem mel, aumentando 2,4 ciclos logarítmicos no período entre as 0h e as 24h, mas nas amostras com os restantes méis, houve uma inibição considerável do seu crescimento, sendo que, por exemplo, no mel 13 apenas teve uma variação de 0,1 de ciclo logarítmico (Figura 1, A).

Verificou-se que as BAL tiveram um comportamento diferente para cada mel. Em relação à *Ln. citreum*, as amostras com mel 5 e mel 10, tiveram um crescimento ligeiramente mais acentuado do que a amostra sem mel, de 2,3 ciclos logarítmicos no intervalo das 0h a 24h, enquanto que as amostras com os méis 4 e 11 tiveram um crescimento semelhante ao da amostra sem mel, com variações entre 2,1 e 2,2

ciclos logarítmicos. Os restantes méis provocaram uma ligeira inibição do crescimento da láctica (Figura 1, B).

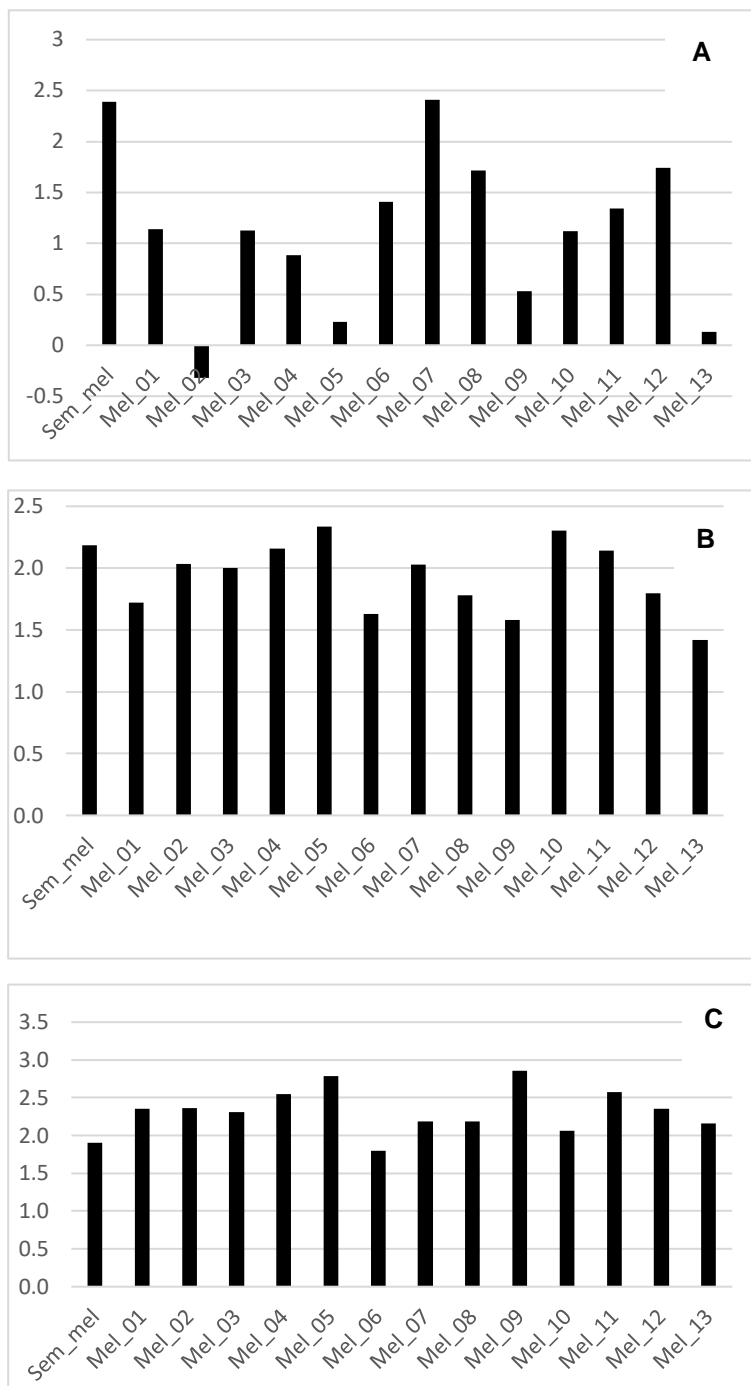


Figura 1. Crescimento (ciclos logarítmicos) de *L. monocytogenes* (A), *Ln. citreum* (B) e *Lc. lactis* (C) em caldo ao fim de 24 h à temperatura óptima de incubação.

A *Lc. lactis* apenas teve uma inibição do crescimento quando suplementada com o mel 6, pois, a sua variação logarítmica foi inferior ao da amostra sem mel. As restantes amostras tiveram um aumento logarítmico superior a 2 ciclos, entre as 0 e as 24h, sendo que as amostras com mel 5 e mel 9, permitiram que a *Lc. lactis* aumentasse cerca de 3 ciclos logarítmicos em 24h (Figura 1, C).

2) Efeito da adição de mel a um sistema lácteo (Skim milk) sobre o crescimento de BAL e de *L. monocytogenes*

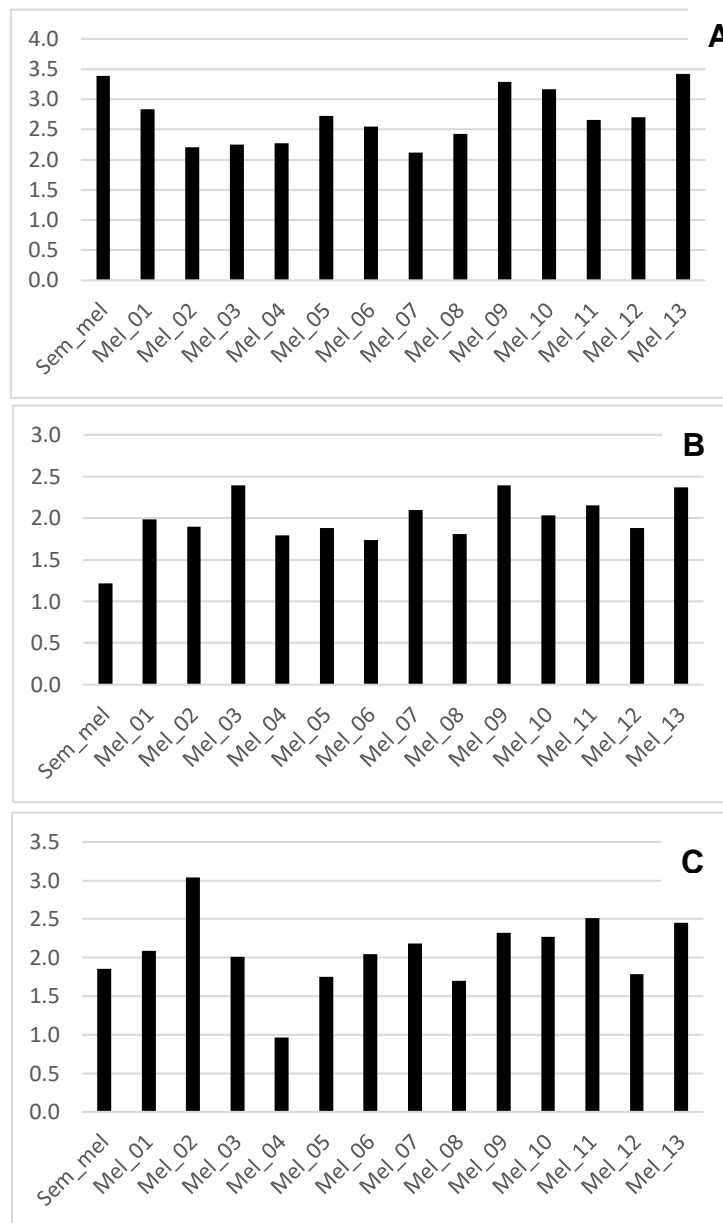


Figura 2 - Crescimento (ciclos logarítmicos) de *L. monocytogenes* (A), *Ln. citreum* (B) e *Lc. lactis* (C) em Skim Milk ao fim de 24 h a 37 ° C.

O crescimento da *L. monocytogenes* num sistema lácteo foi de 3,4 ciclos logarítmicos entre as 0 e as 24h. No entanto, quando foi aplicado mel, o crescimento foi inibido, em geral. Apenas na amostra com mel 13, a *L.monocytogenes* manteve o seu comportamento semelhante à amostra sem mel (Figura 2, A).

No caso da *Ln. citreum*, as amostras com mel tiveram um crescimento aumentado em relação à amostra sem mel. Foram as amostras com mel 3, 9 e 13 que tiveram um crescimento mais acentuado (Figura 2, B).

Os méis 4, 5, 8 e 12 inibiram o crescimento da *Lc. lactis*, visto que, a variação do número de ciclos logarítmicos na amostra sem mel foi superior à verificada nestas amostras. Foi a amostra suplementada com mel 2 que permitiu um crescimento da *Lc. lactis* superior a 3 ciclos logarítmicos (Figura 2, C).

3) Estudo da atividade prebiótica da amostra 7 de mel numa matriz láctea

Segundo a figura 3, nas amostras sem mel, a *L. monocytogenes* teve um comportamento semelhante quando combinado com as duas BAL, ou com cada uma delas em separado, num sistema lácteo. Entre as 0 e as 24h aumentou cerca de 3 ciclos logarítmicos, quando combinado com apenas uma BAL, e cerca de 2,5 logarítmicos quando combinado com as duas BAL(Figura 3).

Em relação à combinação das duas BAL, sem adição de mel, entre as 0 às 24h aumentou 0,7 ciclos logarítmicos, ou seja, a variação logarítmica foi menor do que quando as lácticas cresceram isoladas. No entanto, o número inicial e final de colónias foi superior, quando cresceram juntas.

Na presença de mel e das BAL, a *L. monocytogenes* apresentou uma variação negativa do número de ciclos logarítmicos, ou seja, o número inicial de ufc foi superior ao número final, logo, o patógeno sofreu uma inibição de crescimento.

Essa inibição foi aumentada quando as BAL cresceram em conjunto (-0,8 ciclos logarítmicos).

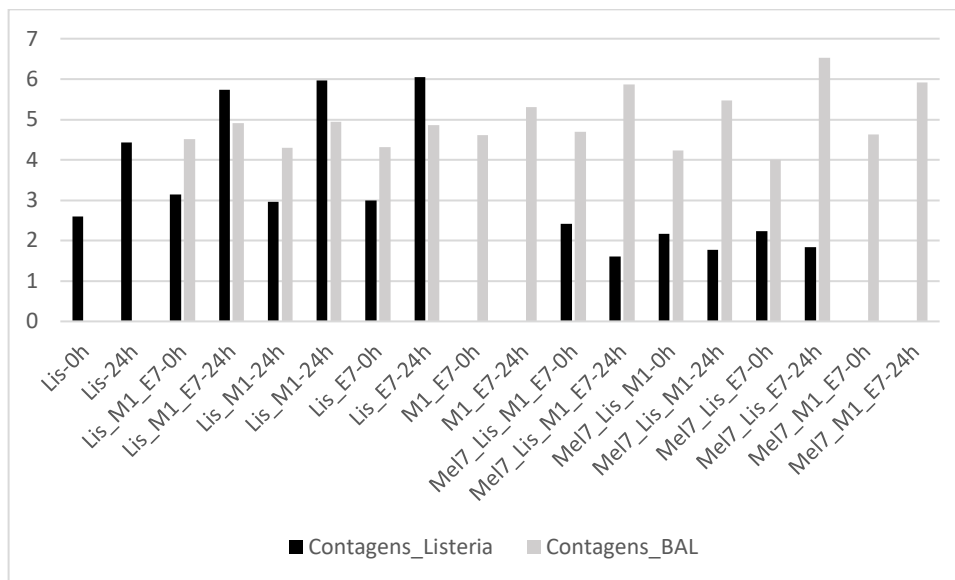


Figura 3 - Crescimento de culturas e co-culturas de BAL e *L. monocytogenes* em Skim Milk, às 0 e 24h a 37 °C.

Com a suplementação de mel 7, as duas BAL tiveram um maior crescimento em relação à amostra sem mel. Num período de 24h, houve um aumento de 1,3 ciclos logarítmicos, cerca de 0,6 ciclos acima da amostra sem mel. Em relação ao crescimento das BAL em separado, estas tiveram uma variação de ciclos superior, mas o número inicial e final de ufc foi menor.

4) Efeito do pH estomacal sobre a sobrevivência das BAL e da *L. monocytogenes* na presença e na ausência de mel

Os dados da avaliação do efeito do pH estomacal sobre a sobrevivência das BAL em estudo e da *L. monocytogenes* num sistema lácteo com e sem mel apresentam-se no Quadro 3. A *Ln. citreum* aparentou uma fase de latência de mais de 1h na presença do mel 7, mas persistiu até ao nível do ensaio. Sem mel, as populações desta bactéria deixaram de ser detetáveis ao fim de 2h. A *Lc. lactis* nunca atingiu níveis populacionais detetáveis na presença de mel e, tal como a *Ln. citreum*, deixou de ser contável a partir das 2h de ensaio nos testes sem mel.

Em co-cultura contudo, a suplementação com mel 7 não afetou negativamente a sobrevivência a pH 2,5, tendo em ambos os casos, as populações bacterianas descido abaixo do limiar de detecção ao fim de 3h.

A *L. monocytogenes* sobreviveu a pH 2,5 durante todo o tempo do ensaio (3h), quer na presença, quer na ausência de mel. Contudo, na presença de mel verificou-se um decréscimo do número de ufc/ml. Em co-cultura com as duas BAL em estudo, na ausência de mel, as contagens de *L. monocytogenes* mantiveram-se acima de 2,0 ufc/ml durante toda a duração do ensaio. No ensaio com mel, contudo, a *L. monocytogenes* deixou de ser detetável a partir da primeira hora. Nestas co-culturas, as BAL deixaram de ser detetáveis apenas às 3h, quer no ensaio com mel, quer no ensaio sem mel. Quando cada uma das BAL foi cultivada independentemente com a *L. monocytogenes*, verificou-se uma ligeira redução nos números de células da *L. monocytogenes*. Na ausência de mel, as BAL, contudo, só deixaram de ser detetáveis às 3h de ensaio. Na presença de mel, mantiveram-se detetáveis durante toda a duração do ensaio.

Quadro 3 – Sobrevivência de culturas e co-culturas de BAL e *L. monocytogenes* em pH 2,5, a 37 °C.

	0h		1h		2h		3h	
	<i>L. monocytogenes</i>	BAL	<i>L. monocytogenes</i>	BAL	<i>L. monocytogenes</i>	BAL	<i>L. monocytogenes</i>	BAL
Listeria	3,5	ND	3,4	ND	3,3	ND	3,4	ND
Mel+Listeria	2,5	ND	2,0	ND	1,5	ND	1,9	ND
Listeria+L3A21M1+L3C1E7	2,9	ND	2,5	2,1	2,4	2,7	2,4	ND
Mel+Listeria+L3A21M1+L3C1E7	1,0	1,3	ND	3,6	ND	3,6	ND	ND
Listeria+L3A21M1	3,0	ND	2,8	1,1	2,5	1,4	2,4	ND
Mel+Listeria+L3A21M1	1,0	1,0	0,9	3,3	0,8	1,8	0,8	1,0
Listeria+L3C1E7	3,0	2,6	2,6	2,5	2,3	1,4	2,5	ND
Mel+Listeria+L3C1E7	1,6	1,0	0,8	3,7	0,8	1,4	0,7	1,1
L3A21M1+L3C1E7	ND	3,5	ND	3,1	ND	ND	ND	ND
Mel+L3A21M1+L3C1E7	ND	0,5	ND	2,7	ND	0,3	ND	ND
L3A21M1	ND	2,5	ND	2,7	ND	ND	ND	ND
Mel+L3A21M1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
L3C1E7	ND	3,4	ND	3,4	ND	ND	ND	ND
Mel+L3C1E7	ND	ND	ND	ND	ND	4,2	ND	4,1

Discussão e Conclusões

O mel possui atividade antibacteriana natural devido a fatores como: baixa osmolaridade devido ao alto teor de açúcar e baixa atividade da água e alto teor de acidez e peróxido de hidrogénio, formado pela oxidação da glicose, durante o seu amadurecimento (9, 25). Em concordância com estas observações, o primeiro ensaio a *L. monocytogenes* sofreu uma inibição de crescimento, quando suplementado com mel. Esta inibição foi superior em alguns tipos de méis, provavelmente pela diferente composição do néctar, influenciada pela presença ou ausência de algumas substâncias químicas, ácidos gordos, ácidos fenólicos e flavonóides, que afetam a atividade antimicrobiana do mel(25). A atividade antibacteriana depende das fontes botânicas, do metabolismo da abelha, das condições ambientais, sazonais e climáticas(11).

O mel contém oligossacáridos potencialmente prébióticos que podem aumentar sinergicamente a eficácia probiótica e a contagem de células viáveis (9). No caso das BAL em estudo, *Lc. lactis* e *Ln. citreum*, o crescimento das mesmas, quando suplementadas com mel, em caldo MRS, não foi considerável, tendo inclusivamente alguns méis provocado a sua inibição. Contudo, no ensaio com Skim Milk, simulando um sistema lácteo, a presença de mel estimulou a proliferação das BAL. No ensaio da inoculação da *L. monocytogenes* em Skim Milk, podemos verificar que o patógeno foi inibido na presença de mel, o que comprova o descrito acima. Outros estudos demonstraram também que a adição de mel a leite promove o crescimento dos probióticos e favorece a sua ação inibitória contra patógenos(9).

Quando as estirpes foram combinadas, verificou-se uma situação de sinergismo contra o patógeno, visto que, com a adição de mel, as bactérias próbióticas tiveram um aumento na sua proliferação, verificando-se ao mesmo

tempo uma redução considerável do número de ufc da *L. monocytogenes*. Isso pode dever-se à presença de bacteriocinas, produzidas pelas BAL, que são ativas contra bactérias Gram positivas, como a *L. monocytogenes*(15), simultaneamente com a atividade antimicrobiana do mel. Num estudo anterior, foi comprovada a presença de uma bacteriocina anti-listeria, com potencial de inibição da atividade da *L. monocytogenes* (23). O contrário verificou-se no ensaio sem mel, onde o patógeno aumentou potencialmente o seu crescimento, visto que os alimentos lácteos são um veículo de proliferação da *L. monocytogenes* (24).

O ensaio de avaliação do efeito do pH 2,5 (simulando o ambiente estomacal) mostraram algum sinergismo entre as BAL e o mel no que toca à sensibilização da *L. monocytogenes* ao efeito do HCl. Também foi observado sinergismo entre BAL e mel no que toca à inibição de *L. monocytogenes* no estudo de Lucan *et al.* (26). Este é, contudo, um tema que tem sido ainda pouco estudado.

Os resultados deste trabalho demonstram a existência de méis açorianos com potencial prebiótico. No entanto trabalho teve, algumas limitações. Por motivos de falta de material e de tempo, apenas foi possível simular e avaliar *in vitro* a resistência das bactérias a pH 2,5, simulando a sua passagem pelo estômago. Teria sido desejável fazer uma simulação mais completa das condições do trato gastrointestinal. Para além disso, o número de méis testados deveria ser maior e deveriam ser utilizados triplicados ou, se possível, quadruplicados das amostras de mel.

Referências Bibliográficas

1. EMM Q. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacological Research*. 2010;61:213-8.
2. Aureli P CL, Castellazzi AM, Clerici M, Giovannini M, Morelli L, Poli A, Pregliasco F, Salvini F, Zuccotti GV. Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacological Research*. 2011;63:366-76.
3. MJ B. Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et maladies infectieuses*. 2014:1-8.
4. Roberfroid M GG, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, Wolvers D, Watzl B, Szajewska H, Stahl B, Guarner F, Respondek F, Whelan K, Coxam V, Davicco M, Leótoing L, Wittrant Y, Delzenne NM, Cani PD, Neyrinck AM, Meheust A. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*. 2010;104:S1-S63.
5. Blatchford P AJ, de Godoy MRC, Fahey G, Garcia-Mazcorro JF, Gibson GR, Goh YJ, Hotchkiss AT, Hutkins R, LaCroix C, Rastall RA, Reimer RA, Schoterman M, Van Sinderen D, Venema K, Whelan K. Prebiotic Mechanisms, Functions and Applications - A review. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*. 2013;8(4):109-32.
6. Mano MCR N-NI, Silva JB, Paulino BN, Pessoa MG, Pastore GM. Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018;102:17-37.
7. Luchese RH PE, Guerra AF. Honey as a Functional Food. In: VA T, editor. *Honey Analysis: IntechOpen*; 2017. p. 287-307.
8. Sanz ML PN, Morales V, Corzo N, Drakoularakou A, Gibson GR, Rastall RA. In Vitro Investigation into the Potential Prebiotic Activity of Honey Oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53:2914-21.
9. Alvarez-Suarez JM TS, Romandini S, Bertoli E, Battino M. Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*. 2010;3:15-23.
10. Bogdanov S JT, Sieber R, Gallmann P. Honey for Nutrition and Health: a review. *American Journal of the College of Nutrition*. 2008;27:677-89.
11. De-Melo AAM A-ML, Sancho MT, Pascual-Maté A. Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review. *Journal of Apicultural Research*. 2018;57(1):5-37.
12. Amara AA SA. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2015;23:107-14.
13. Abadía-García L CA, del Campo STM, Arvízu SM, Castaño-Tostado E, Regalado-González C, García-Almendarez B, Amaya-Llano SL. Influence of probiotic strains added to cottage cheese on generation of potentially antioxidant peptides, anti-listerial activity, and survival of probiotic microorganisms in simulated gastrointestinal conditions. *International Dairy Journal*. 2013;33:191-7.
14. Domingos-Lopes MFP NA, Stanton C, Ross PR, Gelencsér E, Silva CCG. Immunomodulatory activity of expolysaccharide producing *Leuconostoc citreum* strain isolated from Pico cheese. *Journal of Functional Foods*. 2017;33:235-43.
15. Ribeiro SC CM, Todorov SD, Franco BDGM, Dapkevicius MLE, Silva CCG. Technological properties of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from Pico cheese an artisanal cow's milk cheese. *Journal of Applied Microbiology*. 2013;116:573-85.

16. Kanmani P KR, Yuvaraj N, Paari KA, Pattukumar V, Arul V. Probiotics and Its Functionally Valuable Products - A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2013;53:641-58.
17. Barbosa J BS, Magalhães R, Ferreira V, Santos I, Silva J, Almeida G, Teixeira P. Behaviour of *Listeria monocytogenes* isolates through gastro-intestinal tract passage simulation, before and after two sub-lethal stresses. *Food Microbiology*. 2012;30:24-8.
18. Coelho MC, Silva CCG, Ribeiro SC, Dapkevicius MLNE, Rosa HJD. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 2014;191:53-9.
19. Gahan CGM CH. *Listeria monocytogenes*: survival and adaptation in the gastrointestinal tract. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2014;4.
20. Buchanan RL GL, Hayman MM, Jackson TC, Whiting RC. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*. 2017;75:1-13.
21. Melo J AP, Faleiro MI. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Research International*. 2015;67:75-90.
22. Martinez-Rios V DP. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in European cheeses: A systematic review and meta-analysis. *Food Control*. 2018;84(205-214).
23. Ribeiro SC OCP, Ross RP, Stanton C, Silva CCG. An anti-listerial *Lactococcus lactis* strain isolated from Azorean Pico cheese produces lacticin 481. *International Dairy Journal*. 2016;63:18-28.
24. Silva CCG D-LM, Magalhães VAF, Freitas DASR, Coelho MC, Rosa HJD, Dapkevicius MLNE. Short communication: Latin-style fresh cheese enhances lactic acid bacteria survival but not *Listeria monocytogenes* resistance under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Dairy Science*. 2015;98 (7):4377-83.
25. Silva MS RY, Ellen MR, Iliev I, Ivanova I, Santana WC. Microorganisms in Honey. In: Intech, editor. *Honey Analysis*: Toledo VA; 2017. p. 233-58.
26. Lucan M SV, Hardi J, Mastanjevic K, Babic J, Krstanovic V, Jukic M. Inhibitory effect of honey--sweetened goat and cow milk fermented with *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Mljekarstvo*. 2009;59 (2):96-106.