

DOI: <http://dx.doi.org/10.18378/aab.v3i1.3500>Ana Paula Vitorino da Silva<sup>1</sup>Maria Carmem Batista de Alencar<sup>3</sup>Patrício Borges Maracajá<sup>4</sup>Symara Abrantes A. de O. Cabral<sup>5</sup>Daniel Casimiro da Silveira<sup>6</sup>Egberto Santos Carmo<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Bacharelado em Farmácia, da Unidade Acadêmica de Saúde, do Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, campus Cuité/PB.

<sup>2</sup>Docente do Bacharelado em Farmácia, da Unidade Acadêmica de Saúde, do Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, campus Cuité/PB; Orientador do artigo.

<sup>3</sup>Docente da Faculdade São Francisco da Paraíba, FASP - Cajazeiras - PB Brasil e Mestranda do Curso de Pós graduação Stricto Sensu em sistemas agroindustriais do CCTA/UFCG/Pombal - PB

<sup>4</sup>D. Sc. Prof. Associado IV, . Curso de Pós graduação Stricto Sensu em sistemas agroindustriais do CCTA/UFCG/Pombal - PB

<sup>5</sup>Mestranda do Curso de Pós graduação Stricto Sensu em sistemas agroindustriais do CCTA/UFCG/Pombal - PB

<sup>6</sup>Ms. em sistemas agroindustriais do CCTA/UFCG/Pombal - PB. Técnico em Laboratório CCTA/UFCG/Pombal.

**Autor Correspondente:****\*E-mail:** [egberto\\_santos@yahoo.com.br](mailto:egberto_santos@yahoo.com.br)**Palavras-chaves:** Mel; Antimicrobiano; *Plebeia*; *Aspergillus niger***KEY WORDS:** Honey; Antimicrobial; *Plebeia*; *Aspergillus niger*

Recebido: 14/02/2015

Aceito: 22/03/2015

## Atividade antifúngica do mel de abelha *Plebeia cf. flavocincta* contra *Aspergillus niger*

### RESUMO

A abelha produz vários produtos, dentre os quais o mel é considerado o mais importante devido ao seu valor nutricional e medicinal. Nas últimas décadas, devido ao aparecimento de patógenos resistentes a antibióticos e a incidência de efeitos colaterais ocasionados por medicamentos, estudiosos têm investigado as propriedades antimicrobiana de diferentes produtos naturais, como o mel. No Brasil são poucos os estudos sobre o mel de abelha sem ferrão *Plebeia cf. flavocincta* e por isso este trabalho objetivou verificar a atividade antifúngica do mel desta abelha contra o *Aspergillus niger* oriundo de otite humana. Para tanto, através da técnica de microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades com fundo em forma de “U”, foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do mel citado. Em seguida, foi determinada a Concentração Fungicida Mínima (CFM) a partir da CIM, para as menores concentrações onde não se visualizou crescimento fúngico. Todo o sistema foi incubado a 28°C por até 5 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média geométrica dos valores de CIM e CFM obtidos. Realizadas as análises, obteve-se uma CIM igual a 50% e CFM equivalente ao mel puro. Conclui-se que o mel de abelha *Plebeia cf. flavocincta* foi ativo contra o fungo *A. niger*, porém em concentrações elevadas, fato interessante, visto que é a forma como muitas pessoas usam alguns tipos de mel popularmente para tratamento de otites, ao mesmo tempo em que fica claro que diluições deste produto não são eficazes, em especial, contra *A. niger*.

### *Antifungal activity of honey bee Plebeia cf. flavocincta against Aspergillus niger*

### ABSTRACT

The bee produces various products, among which honey is considered the most important because of its nutritional and medicinal value. In recent decades due the appearance of pathogens resistant to antibiotics and the incidence of collateral effects caused by medicines, scholars have investigated the antimicrobial properties of different natural products, such as honey. In Brazil there are few studies about the honey of the stingless bee *Plebeia cf. Flavocincta* and so this study aimed to verify the antifungal activity of the honey of this bee against *Aspergillus niger* come from human otitis. To that end, through the microdilution technique using microtitre plates containing 96 cavities with bottom of “U” was determined by Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of that honey. Then was determined the Minimum Fungicidal Concentration (MFC) to lower concentrations where was not visualized the fungal growth. The whole system was incubated at 28 ° C for up to 5 days. The assays were performed in triplicate and the result is expressed by the geometric mean of MIC and MFC values obtained. Performed the analysis, we obtained a MIC equal to 50% and MFC equivalent to the pure honey. It is concluded that the honey of *Plebeia cf. flavocincta* bee was active against the fungus *A. niger*, but in high concentrations, interesting fact, because it is the way many people use some type of honey popularly for the treatment of otitis, while it is clear that dilutions of this product are not effective, especially against *A. niger*.

## INTRODUÇÃO

A abelha produz mel, própolis, cera dentre outros produtos. Destes, o mel é considerado o mais importante e conhecido, principalmente pelo seu uso como alimento desde a antiguidade, assim como pelo seu valor nutricional e medicinal (SILVA et al., 2006). A sua ação biológica inibe várias espécies de micro-organismos, incluindo alguns fungos, bactérias e vírus, como exemplo, espécies filamentosas de fungos como *Aspergillus* e *Penicilium*, além de algumas bactérias aeróbicas e anaeróbicas, Gram-positivas e Gram-negativas (MOLAN, 1992 apud HENRIQUES, 2004).

Nas últimas décadas, o aparecimento de patógenos resistente a vários antibióticos (GONÇALVES et al., 2005) e a atual tendência mundial na busca de terapias alternativas no tratamento de doenças comuns é devido ao interesse em minimizar efeitos colaterais normalmente presentes nas terapias convencionais e da necessidade de recursos acessíveis à população. Especialmente em regiões onde existem profundas desigualdades sociais, como no continente latino-americano, e também devido tanto ao alto o custo da medicina científica, quanto dos altos valores de exames sofisticados, assim como dos altos custos das intervenções cirúrgicas complexas e dos equipamentos modernos para o diagnóstico (AVILA-PIRES, 1995; LUZ, 2005).

O mel de *Apis mellifera* tem sido objeto de pesquisas científicas em várias partes do mundo, mas, estudos sobre atividade antimicrobiana do mel de abelhas sociais da subfamília Meliponinae são escassos quando comparados a esses (GONÇALVES et al., 2005).

Neste contexto, muitos são os estudos realizados para se adquirir conhecimento sobre as atividades antimicrobianas do mel (D'ARCY, 2005). Apesar de não existirem muitos estudos científicos do uso do mel dessas abelhas sem ferrão em apiterapia, o mel delas, segundo Cortopassi-Laurino & Gelli (1984), é muito utilizado em terapias populares, principalmente, entre indígenas e pessoas de regiões rurais. Acredita-se que diferentes tipos de mel possuam propriedades curativas específicas, sendo empregados para a cura de um amplo espectro de doenças. Por tudo isso, o objetivo do meu trabalho foi verificar a atividade antifúngica do mel da abelha *Plebéia cf. flavocincta* (Apêndice A e B) contra o *Aspergillus niger* oriundo de otite humana, utilizando para isso a técnica de microdiluição em placa de microtitulação, através a qual foi determinado a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fúngica Mínima (CFM) do mel desta abelha.

Os fungos são seres, eucariontes, heterotróficos e possuem ampla distribuição na natureza. Estão presentes em vários habitats tais como: água, vegetais, animais, homem e detritos. Porém o seu maior hábitat é o solo (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Micoses são doenças infecciosas causadas por fungos e dependendo dos locais as quais afetam, as mesmas podem ser classificadas em três tipos: micose superficial, micose subcutânea e micose sistêmica ou profunda (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Dentre as micoses tem a otomicose também conhecida como otite externa fúngica (BROWN; BANUCHJ; SELESNICK, 2013).

A otite externa é uma patologia caracterizada por uma inflamação do canal auditivo externo causado por

bactéria e/ou fungo na pele macerada e no tecido celular subcutâneo geralmente de infecções secundárias. Ela é considerada a principal causa de patologia no ouvido externo (NOGUEIRA et al., 2008). Suas principais caracterizações são: inflamação, dor, prurido, descamação, podendo levar a perda de audição (SOARES, 2002).

A otomicose é causada por diversos fungos dentre os quais podemos destacar os do gênero *Aspergillus niger*, que são responsáveis por 90% destas doenças, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Candida sp.* e *Penicilium sp.*, sendo o último o mais raro em causar otomicose (MOUSSALLE; LUNA; MARQUARDT, 1999).

Existem várias espécies de fungos, mas estas três espécies são as de maior interesse clínico por serem as que mais causam doenças. A primeira espécie causa infecções nos seios nasais e pulmões, além de ser o principal agente em casos de otites externas. O segundo o *Aspergillus fumigatus* é a espécie que mais causa a aspergilose pulmonar, enquanto que o *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus* causam doenças pulmonares alérgicas (MOUSSALLE; LUNA; MARQUARDT, 1999).

O *Aspergillus niger* pode ser encontrado no ar, na superfície dos animais e vegetal, assim como na água. Esta espécie participa na decomposição de vários compostos incluindo papel, madeira e derivados naturais e é encontrado geralmente em regiões terrestres de clima tropical e subtropical (ROSA et al., 2002).

Geralmente os fungos não são patogênicos, porém dependendo da situação em que eles se encontram, podem se comportar como patogênicos oportunistas, uma vez que, os indivíduos os possuem na microbiota normal e quando debilitado por alguma doença ou por fazer uso de alguns medicamentos os valores destes agentes podem aumentar muito, resultando em patologias que podem ser fatais (KERN; BLEVINS, 1999).

O diagnóstico dos fungos no geral é baseado na anamnese, nos exames clínicos através de otoscopia, cultura e antibiograma, citologia auricular, biopsia e radiografia (BESSOLI, 2000).

A anamnese é realizada no momento da consulta médica com perguntas feita pelo médico ao paciente, principalmente nas fases iniciais da doença quando o principal sintoma é o prurido otológico (MOUSSALLE; LUNA; MARQUARDT, 1999).

Os exames clínicos são realizados com o auxílio do otoscópio para a verificação do grau de inflamação, estreitamento dos vasos sanguíneos, alterações proliferativas, restos celulares e secreção, massas e integridade do tímpano além de presença de corpo estranho. Enquanto que a citologia averiguará se estão presentes leucócitos, leveduras, cerúmen, bactérias, hifas e células neoplásicas (MEDLEAU; HNILICA, 2003).

No diagnóstico diferencial da otomicose pode ser identificada dermatite seborréia, dermatite eczematóide de contato, psoríase dentre outras. Já o diagnóstico laboratorial é feito com o material fixado em hidróxido de potássio 10 a 20% e cultura em meio ágar Sabouraud com glicose (MOUSSALLE; LUNA; MARQUARDT, 1999).

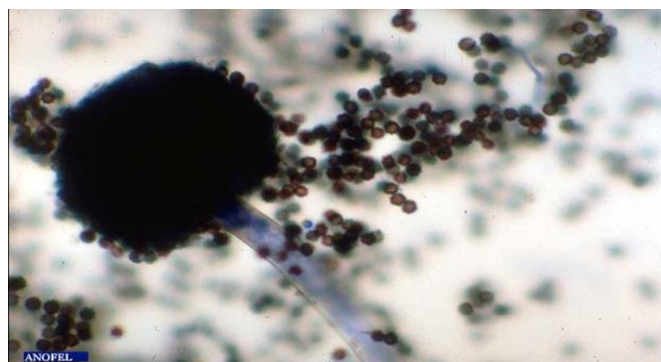
O diagnóstico laboratorial da otomicose causada pelo *Aspergillus niger* é feito através de exames microscópicos onde o material a ser examinado é retirado do ouvido infectado com auxílio de uma cureta ou do swab. Em seguida,

é feito o esfregaço direto do material coletado através da confecção de uma lâmina-laminula com KOH (10 - 40%) para observação em microscópico das estruturas fúngica (SIDRIM; ROCHA, 2010).

Na cultura, o material é semeado em meio de cultura (ágar Sabouraud, ágar Sabouraud + cloranfenicol e ágar Sabouraud + cloranfenicol e cicloeximida) e logo após é incubado à temperatura ambiente entre 25 e 30°C. Após um período de 2 a 4 dias, as colônias mostram-se prontas. Porém em raras situações em que há malformação, é necessário repicar a cepa em questão para meios especiais, como Czapek, que é um meio de referência para *Aspergillus* spp. (SIDRIM; ROCHA, 2010).

A microscopia evidencia-se vesícula globular variando entre o hialino e o castanho e seus conidióforos com paredes lisas e espessas da mesma cor da vesícula. Observa-se, ainda, cabeça aspergilar constituídas por métulas e fiálides, além de duas fileiras radiais que começam na vesícula e vai até a cabeça aspergilar. Os conídios são redondos, castanho-escuros, lisos ou equinulados e eles estão aderidos às cepas mais velhas (SIDRIM; ROCHA, 2010).

Suas colônias maturam num período de 3 a 4 dias no início, mostra textura algodoadosa, de coloração branca ou amarela, que, rapidamente, toma após a formação das cabeças aspergiliares radiadas, uma tonalidade preta, com textura arenosa de grânulos grandes (SIDRIM; ROCHA, 2010) como podemos verificar na figura 1.



**Figura 1:** Micromorfologia do *Aspergillus niger*

Fonte: UMVF – ANOFEL, 2014.

#### Tratamento de micoses

O tratamento da otite externa vai desde o controle dos fatores perturbadores até a eliminação tanto dos fatores predisponentes, quanto dos processos patológicos. Devem-se considerar todos os fatores perpetuadores, predisponentes e os fatores etiológicos para um tratamento de longa duração bem sucedido do paciente (TILLEY; SMITH JUNIOR, 2008).

O tratamento também é feito com medicamentos de uso tópicos e/ou sistêmicos. Para tratar otite externa bacteriana são utilizados os seguintes antibióticos: sulfonamidas potencializadas com trimetoprima, cefalexina, cetoconazol e os corticóides para redução de dores, enrofloxacina ou imidamicina antifúngico usado quando infecções são de maiorias causadas por fungos ou leveduras, e ainda é usada a prednisona para combater inflamações desde que seja em pequenas doses e por pouco tempo de uso. Os de utilizações tópicas são as soluções tópicas como, por exemplo, o otogen, otomax, natalene e os emulsificantes de

cera que são sulfossuccinato sódico ou peróxido de carbamida (TILLEY; SMITH JUNIOR, 2008).

As classes de medicamentos mais utilizados em infecções por *Aspergillus* são os polienos como anfotericina B e os derivados imidazólicos, como cetoconazol (BRODY, 1994).

Medicamentos recentes, tipo os triazóis, apresentam maior espectro de ação, além de possuir melhor eficácia como os voriconazol, ravuconazol e posaconazol, apresentando ação via oral e intravenosa, como no caso do voriconazol (TKACKZ; DIDOMENICO, 2001).

Segundo Pfaller et al. (2001), a ação destes medicamentos antifúngicos foi comparada com a da anfotericina B e do itraconazol contra *Aspergillus* spp. e outros fungos filamentosos, chegando a conclusão que estes 3 antifúngicos são mais ativos que a anfotericina B contra *Aspergillus* spp. e tem maior espectro de ação e potência que o itraconazol.

As principais reações adversas dos polienos são febre de até 40°C, calafrios, cefaléia, náuseas e hipotensão. A maioria dos pacientes desenvolve algum grau de nefrotoxicidade (BRODY, 1994; SIDRIM; MOREIRA, 1999).

Essas drogas podem causar danos à membrana basal glomerular, hiperplasia, fibrose e hialinização dos glomérulos com nefrocalcinose. Também podem causar rara neurotoxicidade, disritmias cardíacas, infiltrados pulmonares, exantema e anafilaxia (BRODY, 1994).

A anfotericina B causa os principais efeitos adversos: vertigens, dores difusas, anorexia, mal-estar generalizado, choque anafilático, convulsões, insuficiência hepática aguda, arritmias, erupções, surdez dentre outras (FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2004).

Pacientes tratados com imidazóis são acometidos com as várias reações adversas tais como febre, náuseas, vômitos, prurido, icterícia, dor abdominal, cefaléia, tonturas, diarreia, toxicidade hepática e morte. O indivíduo pode apresentar ainda ginecomastia transitória e hipersensibilidade dolorosa da mama; no caso de altas doses, podem levar a oligospermia, azoospermia, impotência, irregularidades menstruais, bloqueio da síntese de cortisol e supressão da resposta adrenal ao hormônio adrenocorticotrófico (BRODY, 1994; FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2004).

Além dos efeitos adversos que os fármacos antifúngicos podem causar, ainda existe outro grande problema que é o surgimento de cepas resistentes. A resistência de espécies de *Aspergillus* a alguns antifúngicos usados na clínica tem sido a causa de prognóstico clínico preocupante em pessoas acometidas por diferentes formas clínicas de aspergiloses (MOORE et al., 2000; CANUTO; RODERO, 2002; CURTIS et al., 2005).

Por vários anos os antibióticos têm sido usados indiscriminadamente para o tratamento de infecções resultando no aparecimento de cepas resistentes (DESSELBERGER, 2000; KONTOYIANNIS; LEWIS, 2002). E devido a esta crescente resistência aos antimicrobianos e consequentemente o aumento da importância clínica dadas a infecções fúngica é que grande número de pesquisas científicas sobre as propriedades antifúngicas de produtos naturais têm sido avaliadas (SOUZA et al., 2007; ATANDA; AKPAN; OLUWAFEMI, 2007).

Sabendo-se que muitos microrganismos apresentam resistência aos antifúngicos comerciais e que estes

medicamentos possuem reações adversas conhecidas na literatura, percebe-se nos produtos de origem natural, como o mel de abelha, uma solução importante a ser estudada como futura opção terapêutica.

Mel é uma substância viscosa, aromática e açucarada produzida pelas abelhas melíferas a partir do néctar das flores e/ou exsudatos sacaríficas (EMBRAPA, 2002). A composição

do mel pode variar conforme sua origem, a época de colheita, as plantas das quais o néctar é reunida, e as formas de recolha e armazenamento do mesmo (GARCIA; FERNANDEZ; MELGAR, 1996).

De acordo com a Embrapa (2002), a composição do mel no geral, ver tabela 1, é basicamente açúcares, água, outros compostos e componentes originários da fonte floral

**Tabela 1:** Composição do mel de acordo a Embrapa.

Componente	Composição básica do mel		
	Média	Desvio-padrão	Variação
Água (%)	17,2	1,46	13,4 – 22,9
Frutose (%)	38,19	2,07	27,25 – 44,26
Glicose (%)	31,28	3,03	22,03 – 40,75
Sacarose (%)	1,31	0,95	0,25 – 7,57
Maltose (%)	7,31	2,09	2,74 – 15,98
Açúcares totais (%)	1,50	1,03	0,13 – 8,49
Outros (%)	3,1	1,97	0,00 – 13,20
pH	3,91	-	3,42 – 6,10
Acidez livre (meq/Kg)	22,03	8,22	6,75 – 47,19
Lactose (meq/Kg)	7,11	3,52	00,00 – 18,76
Acidez total (meq/Kg)	29,12	10,33	8,68 – 59,49
Lactose/Acidez livre	0,335	0,135	0,00 – 0,950
Cinzas (%)	0,169	0,15	0,020 – 1,028
Nitrogênio (%)	0,041	0,026	0,00 – 0,133
Diastase	20,8	9,76	2,10 – 61,20

Fonte: EMBRAPA, 2002.

O mel é ácido com pH igual a 4 e possui constituição variável, cerca de 80% de açúcares (glicose, frutose, sacarose, levulose, maltose, sacarose), 17 a 20 % de água e 4% de outras substâncias (grãos de pólen proteínas, enzimas, peróxido de hidrogênio, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas, polifenóis (exceto para a vitamina A),

além de minerais, e mais de 100 substâncias voláteis (alcoóis, ésteres, substâncias aromáticas etc.) (MAGALON, 2003).

A utilização deste composto na nutrição humana não limitar-se apenas a sua função adoçante, mas principalmente pelo seu valor energético e inúmeras outras substâncias benéficas ao equilíbrio dos processos biológicos de nosso corpo como podem ser vista na Tabela 4 (EMBRAPA, 2002).

**Tabela 2:** Nutrientes do mel comparado a ingestão de nutrientes humana diárias

Nutrientes	Unidade	Quantidade em 100g de mel	Ingestão diária recomendada
Energia	Caloria	339	2800
Vitamina			
A	U.I.	-	5000
B1	Mg	0,004 – 0,006	1,5
Complexo B2			
Riboflavina	Mg	0,02 – 0,06	1,7
Niacina	Mg	0,11 – 0,36	20
B6	Mg	0,008 – 0,32	2
Ácido Pantotênico	Mg	0,02 – 0,11	10
Ácido Fólico	Mg	-	0,4
B12	Mg	-	6
C	Mg	2,2 – 2,4	60
D	U.I.	-	400
E	U.I.	-	30
Biotina	Mg	-	0,330

Fonte: EMBRAPA, 2002.

O mel das abelhas sem ferrão tem ganhado importância devido a sua composição, o qual tem sido associada com as suas propriedades antimicrobianas, antiinflamatórias, anticancerígenas, anticépticas e cicatrizantes (VIT; TOMÁSBARBERÁN, 1998; SILVA et al., 2006; MUÑOZ; COPAJA, 2007; SILVA et al., 2012). O mel destas abelhas tem sido utilizado popularmente em zonas

rurais e entre indígenas tanto como alimento quanto com finalidades medicinais, com finalidades terapêuticas específicas, como no tratamento de infecções (POSEY, 1987; CORTOPASSI-LAURINO; GELLI, 1991).

Os meliponíneos ou abelhas sem ferrão são da família Apidae. A subfamília Meliponinae está dividida na tribo Meliponini e Trigonini. Estas subfamílias possuem mais

de 50 gêneros e mais de 300 espécies de abelhas sem ferrão identificadas. Entre os gêneros, os *Melipona* e *Trigona* são os mais conhecidos. Estas abelhas são caracterizadas por sua sociabilidade e por ter o ferrão atrofiado, daí o nome abelhas sem ferrão (FREITAS, 2003).

As principais ações terapêuticas do mel são as suas propriedades anti-sépticas e curativas. Ações atribuídas ao peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e hiperosmolaridade do mel (MOORE et al., 2001; KWAKMAN et al., 2010). Além desses duas ações terapêuticas, o mel em estudos recentes têm demonstrado suas ações antibacteriano devido a dois dos seus constituintes que são os seguintes: metilglioxa (MGO) e as proteínas (ADAMS et al., 2008; MAVRIC et al., 2008; KWAKMAN et al., 2010).

A presença de proteínas e polifenóis no mel também lhes conferem ação antimetabólica e antioxidante. Vários estudos têm demonstrado que a aplicação de mel no local do tumor inibiu o crescimento do tumor in vivo em ratinhos e o crescimento de várias linhas de células de cancro in vitro (HAMZAOGLU et al., 2000; SWELLAM et al., 2003; FUKUDA et al., 2009).

Lesões que tem ocorrências na boca como o herpes labial recorrente, parecem ser bastante sensíveis à aplicação externa do mel (AL-WAILI, 2004), assim como também pode ser utilizado contra tosse, dificuldades respiratórias em crianças e infecções do trato respiratório superior (PAUL et al., 2007).

O mel além de suas ações terapêuticas possui outras aplicabilidades como na indústria alimentícia e na fabricação de cosméticos. Este composto e seus derivados são utilizadas na indústria de cosméticos, principalmente nos cosméticos naturais e à base de produtos naturais. Estes produtos possuem várias propriedades dentre as quais estão sua capacidade emoliente, antioxidantes, hidratantes, nutritivas, cicatrizantes, antiinflamatórias e regeneradora. O mel é rico em minerais e vitaminas, principalmente a vitamina C, que é uma substância fotoprotetora da pele e regeneradora, por isso sua indicação para peles acnéicas e/ou envelhecidas (SEBRAE, 2008).

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais utilizados na pesquisa para a coleta foram: seringas de 10mL com agulha 30 x 10 mm e isopor para o transporte. No laboratório foi utilizado pipeta de 100  $\mu$ L, água destilada, suporte para tubos de ensaio, tubo de ensaio, alça bacteriológica descartável, placa de microtitulação, bico de Bunsen, além de equipamentos como estufa, autoclave e aparelho Vortex.

O produto natural testado foi o mel da abelha *Plebeia cf. flavocincta*, o qual foi coletado no dia 14 de dezembro de 2014 às 11:30 h, na cidade de Bananeiras no Distrito de Roma do Meliponário (ver apêndice C e D), que possui as seguintes coordenadas geográficas 6°45'07,5" S e 35°33'51,4" W. Para a coleta, foi empregada uma seringa de 10 mL com agulha 30 x 10 mm, ambas estéreis. Logo após a coleta o mel foi acondicionado em um isopor para o transporte e depois foi guardado na geladeira até o dia de ser encaminhado ao laboratório para realização do experimento.

A cepa de *Aspergillus niger* (*A. niger* LM-01) foi isolada de otite humana obtida de um funcionário do Centro de Educação e Saúde.

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antifúngica foi o meio sólido ágar Sabouraud dextrose (ASD) e o meio líquido caldo Sabouraud dextrose (CSD) adquiridos da Difco®, preparados de acordo com as instruções do fabricante. Para conservação das cepas e preparação do inóculo foi utilizado o ágar batata (AB), também adquirido da Difco®. Os meios foram solubilizados com água destilada e esterilizados em autoclave, a 121°C por 15 minutos.

Para preparação do inóculo, primeiramente o fungo foi cultivado em meio AB a 28°C por 5 dias. Após esse período, a colônia fúngica foi devidamente coberta com salina estéril (NaCl 0,85% p/v), e a suspensão feita por suaves agitações e raspagens com auxílio de uma alça de platina em "L". A mistura resultante de conídios e fragmentos de hifas foi retirada e transferida para tubo de ensaio esterilizado. Em seguida, a suspensão foi agitada por 2 minutos com auxílio do aparelho Vortex. Após agitação, a turbidez da suspensão foi comparada e ajustada àquela apresentada pela solução de sulfato de bário do tubo 0,5 da escala McFarland, a qual corresponde a um inóculo de aproximadamente  $10^6$  unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL). A quantificação do inóculo foi confirmada por meio do plaqueamento de 0,01 mL das suspensões em ASD. As placas foram incubadas a 28°C e examinadas diariamente para a contagem das colônias nas placas, determinando as UFC em 1 mL (HADACEK; GREGER, 2000; SAHIN et al., 2004; BARROS et al., 2006).

A determinação da CIM do mel de abelha foi realizada pela técnica de microdiluição, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades com fundo em forma de "U" e em triplicata (SOUZA et al., 2007; MOREIRA et al., 2010). Em cada orifício da placa, foi adicionado 100  $\mu$ L do meio líquido CSD duplamente concentrado (ver apêndice E). Posteriormente, 100  $\mu$ L da solução do mel, também duplamente concentrado, foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024  $\mu$ g/mL até 4  $\mu$ g/mL, de modo que na primeira linha da placa se encontrou a maior concentração e na última, a menor concentração (linha 9). Por fim, foi adicionado 10  $\mu$ L do inóculo nas cavidades.

Um controle de microrganismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100  $\mu$ L do mesmo CSD duplamente concentrado, 100  $\mu$ L de água destilada estéril e 10  $\mu$ L do inóculo. Um controle de esterilidade também foi realizado, onde foi colocado 200  $\mu$ L do CSD em um orifício sem a suspensão dos fungos. As placas foram seladas e incubadas a 28°C por 5 dias para ser realizada a leitura. Todo o procedimento foi feito paralelamente, seguindo a mesma metodologia para o mel puro (100%) até 0,195%, também em triplicata.

Os valores de CIM foram determinados pela análise visual da inibição do crescimento em cada cavidade, comparando com o controle (ausente de drogas). Define-se a CIM para os produtos testados como a menor concentração capaz de inibir 100% o crescimento fúngico verificado nos orifícios. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média geométrica dos resultados.

### 6.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após realização da microdiluição para determinação da CIM dos produtos, alíquotas de 10  $\mu$ L do produto presente nas cavidades onde não apresentaram crescimento fúngico foram semeadas em placas de Petri com ASD, desprovidas de

qualquer antifúngico. Todo o sistema foi incubado a 28°C por até 5 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média geométrica das CFM obtidas nos ensaios. A CFM foi definida como a menor concentração dos produtos testados onde a cepa teste não mostrou capacidade de crescimento, quando inoculada no meio de cultura isento de antifúngicos (RASOOLI; ABYANEH, 2004).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 a seguir estão sumarizados os resultados obtidos nos ensaios de atividade antifúngica com o mel da abelha *Plebeia cf. flavocincta* contra *A. niger* após 5 dias de incubação.

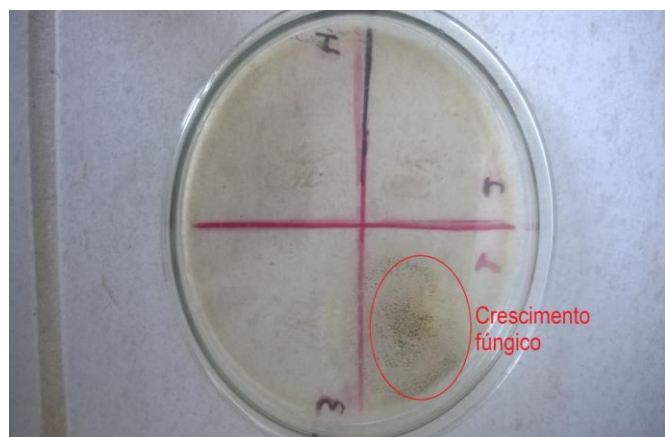
**Tabela 3:** Média geométrica da Concentração Inibitória Mínima do mel de abelha *Plebeia cf. flavocincta* contra *A. niger*

Mel (%)	A.	<i>Niger</i>
100		S
50		S
25		R
12,5		R
6,25		R
3,125		R
1,562		R
0,781		R
0,390		R
0,195		R

S - sensível e R – resistente

Após realização da microdiluição, pelo fato de não ter apresentado crescimento fúngico, tanto a 50% quanto a 100% foi feito a determinação da Concentração Fungicida Mínima.

Depois de igual tempo de incubação das amostras semeadas em ASD sem substâncias antifúngicas, observou-se crescimento do *A. niger* apenas na concentração a 50% como mostra a figura 2. O resultado final obtido foi um CIM igual a 50% e CFM a 100%.



**Figura 2.** Resultado da CFM na placa de petri.

Fonte: Pesquisador

O método de microdiluição vem sendo bastante utilizado, devido a sua alta sensibilidade, economia de reagentes e espaços utilizados, possibilitando uma maior reprodutibilidade, tornando o resultado mais confiável segundo Ostrosky (2008).

Na literatura não foi encontrado trabalhos do uso de mel de abelha *Plebeia cf. flavocincta* contra *A. niger*, mas vários outros estudos com mel de abelhas sociais diferentes foram encontrados em relação atividade antimicrobiana, a exemplo disso, em estudo desenvolvido por Gonçalves (2005) verificou-se atividade antibiótica do mel da *Nannotrigona testaceicornis* (abelhas indígenas sem ferrão) contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus sp.* Enquanto nos testes de antibiose, estes mesmos micro-organismos se mostraram resistentes aos seguintes antibióticos ampicilina, cefalotina, nitrofurantoina, cloranfenicol, sulfazotrim, ciprofloxacina, penicilina G, eritromicina.

Outro trabalho realizado anteriormente com mel da abelha *Tetragonisca angustula* verificou-se atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus sp.*, *Bacillus sp.* e leveduras. Comparado o resultado da pesquisa ao antibiograma convencional, o mel mostrou atividade antimicrobiana menor que cefalexina, porém maior que ofloxacina, penicilina e enrofloxacina e aproximada da ampicilina e ciprofloxacina (BOBANY, 2010).

Segundo Gonçalves (2005), ao se comparar a atividade antimicrobiana de diferentes méis de *A. mellifera* frente aos microrganismos sensíveis ao mel de abelhas nativas, constata-se que estes apresentam atividade nitidamente superior.

Os resultados encontrados nos testes de microdiluição para a determinação da Concentração Inibitória Mínima do mel da abelha sem ferrão *Plebeia cf. flavocincta*, neste estudo, permitiu confirmar e concluir que a amostra do mel apresentou atividade inibitória, porém em concentrações elevadas.

Os menores valores das Concentrações Inibitórias Mínimas do mel determinados para *Aspergillus niger* foi de 50%, equivalente a 600 mg/mL. Bazoni (2012) em estudos recentes, encontrou Concentração Inibitória Mínima de 715 mg/mL do mel de *N. testaceicornis* sobre *E. coli*.

Para realização do experimento foi utilizada concentração a partir de 1024 µg/mL, pois conforme Sartoratto (2004), substância com um bom potencial antimicrobiano deverá inibir as cepas em baixas concentrações. De acordo com o autor acima citado, substâncias que apresentam inibição entre 50 e 500 µg/mL possuem uma alta atividade antimicrobiana, média atividade está entre 600 e 1500 µg/mL e uma baixa atividade acima de 1500 µg/mL.

Tentando verificar um possível mecanismo de ação para o mel de *Plebeia cf. flavocincta*, observou-se em estudos desenvolvidos por Zumla e Lutat (1989), que o efeito osmótico, e o baixo pH encontrados no mel, contribuem para o rompimento da parede celular de bactérias, contribuindo de alguma forma com o efeito antimicrobiano do mel.

O resultado obtido na pesquisa apresentou deficiência na utilização em pequenas concentrações do mel para serem viáveis na inibição do fungo. Cortopassi-Laurino e Gelli (1991) e Molan (1992) defendem que diferentes amostras de mel variam no seu poder inibitório ou de morte dos micro-organismos, devido a uma série de fatores: alta concentração de açúcar e baixa porcentagem de água (com o consequente efeito osmótico), acidez (pH relativamente baixo e alta acidez livre), presença de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em certos níveis e fatores antibacterianos diversos.

Welch (2002) escreveu que a ação antimicrobiana do peróxido de hidrogênio é baseada na produção do radical

oxidante hidroxila, onde é capaz de retirar um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular e na qual é iniciada a peroxidação lipídica. Quando estes são acumulados danifica a membrana, impedindo que ela proteja a célula. Por sua vez, Anderson (1996), diz que o peróxido de hidrogênio também pode atravessar a membrana nuclear dos eucariontes, além de danificar o DNA através de reações enzimáticas.

Outra hipótese que poderia ser levantada nesta pesquisa seria se de fato, o mecanismo de ação envolve osmose, pois como foi visto no geral os méis possuem uma elevada concentração de açúcares. E de acordo com Oetterer et al. (2006) uma elevada concentração de glicose e sacarose possui uma baixa atividade de água que desfavorece o crescimento de bactérias e fungos, por causar lise celular devido ao efeito osmótico.

O resultado deste trabalho servirá ainda como base para os próximos estudos que tratem dos componentes responsáveis pela ação terapêutica do mel visto que entre os constituintes do mel apenas a inibina (peróxido de hidrogênio) é a mais estudada e ainda está presentes em diferentes méis todo um conjunto de substâncias antibióticas, cuja existência já está comprovada, mas sua ação ainda precisa ser conhecida melhor.

Mesmo assim, o resultado desta pesquisa foi positivo, pois tivemos a oportunidade de provar que o mel possui atividade terapêutica em maiores concentrações contra o *A. niger* e que poderá justificar, após testes que avaliem a segurança, a utilização deste mel nos casos de otite como é feito popularmente.

## CONCLUSÃO

Pode-se concluir com este trabalho que o mel da abelha *Plebeia cf. flavocincta* apresentou efeito biológico contra o fungo *A. niger*, fato que pode significar, após outros estudos, como estudos de segurança *in vitro* e *in vivo*, além de estudos clínicos, uma alternativa para o tratamento de otites provocadas por este fungo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, C. J. et al. Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. **Carbohydrate Research**. Hamilton: Elsevier, v. 343, p. 651–659, 2008.
- AL-WAILI, N. S. Topical honey application vs. acyclovir for the treatment of recurrent herpes simplex lesions. **Medical Science Monitor**. [S.I.: s.n.], v. 10, p. 94 – 98, 2004.
- ANDERSON, D., Antioxidant defenses against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, Amsterdam, Netherlands, v. 350, n. 1, p. 103 - 108, 1996.
- ATANDA, O. O.; AKPAN, I.; OLUWAFEMI, F. The potential of some essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. **Food Control**. v. 18, n. 5, p. 601-607, 2007.
- AVILA-PIRES, F. D. de. Teoria e prática das práticas alternativas. **Revista de Saúde Pública**. V. 29, n. 2, p. 147 – 151, 1995.
- BARROS, M. E. S; SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. *In vitro* methods for antifungal susceptibility testing of *Trichophyton* spp. **Mycological Research**. v. 110, n. 11, p. 1355-1360, 2006.
- BAZONI, M. O. **Atividade antimicrobiana dos méis produzidos por Apis mellifera e abelhas sem ferrão nativas do Brasil**. Ribeirão Preto: [s. i.], p. 116,. (Tese de Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, São Paulo, 2012.
- BESSOLI, E. D. G. **Apostila de Patologia Clínica Médica e terapêutica de pequenos animais**. [S.I.: s.n.], 2000.
- BOBANY, D. de M. et al. Atividade antimicrobiana do mel de abelhas jataí (*Tetragonisca angustula*) em cultivos de microrganismos do conduto auditivo de caninos domésticos (*Canis familiaris*). **Ci. Anim. Bras**. Goiânia: [s.i.], v. 11, n.2, p. 441 – 446, 2010.
- BRODY, T. M. et al. **Farmacologia humana: da molecular a clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 457 - 637, 1994.
- BROWN, K. D.; BANUCHJ, V.; SELESNICK, S. H. Doença da orelha externa. In: LALWANI, A. K. **Current Otorrinolaringologia Cirurgia de cabeça e pescoço**: Diagnóstico e Tratamento. Tradução por Ademar V. F.; Maria da G. F. da S. T.; Rita B. da S. P. Porto Alegre: AMGH Editora LTDA, 3 ed., c. 47, p. 643 - 648, 2013.
- CANUTO, M. M.; RODERO, F. G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 2, n. 9, p. 550 - 563, 2002.
- CORTOPASSI-LAURINO, M.; GELLI, D. S. Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et action antibactérienne des mieis d’abellies africanisé es *Apis mellifera* et de Méliponiné Du Brésil. **Apidologie**, v. 22, p. 61 - 73, 1991.
- CURTIS, L. et al. *Aspergillus* surveillance project at a large tertiary-care hospital. **Journal of Hospital Infection**. v. 59, n. 3, p. 188 - 196, 2005.
- D’ARCY, B. R. Antioxidants in Australian Floral Honeys—Identification of health-enhancing nutrient components. **Rural Industries Research and Development Corporation**. Brisbane, Australia: [s.n.], 94 p., 2005.
- DESSELBERGER, V. Emerging and re-emerging infectious disease. **Journal of Infectious Diseases**. v. 40, n. 1, p. 3 - 15, 2000.
- EMBRAPA. Produção de mel. **Sistemas de produção 3**. Piauí, Teresina: [s.n.], 138 p., 2002.
- FREITAS, B. M. Meliponíneos. Fortaleza: [s.n.], p. 9, 2003.

- FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia clínica**. Fundamentos da terapêutica racional. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 439 - 440, 2004.
- FUKUDA, M. et al. Jungle honey enhances immune function and antitumor activity. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**. [S.I.: s.n.], v. 10, p. 1 - 8, 2009.
- GARCIA, M. A.; FERNANDEZ, M. I.; MELGAR, M. J. Contamination of honey with organophosphorus pesticides. **Bull Environ Contam Toxicol**. [S.I.: s.n.], v. 54, p. 528-532, 1996.
- GONÇALVES, A. L., ALVES FILHO, A., MENEZES, H. Atividade antimicrobiana do mel da abelha nativa sem ferrão *Nannotrigona testaceicornis* (Hymenoptera: Apidae, meliponini). **Arquivo Instituto de Biologia**. São Paulo: [s.n.], v. 72, n. 4, p. 455 - 459, 2005.
- HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, v.11, p. 137-147, 2000.
- HAMZAOGLU, I. et al. Protective covering of surgical wound with honey impedes tumor implantation. **Archives of Surgery**. [S.I.: s.n.], v. 135, p. 14-17, 2000.
- HENRIQUES, A. Mel: um milagre da natureza para o tratamento de feridas? **School of applied Sciences**. University of Wales Institute; Wales-Cardiff, UK: [s.n.], 2004.
- KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia médica: texto e atlas**. 2 ed. São Paulo: Premier, 256 p., 1999.
- KONTOYIANNIS, D. P.; LEWIS, R. E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. **Lancet**, v. 359, n. 9312, p. 1135-1144, 2002.
- KWAKMAN, P. H. S. et al. How honey kills bactéria. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. Amsterdam: [s.n.], v. 24, n. 7, p. 2576-2582, 2010.
- LUZ, M. T. Cultura contemporânea e medicinas alternativas: novos paradigmas em saúde no Fim do Século XXI. **Revista de Saúde Coletiva**. V. 15, p. 145 - 176, 2005.
- MAGALON, G.; VANDWIJCK, R. Guide des Plantes: Du pansement à La chirurgie. **John Libbey Eurotext**. [S.I.: s.n.], p. 103, 2003.
- MAVRIC, E. et al. Identification and quantification of methylglyoxal as the dominant antibacterial constituent of Manuka (*Leptospermum scoparium*) honeys from New Zealand. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 52, p. 483 - 489, 2008.
- MEDLEAU, L.; HNILICA, K. A. **Dermatologia de Pequenos Animais: atlas colorido e guia terapêutico**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2003.
- MOLAN, P. C. The antibacterial activity of honey: The nature of the antibacterial activity. **Bee World**, Hamilton, New Zealand: [s.n.], v. 73, n.1, p. 5 - 28, 1992a.
- MOORE, C. B. et al. Antifungal drug resistance in *Aspergillus*. **Journal of Infection**. v. 41, n. 3, p. 203 - 220, 2000.
- MOORE, O. A. et al. Systematic review of the use of honey as a wound dressing. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, [S.I.: s.n.], p. 2, 2001.
- MOREIRA, A. C. P. et al. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptissuaveolens* (L.) poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 28 - 33, 2010.
- MOUSSALE, S. K.; LUNA, R.; MARQUARDT, R. C. Otite externa fúngica. **International archives of Otorhinolaryngology**, v. 3, n. 4, 1999.
- MUÑOZ O. et al. **Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante**. Quim.Nova, v. 30, n. 4, p. 848 - 851, 2007.
- NOGUEIRA, J. C. R. et al. Identificação e suscetibilidade antimicrobiana de microrganismos obtidos de otite externa aguda. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. São Paulo: [s.n.], v. 74, n. 4, 2008.
- OETTERER, M.; D'ARCE M. A. B. R.; SPOTO, M. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri, SP: Manole, 2006.
- OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. [S.n.: s.i.], p. 301-307, 2008.
- PAUL, I. M. et al. Effect of honey, dextromethorphan, and no treatment on nocturnal cough and sleep quality for coughing children and their parents. **Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine**. [S.I.:s.n.], v. 161, p. 1140 - 1146, December, 2007.
- POSEY, D. A. Etnoentomologia de tribos indígenas da Amazônia. In: RIBEIRO, D. **Suma etnológica brasileira**. 2.ed. Petrópolis: FINEP/Vozes, p. 251 - 271, 1987.
- PFALLER, M. A. et al. Antifungal activity of posaconazole, ravuconazole e voriconazole compared to that of itraconazole tested against 213 clinical isolates of *Aspergillus spp.* and other filamentous fungi: report from the Sentry Antimicrobial Surveillance Program, 2000. In: **Abstract of the 41st Interscience**



- Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** Abstract J-813, p. 379, 2001.
- RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Inhibitory effects of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, v. 15, n. 6, p. 479 - 483, 2004.
- ROSA, C. A. R.; CAMPOS, S. G.; BARONI, F. A. **Micologia veterinária: prática 8**. [2002]. 12 f. Notas de aula. Impresso.
- SAHIN, F. et al. Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Origanum vulgares* sp vulgare in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v. 15, n. 7, p. 549 - 557, 2004.
- SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.
- SEBRAE. Cosméticos à base de produtos naturais. **Estudo de Mercado SEBRAE/ESPM**. [S.I.: s.n.], p. 100, 2008.
- SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clinico-laboratoriais da micologia medica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 171 - 190, 1999.
- SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. [Reimpr.] Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- SILVA, R. A. da et al. Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 17, n. 1, p. 113 - 120, 2006.
- SILVA, T. M. S. et al. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaira ( *Meliponassubnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**. [S.I.]: Elsevier, v. 14, p. 678-684, 2012.
- SOARES, M. A. **Medicamentos Não Prescritos. Aconselhamento Farmacêutico**. 2 ed. Lisboa: Associação Nacional de Farmácias, v. II, 2002.
- SOUZA, E. L. et al. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 409 - 413, 2007.
- SWELLAM, T. et al. Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: In vivo and in vitro studies. **International Journal of Urology**, v. 10, p. 213 - 219, 2003.
- TILLEY, L. P.; SMITH, F. W. K. **Consulta veterinária em 5 minutos**. 2 ed. Barueri: Manole, 2008.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.
- TKACKZ, J. S.; DIDOMENICO, B. Antifungals: what's in pipeline. **Current Opinion in Microbiology**, n. 4, p. 540 - 545, 2001.
- UMVF - ANOFEL. **Aspergilloses et autres champignons filamenteux opportunistes**. 2014.
- VIT, P.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. Flavonoids in meliponinae honeys from Venezuela related to their botanical, geographical and entomological origin to assess their putative anticataract activity. **Zeitschrift für Lebensmittel- Untersuchung und - Forschung**, v. 206, p. 288 - 293, 1998.
- WELCH, K. D. et al. Deleterious ironmediated oxidation of biomolecules. **Free Radical Biology and Medicine**, Logan, USA, v. 32, p. 577 - 583, 2002.
- ZUMLA, A.; LULAT, A. Honey- a remedy rediscovered. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 82, p. 384 - 385, 1989.