

**ATIVIDADE BIOLÓGICA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE
MÉIS PRODUZIDOS EM ALGUNS MUNICÍPIOS DA
AMAZÔNIA, CERRADO E PANTANAL DE MATO
GROSSO**

GABRIELA MARIA FRANZ

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais para obtenção do título de Mestre.

**CÁCERES
MATO GROSSO, BRASIL
2015**

GABRIELA MARIA FRANZ

**ATIVIDADE BIOLÓGICA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE MÉIS
PRODUZIDOS EM ALGUNS MUNICÍPIOS DA AMAZÔNIA,
CERRADO E PANTANAL DE MATO GROSSO**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Mato Grosso, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof^a Dr^a Carla Galbiati

**CÁCERES
MATO GROSSO, BRASIL
2015**

GABRIELA MARIA FRANZ

**ATIVIDADE BIOLÓGICA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE MÉIS
PRODUZIDOS EM ALGUNS MUNICÍPIOS DA AMAZÔNIA,
CERRADO E PANTANAL DE MATO GROSSO**

Essa dissertação foi julgada e aprovada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Cáceres, 12 de março de 2015.

Banca Examinadora

Profª Drª Carla Galbiati

Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT
(Orientadora)

Prof Dr Domingos Tabajara de Oliveira Martins
Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT

Profª Drª Eliane Ignotti

Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT

**CÁCERES
MATO GROSSO, BRASIL
2015**

Aos meus pais, dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais da Universidade do Estado de Mato Grosso.

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

A Prof^a Dr^a Carla Galbiati pela orientação, paciência e tempo dedicado. Por ter confiado e acreditado em mim e possibilitado tamanha experiência.

Aos professores Dr Domingos Tabajara de Oliveira Martins, da Universidade Federal de Mato Grosso e Dr^a Ligia Bicudo de Almeida Muradian, da Universidade de São Paulo, pela parceria e apoio que permitiram o enriquecimento deste trabalho.

Ao laboratório LABGeo pelos mapas.

Aos apicultores, pela confiança.

Aos amigos e companheiros do laboratório Centro de Estudos em Apicultura (CET^{Apis}) Elaine, Cláudia, Jennifer, Loana, Kelli, Vanda, Kleber, Joziane e Kamila, por me ensinar e ajudar nas análises.

Aos amigos e companheiros de laboratório da USP e da UFMT, pelo acolhimento, ensinamento, e pelas horas de lazer, especialmente Elias, Adriane, Bianca, Fernanda, Shina, Natasha, Eduarda, Larissa, Fabi, Guilherme, Adna, Flávia, Taissa, Lucas, Cláudio, Cristina, Reginaldo, Balogun, Bulus, Joaquim, Angela, Ruberlei, Suelen, Dani, Thais, Mari, Manoel, Geovane, Gessica, Felipe, Taila, Leticia e Yasmin.

Aos meus colegas de classe, pelas caronas e pelo companheirismo nestes dois anos.

A minha amiga e colega Thaís, por tornar a estadia nesta cidade mais fácil, por me esperar chegar de viagem e por me acompanhar nas pizzas e nas caminhadas. Thaís, você sabe, não sei o que faria nesta cidade sem você.

Aos meus amigos mutuenses e paranaenses, que ficam felizes com a minha chegada e recarregam minhas energias a cada recesso.

Aos meus tios Paulo e Maiza, e aos meus primos Aline, Jean e Allan, por me acolherem em Cuiabá e fazerem me sentir em casa.

Ao meu pai Luiz e a minha mãe Cleusa, por ser meu herói e minha estrutura, me incentivar e não me deixar desistir.

Aos meus irmãos Tiago, Ismael, Josué e em especial à minha irmã Emanuela, por me ajudar nas traduções.

Ao meu namorado Diego, pela compreensão e amor.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram com esta pesquisa e com meu sucesso.

A Deus, por cuidar de mim todos os dias.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO GERAL	16
REFERÊNCIAS.....	20
ATIVIDADE BIOLÓGICA E CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE MÉIS DA AMAZÔNIA, CERRADO E PANTANAL DE MATO GROSSO.....	25
1 INTRODUÇÃO	27
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4 CONCLUSÃO.....	46
5 REFERÊNCIAS.....	46
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO MEL DA AMAZÔNIA, CERRADO E PANTANAL NO CENTRO-OESTE DO BRASIL	54
1 Introdução	56
2 Material e métodos.....	57
3 Resultados e discussão.....	64
4 Conclusão	72
5 Referências	72
CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
APÊNDICES.....	80
ANEXOS	82

LISTA DE TABELAS

ATIVIDADE BIOLÓGICA E CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE MÉIS DO PANTANAL E DA AMAZÔNIA DE MATO GROSSO

Tabela 1. Bioma predominante no município devido à área de ocupação territorial dos biomas Amazônia, Cerrado e Pantanal nos seis municípios selecionados no estudo.....	30
Tabela 2. Características físico-químicas do mel de <i>Apis mellifera</i> da Amazônia, Cerrado e Pantanal de Mato Grosso, 2014, expressas em média e desvio padrão (DP), em função dos padrões de qualidade nacional e internacional. .	38
Tabela 3. Teores de compostos secundários presentes nos méis de <i>Apis mellifera</i> , Mato Grosso, 2014.	40
Tabela 4. Correlação de Spearman entre a cor e o teor de compostos secundários (fenólicos totais e flavonoides totais) do mel de <i>Apis mellifera</i> , Mato Grosso, 2014. N=18.	42
Tabela 5. Mínima diluição ativa (MDA % p/v) do mel de <i>Apis mellifera</i> , Mato Grosso, 2014. N=18.	44

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO MEL DO PANTANAL E AMAZÔNIA NO CENTRO-OESTE DO BRASIL

Tabela 1. Bioma predominante no município devido à área de ocupação territorial dos biomas Amazônia, Cerrado e Pantanal nos seis municípios selecionados no estudo.....	59
Tabela 2. Atividade antioxidante do mel de <i>Apis mellifera</i> pelo sequestro do radical livre DPPH, pela captura do radical livre óxido nítrico (NO) e pelo poder redutor do ferro (FRAP), Mato Grosso, 2014.	65
Tabela 3. Atividade antibacteriana do mel de <i>Apis mellifera</i> pelo método da microdiluição em caldo, Mato Grosso, Brasil, 2014.....	66
Tabela 4. Atividade antifúngica do mel de <i>Apis mellifera</i> contra leveduras pelo método da microdiluição em caldo, Mato grosso, Brasil, 2014.....	68

Tabela 5. Atividade antifúngica do mel de <i>Apis mellifera</i> contra fungos filamentosos pelo método da microdiluição em caldo, Mato Grosso, Brasil, 2014.	69
Tabela 6. Atividade antibacteriana do mel de <i>Apis mellifera</i> contra <i>Helicobacter pylori</i> , expressa em porcentagem de inibição, Mato Grosso, Brasil, 2014.	69

LISTA DE FIGURAS

ATIVIDADE BIOLÓGICA E CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE MÉIS DO PANTANAL E DA AMAZÔNIA DE MATO GROSSO

- Figura 1. Municípios do estado de Mato Grosso selecionados para coleta do mel, distribuídos por biomas..... 29
- Figura 2. Relação entre a cor (mm na escala Pfund) e o teor de fenólicos totais (mg de EAG/100 g de mel) do mel do Pantanal e Amazônia de Mato Grosso, 2014. (Correlação de Spearman: $r=0,735$, $p<0,01$)..... 42
- Figura 3. Relação entre a cor (mm na escala Pfund) e o teor de flavonoides totais (mg de QE/100 g de mel) do mel do Pantanal e Amazônia de Mato Grosso, 2014. (Correlação de Spearman: $r=0,891$, $p<0,01$). 43

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO MEL DO PANTANAL E AMAZÔNIA NO CENTRO-OESTE DO BRASIL

- Figura 1. Municípios do estado de Mato Grosso selecionados para coleta do mel, distribuídos por biomas..... 58
- Figura 2. Atividade anti-inflamatória do mel do Pantanal de Mato Grosso, Brasil, e dexametasona (Dexa) administrados topicamente sob edema de orelha induzido por óleo de cróton. Cada barra representa a média \pm DP de 8 animais. * $P<0,05$; *** $P<0,001$ vs. veículo. 71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ATCC	American type culture collection
CAC	Codex Alimentarius Commission
CBA	Confederação Brasileira de Apicultura
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CI50%	concentração da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical
CIM	concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Dexa	dexametasona
DP	desvio padrão
DPPH	1,1-diphenil-2-picrilhidrazila
EAG	equivalente ácido gálico
FRAP	poder redutor do ferro
HMF	hidroximetilfurfural
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MDA	mínima diluição ativa
MDD	método de difusão em disco
N. S. Livramento	Nossa Senhora do Livramento
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NO	óxido nítrico
QE	equivalente quercetina
ton	tonelada

RESUMO

FRANZ, Gabriela Maria. **Atividade biológica e composição química de méis produzidos em alguns municípios da Amazônia, Cerrado e Pantanal de Mato Grosso**. Cáceres: UNEMAT, 2015. 104 p. (Dissertação – Mestrado em Ciências Ambientais)¹.

O mel é um produto apícola com grande destaque pelas suas propriedades terapêuticas, como a atividade antioxidante e antibacteriana. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização físico-química do mel produzido em alguns municípios da Amazônia, Cerrado e Pantanal de Mato Grosso para consumo humano e avaliar a atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória dos méis. As amostras de mel foram coletadas nos municípios de Alta Floresta, Marcelândia (bioma Amazônico), Comodoro, Nossa Senhora do Livramento (bioma Cerrado), Cáceres e Poconé (bioma Pantanal), totalizando 18 amostras (3 por município). As características físico-químicas avaliadas no mel foram umidade, açúcares redutores, sacarose aparente, cinzas, sólidos insolúveis, acidez livre, hidroximetilfurfural, atividade diastásica, reação de Lund, de Fiehe, de Lugol, condutividade elétrica e cor do mel. Os compostos secundários analisados no mel foram fenólicos e flavonoides totais, quantificados e extrapolados em curva padrão de ácido gálico e quercetina. A atividade antioxidante (CI50%) foi avaliada pelos ensaios de DPPH, FRAP e óxido nítrico (NO), usando-se ácido ascórbico como padrão. A ação inibitória do mel foi avaliada por difusão em disco para estimar a mínima diluição ativa (MDA) para as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Shigella flexneri* e por microdiluição em caldo contra as bactérias *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *S. pyogenes*. A atividade antifúngica foi contra os fungos: *Candida albicans*, *Candida albicans fluconazol-resistente*, *Candida tropicalis*, *Candida*

¹Comitê de orientação: Orientadora Carla Galbiati, UNEMAT.

parapsilosis, *Cryptococcus neoformans*, *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus terreus*. Os padrões antibacterianos utilizados foram claritromicina e amoxicilina (0,39 a 50 µg/mL) e antifúngico anfotericina (0,39 a 50 µg/mL). Para avaliar a atividade anti-inflamatória foi realizado o modelo de dermatite tópica por óleo de cróton. Quinze das dezoito amostras de mel foram reprovadas em algumas das características físico-químicas. O teor médio de fenólicos totais dos méis foi 37,68 mg de EAG/100 g de mel e o teor médio de flavonoides totais dos méis do foi 0,27 mg de QE/100 g de mel. O conteúdo de fenólicos e flavonoides totais apresentou correlação positiva com a cor dos méis ($r=0,735$ e $r=0,891$, respectivamente). Os méis não apresentaram atividade antioxidante para DPPH e FRAP, e apenas os méis de Marcelândia, Alta Floresta e N. S. Livramento apresentaram atividade antioxidante para NO com média de CI50% 485,44 µg/mL. O mel não teve atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados, exceto para *H. pylori* que os méis apresentaram até 88% de inibição à concentração de 0,1 µg/mL. O mel de N. S. Livramento (Cerrado) apresentou atividade anti-inflamatória significativa em relação ao controle negativo. Os resultados indicam que as amostras de mel de Mato Grosso apresentam teores de fenólicos e flavonoides que conferem a algumas amostras potencial antioxidante e anti-inflamatório. Apesar disso, os méis estudados não possuem potencial antimicrobiano, com exceção da bactéria *H. pylori*, o que indica não possuírem potencial farmacológico. A atividade antioxidante e anti-inflamatória do mel são características locais e não foram comuns ao bioma de origem. O Mato Grosso possui potencial para produção de mel floral, com necessidade de adequação dos teores de sacarose aparente, sólidos insolúveis, cinzas e acidez livre e a realização de estudo que relacione as características físico-químicas que necessitam adequação com o manejo do mel para auxiliar a apicultura da região.

Palavra chave: Compostos secundários, Antimicrobiana, Antioxidante, Anti-inflamatório.

ABSTRACT

FRANZ, Gabriela Maria. **Biological activity and chemical composition of honeys produced in some counties from Amazon, Cerrado and Pantanal of Mato Grosso**. Cáceres: UNEMAT, 2015. 104 p. (Dissertation - Master in Environmental Sciences)².

The honey is an apiarian product with great prominence for its therapeutic properties, as the antioxidant and antibacterial activities. This report's objective was to do the physical-chemical characterization of the honey produced for human consumption in some counties in Amazon, Cerrado and Pantanal of Mato Grosso, and to evaluate the antioxidant, the antimicrobial and the anti-inflammatory activities of the honeys. The honey samples were collected in the counties of Alta Floresta, Marcelândia (Amazon biome), Comodoro, Nossa Senhora do Livramento (Cerrado biome), Cáceres and Poconé (Pantanal biome), totaling 18 samples (3 per county). The physical-chemical characteristics evaluated in the honey were the moisture, reducing sugars, apparent sucrose, ash, insoluble solids, free acidity, hydroxymethylfurfural, diastase activity, Lund, Fiehe and Lugon reactions, electrical conductivity and color of the honey. The secondary compounds analyzed in the honey were the total phenolic and flavonoid, quantified and extrapolated in standard curve of gallic acid and quercetin. The antioxidant activity (IC₅₀) was evaluated by DPPH, FRAP and nitric oxide (NO) assays, using ascorbic acid as standard. The inhibitory action of the honey was evaluated by disk diffusion to estimate the minimum active dilution (MAD) to the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Shigella flexneri* and by broth microdilution against the bacteria *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *S. pyogenes*. The antifungal activity was against the following fungi: *Candida albicans*, *Candida albicans fluconazol-*

²Guidance Carla Galbiati, UNEMAT.

resistente, Candida tropicalis, Candida parapsilosis, Cryptococcus neoformans, Candida glabrata, Aspergillus fumigatus, Aspergillus niger, Aspergillus parasiticus and Aspergillus terreus. The antibacterial patterns used were clarithromycin and amoxicillin (0.39 to 50 µg/mL) and antifungal amphotericin (0.39 to 50 µg/mL). In order to evaluate the anti-inflammatory activity the model of topical dermatitis induced by croton oil was performed. Fifteen out of eighteen samples were reprocessed in some of the physical-chemical characteristics. The honeys' average content of total phenolic was 37.68 mg GAE/100 g of honey, and the honeys' average content of total flavonoid was 0.27 mg QE/100 g of honey. The content of total phenolic and flavonoid showed positive correlation with the colors of the honeys ($r=0.735$ and $r=0.891$, respectively). The honeys did not present antioxidant activity to DPPH and FRAP, and only the honeys from Marcelândia, Alta Floresta and N. S. Livramento presented antioxidant activity to NO with average of IC₅₀ 485.44 µg/mL. The honey did not present antimicrobial activity against the tested microorganisms, except to *H. pylori*, which resulted in up to 88% of inhibition at a concentration of 0.1 µg/mL. The honey from N. S. Livramento (Cerrado) presented significant anti-inflammatory activity compared to the negative control. The results indicate that the honeys samples from Mato Grosso show phenolic and flavonoid contents that confer to some samples antioxidant and anti-inflammatory potential. Nevertheless, the honeys do not have antimicrobial potential, except for the *H. pylori* bacterium, and this indicates that they do not have pharmacological potential. The honey's antioxidant and anti-inflammatory activities are local characteristics and are not common to the biome they are from. Mato Grosso has potential to the production of the floral honey, in need of adequacy of apparent sucrose content, insoluble solids, ash and free acidity and the realization of a study that relates the physical-chemical characteristics that need adjustment with the handling of honey to help the apiculture of the region.

Keyword: Secondary compounds, Antimicrobial, Antioxidant, Anti-inflammatory.

INTRODUÇÃO GERAL

O mel floral é o produto resultante da transformação do néctar das flores pelas abelhas, que o combinam com substâncias próprias específicas, armazenam e deixam nos favos na colmeia para madurar (BRASIL, 2000).

O mel de abelhas *Apis mellifera* L. é o produto apícola mais comercializado em todo o mundo (ENGELSDORP e MEIXNER, 2010). O Brasil produz 50 mil toneladas de mel anualmente e exporta 25 mil ton, ocupa a quinta posição no mercado de exportação (BRASIL, 2009). Os estados brasileiros que mais produzem mel são o Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Piauí. O Mato Grosso está no 16º lugar do ranking de produção nacional (IBGE, 2013), apesar do evidente potencial apícola.

A constituição majoritária do mel é uma solução supersaturada de açúcares, principalmente frutose e glicose. Outros compostos minoritários estão presentes no mel, como proteínas, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, lipídeos, vitaminas, ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides e minerais (BLASA et al., 2006; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010; KHALIL et al., 2011).

As características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas determinam a qualidade de um mel (ABADIO FINCO et al., 2010; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010; BELAY et al., 2013). As características físico-químicas dos méis têm sido amplamente estudadas no mundo, e a maioria dos méis apresenta qualidade para estas características, com poucas exceções (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010; KAHRAMAN et al., 2010; BELAY et al., 2013; CIMPOIU et al., 2013; SILVANO et al., 2014).

No Brasil, a maior parte dos méis apresentam qualidade físico-química, como o mel da Bahia (LACERDA et al., 2010), 87% das amostras de mel orgânico das ilhas do Rio Paraná (ALVES et al., 2011) e o mel de São Paulo, que Pontara et al. (2012) encontraram apenas acidez e sacarose aparente fora do padrão de comercialização.

O mel do Mato Grosso tem mostrado problemas em relação à qualidade físico-química exigida pela legislação nacional. A maioria das amostras de mel

de Cuiabá esteve fora do padrão de qualidade nacional (OLIVEIRA e BARRETO, 2009), duas amostras do mel de Alta Floresta não apresentaram qualidade (FUJII et al., 2009) e o mel do sudoeste do Estado não esteve dentro do padrão para sólidos insolúveis e cinzas (AMARAL, 2010).

O mel precisa atender as exigências de qualidade para consumo humano e além de alimento, apresenta atividade funcional. O mel e outros produtos naturais representam mais de 50% de todos os medicamentos de uso clínico do mundo. O interesse por produtos naturais com atividade funcional cresceu nos últimos anos, gerando uma demanda cada vez maior por produtos apícolas (BALTRUŠAITYTĖ et al., 2007). O mel apresenta propriedades terapêuticas além das nutricionais, como atividade antimicrobiana, antibiótica, anticárie, anti-inflamatória, bioestimulante, depurativa, emoliente, energética, imunestimulante e cicatrizante (AL et al., 2009; SAXENA et al., 2010; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2012; SANT'ANA et al., 2012).

De acordo com Molan (1992) o mel pode inibir o crescimento de uma grande variedade de bactérias, fungos, protozoários e vírus. Até mesmo cepas multirresistentes a drogas e antibióticos podem ser suscetíveis ao mel (JENKINS et al., 2012; MIGUEL et al., 2013).

Estudos recentes indicam que a atividade antimicrobiana no mel provém da presença de componentes químicos, como ácidos fenólicos (gálico, ferúlico, cafeico, siríngico, vanílico, dentre outros) e flavonoides (quercetina, rutina, narigenina, crisina, apigenina, dentre outros) (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010; ESTEVINHO et al., 2012; MIGUEL et al., 2013; COOPER, 2014). Essas substâncias são produzidas pelo metabolismo secundário das plantas e são responsáveis, ainda, pelo efeito antioxidante (SILICI et al., 2010).

Os compostos antioxidantes presentes no mel têm despertado grande interesse dos cientistas (AMAROWICZ et al., 2010; CHAN et al., 2013; CRAFT et al., 2010), pois estes têm mostrado eficiência na redução do risco de doenças cardíacas, gastrointestinais, câncer, declínio do sistema imune, cataratas, cicatrização de feridas e queimaduras e processos inflamatórios devido à capacidade de capturar radicais livres (LACHMAN et al., 2010).

Alvarez-Suarez et al. (2010) relacionaram a concentração desses

compostos antioxidantes com a cor dos méis. Logo, os méis mais escuros apresentam maior potencial antioxidante e, conseqüente maior atividade antimicrobiana.

Tonks et al. (2003) e Mesaik et al. (2008) afirmam que a atividade antioxidante do mel implica na sua eficiência como imunomodulador benéfico no tratamento da inflamação, como confirmado em experimentos *in vivo*, em que a aplicação oral de mel Manuka (mel da Nova Zelândia monofloral da espécie botânica *Leptospermum scoparium*) reduziu a inflamação intestinal e a gastrite induzida por indometacina em modelos com roedores (MEDHI et al., 2008; PRAKASH et al., 2008).

A atividade antioxidante e anti-inflamatória do mel brasileiro de diferentes biomas foi confirmada em estudos recentes (PAULINO e MARCUCCI, 2009; BERTOLDI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012; BORSATO et al., 2014; SALGUEIRO et al., 2014), mas pouco foi investigado sobre os méis da Amazônia, Cerrado e Pantanal de Mato Grosso, que apresentam um grande potencial para a produção apícola (AMARAL et al., 2010; FERREIRA et al., 2014).

O aumento da produção de mel pode ser alcançado com a valoração do uso do produto e o aumento do seu consumo, por meio da confirmação de sua atividade terapêutica e biológica. Além disso, existe a necessidade de desenvolver novas classes de antibióticos a base de produtos naturais contra os quais os microrganismos não apresentem resistência. Para isso, o espectro de microrganismos estudados precisa ser ampliado, especialmente quando se trata da atividade de méis brasileiros.

Nesse contexto, o objetivo desta dissertação foi realizar a caracterização físico-química do mel produzido em alguns municípios da Amazônia, Cerrado e Pantanal de Mato Grosso para consumo humano e avaliar a atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória dos méis.

A dissertação foi dividida em dois artigos. O primeiro artigo, intitulado “Atividade biológica e características químicas de méis da Amazônia, Cerrado e Pantanal de Mato Grosso” teve como objetivo avaliar as características físico-químicas e a atividade antibacteriana do mel produzido em alguns municípios

da Amazônia, Cerrado e Pantanal de Mato Grosso para consumo humano.

O segundo artigo, intitulado “Atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória do mel da Amazônia, Cerrado e Pantanal no Centro-Oeste do Brasil” teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória do mel produzido em alguns municípios da Amazônia, Cerrado e Pantanal de Mato Grosso, Centro-Oeste do Brasil.

REFERÊNCIAS

- ABADIO FINCO, F. D. B. MOURA, L. L. SILVA, I. G. Propriedades físicas e químicas do mel de *Apis mellifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 30, p. 706-712, 2010.
- AI, M. L. DANIEL, D. MOISE, A. BOBIS, O. LASLO, L. BOGDANOV, S. Physicochemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. **Food Chemistry**, v. 112, p. 863–867, 2009.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M. TULIPANI, S. DIA, D. ESTEVEZ, Y. ROMANDINI, S. GIAMPIERI, F. DAMIANI, E. ASTOLFI, P. BOMPADRE, S. BATTINO, M. Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2490-2499, 2010.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M., GIAMPIERIA, F., GONZALEZ-PARAMAS, A. M., DAMIANIC, E., ASTOLFID, P., MARTINEZ-SANCHEZ, G., BOMPADRE, S., QUILES, J. L., SANTOS-BUELGA, C., BATTINO, M. Phenolics from monofloral honeys protect human erythrocyte membranes against oxidative damage. **Food Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1508-1516, 2012.
- ALVES, E. M. SEREIA, M. J. TOLEDO, V. A. A. S. MARCHINI, L. C. NEVES, C. A. TOLEDO, T. C. S. O. A. ANACLETO, D. A. Physicochemical characteristics of organic honey samples of africanized honeybees from Parana River island. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 635-639. 2011.
- AMARAL, A. M. Arranjo produtivo local e apicultura como estratégia para o desenvolvimento do sudoeste de Mato Grosso (**Tese de Doutorado**). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2010.
- AMAROWICZ, R. ESTRELLA, I. HERNANDEZ, T. ROBREDO, S. TROSZYNSKA, A. PEGG, A. K. R. B. Free radical-scavenging capacity, antioxidant activity, and phenolic composition of green lentil (*Lens culinaris*). **Food Chemistry**, v. 3, p. 705–711. 2010.
- BALTRUŠAITYTĖ, V. VENSKUTONIS, P. R. ČEKSTERYTĖ, V. Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. **Food Chemistry**, v. 101, p. 502-514, 2007.

- BELAY, A. SOLOMON, W. K. BULTOSSA, G. ADGABA, N. MELAKU, S. Physicochemical properties of the Harena forest honey, Bale, Ethiopia. **Ethiopia Food Chemistry**, v. 35, p. 3386-3392, 2013.
- BERTOLDI, F. C. GONZAGA, L. V. FETT, R. dos REIS, V. D. A. Avaliação da atividade antioxidante e determinação de compostos fenólicos totais de méis produzidos no Pantanal. **Evidência**, Joaçaba, v. 12(2), p. 155-164. 2012.
- BLASA, M. CANDIRACCI, M. ACCORSI, A. PIACENTINI, M. P. ALBERTINI, M. C. PIATTI, E. Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. **Food Chemistry**, v. 97, p. 217–222, 2006.
- BORSATO, D. M. PRUDENTE, A. S. DOLL-BOSCARDIN, P. M. BORSATO, A. V. LUZ, C. F. P. MAIA, B. H. L. N. S. CABRINI, D. A. OTUKI, M. F. MIGUEL, M. D. FARAGO, P. V. MIGUEL, O. G. Topical anti-inflammatory activity of a monofloral honey of *Mimosa scabrella* provided by *Melipona marginata* during winter in southern Brazil. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, p. 817–825. 2014.
- BRASIL, 2009. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. www.agricultura.gov.br
- BRASIL. Instrução Normativa n. 11, 23 de outubro de 2000. Diário Oficial da União, 23 de outubro de 2000. Disponível em: <http://www.sfdk.com.br/imagens/lei/MA%20-%20Inst%20Norm%2011.htm>.
- CHAN, K. KHONG, N. IQBAL, S. MANSOR, S. M. ISMAIL, M. Defatted kenaf seed meal (DKSM): Prospective edible flour from agricultural waste with high antioxidant activity. **LWT. Food Science and Technology**, v. 53, p. 1–6. 2013.
- CIMPOIU, C. HOSU, A. MICLAUS, V. PUSCAS, A. Determination of the floral origin of some Romanian honeys on the basis of physical and biochemical properties. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 100, p. 149–154. 2013.
- COOPER, R. Honey as an effective antimicrobial treatment for chronic wounds: is there a place for it in modern medicine? **Chronic Wound Care Management and Research**, v. 1, p. 15-22. 2014.
- CRAFT, B. D. KOSINSKA, A. AMAROWICZ, R. PEGG, R. B. Antioxidant properties of extracts obtained from raw, dry-roasted, and oil-roasted US peanuts of commercial importance. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 8, p. 311–318. 2010.

ENGELSDORP, D. MEIXNER, M. D. A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. 80–S95, 2010.

ESTEVINHO, L. M. FEÁS, X. SEIJAS, J. A. VÁZQUEZ-TATO, M. P. Orgar honey from Trás-Os-Montes region (Portugal): chemical, palynological, microbiological and bioactive compounds characterization. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 258-264, 2012.

FERREIRA, J. O. A influência da cobertura vegetal e do uso da terra dos biomas Amazônia, Cerrado e Pantanal na apicultura no Mato Grosso. (**Dissertação de mestrado**). Universidade do Estado de Mato Grosso, 2014.

FUJII, I. A., RODRIGUES, P. R. M., FERREIRA, M. N. Caracterização físico-química do mel de guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) em Alta Floresta, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, v. 10(3), p. 645-653. 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2013. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>

JENKINS, R. WOOTTON, M. HOWE, R. COOPER, R. Improving Antibiotic Activity against Wound Pathogens with Manuka Honey In Vitro. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, p. 88, 2012.

KAHRAMAN, T. BUYUKUNAL, S. K. VURAL, A. ALTUNATMAZ, S. S. Physico-chemical properties in honey from different regions of Turkey. **Food Chemistry**, v. 123, p. 41-44. 2010.

KHALIL, M. I. ALAM, N. MONIRUZZAMAN, M. SULAIMAN, S. A. GAN, S. H. Phenolic acid composition and antioxidant properties of Malaysian honeys. **Journal of Food Science**, v. 76, p. C921, 2011.

LACERDA, J. J. de J. SANTOS, J. S. SANTOS, S. A. RODRIGUES, G. B. SANTOS, M. L. P. Influência das características físico-químicas e composição elementar nas cores de méis produzidos por *Apis mellifera* no sudoeste da Bahia utilizando análise multivariada. **Química Nova**, v. 33, p. 1022-1026. 2010.

LACHMAN, J. ORSAK, M. HEJTMANKOVA, L. KOVAROVA, E. Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. **LWT. Food**

Science and Technology, v. 43, p. 52–58, 2010.

MEDHI, B. PRAKASH, A. AVTI, P. K. SAIKIA, U. N. PANDHI, P. KHANDUJA, K. L. Effect of Manuka honey and sulfasalazine in combination to promote antioxidant defense system in experimentally induced ulcerative colitis model in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 46, p. 583–590. 2008.

MESAIK, M. A. AZIM, M. K. MOHIUDDIN, S. Honey modulates oxidative burst of professional phagocytes. **Phytother Research**, v. 22, p. 1404–1408, 2008.

MIGUEL, M. G. FALEIRO, L. ANTUNES, M. D. AAZZA, S. DUARTE, J. SILVÉRIO, A. R. Antimicrobial, antiviral and antioxidant activities of “água-mel” from Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 56, p.136-144. 2013.

MOLAN, P. C. The antibacterial activity of honey. **Bee World**, p. 5-28, 1992.

OLIVEIRA, N. B., BARRETO, L. M. R. C. Qualidade do mel de *Apis mellifera* L., 1758 (HYMENOPTERA, APIDAE) comercializado no município de Cuiabá, Estado de Mato Grosso. **Apacame Mensagem Doce**, 103. 2009.

OLIVEIRA, P. S. MÜLLER, R. C. S. DANTAS, K. G. F. ALVES, C. N. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. **Química Nova**, v. 35(9), p. 1728-1732. 2012.

PAULINO, R. S. MARCUCCI, M. C. Análises físico químicas de méis do Ceará. **Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica**, v. 1(1), p. 63-78. 2009.

PONTARA, L. P. M. CLEMENTE, E. OLIVEIRA, D. M. KWIATKOWSKI, A. ROSA, C. I. L. F. SAIA, V. E. Physicochemical and microbiological characterization of cassava flower honey samples produced by africanized honeybees. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32(3), p. 547-552. 2012.

PRAKASH, A. MEDHI, B. AVTI, P. K. SAIKIA, U. N. PANDHI, P. KHANDUJA, K. L. Effect of different doses of Manuka honey in experimentally induced inflammatory bowel disease in rats. **Phytother Research**, v. 22, p. 1511–1519. 2008.

SALGUEIRO, F. B. LIRA, A. F. RUMJANEK, V. M. CASTRO, R. N. Phenolic composition and antioxidant properties of brazilian honeys. **Química Nova**, v. 37(5), p. 821-826. 2014.

SANT'ANA, L. SOUSA, J. SALGUEIRO, F. AFFONSO, M. C. CASTRO, R.

Characterization of monofloral honeys with multivariate analysis of their chemical profile and antioxidant activity. **Journal of Food Science**, v. 71, p. 135-140, 2012.

SAXENA, S. GAUTAM, S. SHARMA, A. Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. **Food Chemistry**, v. 118, p. 391–397, 2010.

SILICI, S. SAGDIC, O. EKICI, L. Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys. **Food Chemistry**, v. 121, p. 238-243. 2010.

SILVANO, M. F. VARELA, M. S. PALACIO, M. A. RUFFINENGO, S. YAMUL, D. K. Physicochemical parameters and sensory properties of honeys from Buenos Aires region. **Food Chemistry**, v. 152, p. 500–507. 2014.

TONKS, A. J., COOPER, R. A., JONES, K. P., BLAIR, S., PARTON, J., TONKS, A. Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. **Cytokine**, v. 21, p. 242–247, 2003.

ATIVIDADE BIOLÓGICA E CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE MÉIS DA AMAZÔNIA, CERRADO E PANTANAL DE MATO GROSSO

[Preparado de acordo com as normas da Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos]

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as características físico-químicas e a atividade antibacteriana do mel produzido em alguns municípios da Amazônia, Cerrado e Pantanal de Mato Grosso para consumo humano. O mel foi coletado em 6 municípios, totalizando 18 amostras (3 por município). As características físico-químicas avaliadas no mel foram umidade, açúcares redutores, sacarose aparente, cinzas, sólidos insolúveis, acidez livre, HMF, diastase, reação de Lund, Fiehe e Lugol, condutividade elétrica e cor. Os compostos secundários (fenólicos e flavonoides totais) foram quantificados em curva padrão de ácido gálico e quercetina. A ação inibitória do mel foi avaliada por difusão em disco para estimar a mínima diluição ativa (MDA) para as bactérias *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *S. typhimurium* e *S. flexneri*. Quinze das dezoito amostras de mel foram reprovadas em alguma das características físico-químicas. O teor médio de fenólicos dos méis foi 37,68 mg de EAG/100 g de mel e o teor médio de flavonoides dos méis do foi 0,27 mg de QE/100 g de mel. O conteúdo de fenólicos e flavonoides totais apresentou correlação positiva com a cor dos méis ($r=0,735$ e $r=0,891$, respectivamente). Os méis não apresentaram ação antibacteriana contra as cepas *S. pyogenes* e *S. flexneri*. Os méis de Mato Grosso não são indicados no controle das bactérias estudadas, mas os teores de fenólicos e flavonoides originam potencial antioxidante e prebiótico para os méis mais escuros. O Mato Grosso possui potencial para produção de mel floral, com necessidade de adequação da qualidade do mel aos padrões das características físico-químicas, principalmente em relação à sacarose aparente, sólidos insolúveis, cinzas e acidez livre.

Palavra chave: Cor, Compostos secundários, Antimicrobiana.

BIOLOGICAL ACTIVITY AND CHEMICAL CHARACTERISTICS OF HONEYS FROM AMAZON, CERRADO AND PANTANAL OF MATO GROSSO

[Prepared in accordance with the standards the Journal Food Science and Technology]

ABSTRACT

This report's objective was to evaluate the antibacterial activity and the physical-chemical characteristics of the honey produced for human consumption in some counties in Amazon, Cerrado e Pantanal of Mato Grosso. The physical-chemical characteristics evaluated in the honey were the moisture, reducing sugars, apparent sucrose, ash, insoluble solids, free acidity, HMF, diastase activity, Lund, Fiehe and Lugol reactions, electrical conductivity and color. The secondary compounds (total phenolic and flavonoid) were quantified in standard curve of gallic acid and quercetin. The inhibitory action of the honey was evaluated by disk diffusion to estimate the minimum active dilution (MAD) to the bacteria *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *S. typhimurium* and *S. flexneri*. Fifteen out of eighteen samples were reproved in some of the physical-chemical characteristics. The honeys' average content of total phenolic was 37.68 mg GAE/100 g of honey, and the honeys' average content of flavonoid was 0.27 mg QE/100 g of honey. The content of total phenolic and flavonoid showed positive correlation with the colors of the honeys ($r=0.735$ and $r=0.891$, respectively). The honeys did not present antibacterial action against the strains *S. pyogenes* and *S. flexneri*. The honeys from Mato Grosso are not indicated to the control of the studied bacteria, but the phenolic and flavonoid contents originate potential antioxidant and prebiotic for the darkest honeys. Mato Grosso has potential to the production of the floral honey, in need of adequacy on the quality of the honey to the physical-chemical characteristics patterns, especially regarding apparent sucrose, insoluble solids, ash and free acidity.

Keyword: Color, Secondary compounds, Antimicrobial.

1 INTRODUÇÃO

A produção e qualidade do mel são influenciadas positivamente pela riqueza de espécies, quantidade de flores e proximidades de florestas nativas (Sande et al., 2009; Alves et al., 2011), o que faz do Mato Grosso um estado potencial para a produção apícola.

O estado é composto por três biomas de elevada biodiversidade: Amazônia (53,6% do território), Cerrado (39,6%) e Pantanal (6,79%) (Mato Grosso, 2013). Apesar disso, o Mato Grosso ocupa o 16º lugar na produção de mel do País, com um total de 379 toneladas (IBGE, 2013) devido à falta de projetos políticos e econômicos que estruturam as associações e capacitem os apicultores (Dalleme et al., 2010).

O mel floral de abelhas *Apis mellifera* L. é um produto alimentício produzido a partir do néctar das flores (Azeredo et al., 2007), constituído de solução supersaturada de açúcares, principalmente frutose e glicose e outros compostos minoritários como proteínas, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, lipídeos, vitaminas, ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides e minerais que conferem ao mel propriedade nutricional e atividade funcional (Alvarez-Suarez et al., 2010; Khalil et al., 2011).

O interesse por produtos naturais com atividade funcional cresceu nos últimos anos, o que gerou uma demanda cada vez maior por produtos apícolas (Baltrušaitytė et al., 2007) devido às suas propriedades nutricionais e terapêuticas (Sant'ana et al., 2012).

A capacidade do mel de inibir o crescimento de várias bactérias Gram positivas e Gram negativas provém, possivelmente, de suas substâncias fenólicas e flavonoides (Alvarez-Suarez et al., 2010; Escuredo et al., 2012), que são produzidas pelo metabolismo secundário das plantas e são responsáveis, ainda, pelo efeito antioxidante (Silici et al., 2010). Alvarez-Suarez et al. (2010) descobriram que os méis mais escuros apresentam maior concentração de compostos secundários como fenólicos, flavonoides e carotenoides e conseqüente maior atividade antimicrobiana.

O mel Manuka, da Nova Zelândia, monofloral de *Leptospermum scoparium*, possui atividade antimicrobiana constatada. As bactérias não são

capazes de manifestar resistência a este produto natural e até mesmo cepas multirresistentes a drogas e antibióticos podem ser suscetíveis a este mel (Blair et al., 2009; Cooper et al., 2012). Jenkins et al. (2012) utilizaram o sinergismo entre antibióticos e mel no combate a bactérias multirresistentes, e descobriram que uma quantidade de mel adicionada ao antibiótico potencializa seu efeito.

As características físico-químicas e as características sensoriais e microbiológicas determinam a qualidade de um mel. Pelas análises físico-químicas pode-se verificar a autenticidade do produto e detectar adulterações ou a presença de componentes artificiais, garantindo a segurança alimentar para os consumidores (Abadio Finco et al., 2010; Belay et al., 2013).

A autenticidade do mel é definida pelo Codex Alimentarius (2001) e pela legislação do país de origem, que, no Brasil seguem a Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000, elaborada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2000).

O mel brasileiro tem sido considerado de boa qualidade físico-química, com algumas exceções. Lacerda et al. (2010) encontraram méis em conformidade com a legislação na Bahia, enquanto Abadio Finco et al. (2010) reprovaram 50% das amostras de Tocantins. Alves et al. (2011) observaram excelente qualidade em 87% das amostras de mel orgânico das ilhas do Rio Paraná, e Liberato et al. (2013) consideraram o mel no Ceará de boa qualidade para as características físico-químicas.

O aumento da produção de mel pode ser alcançado com a valoração do uso e consumo do produto, por meio da comprovação de sua atividade terapêutica e biológica. Além disso, existe a necessidade de desenvolver novas classes de antibióticos a base de produtos naturais contra os quais os microrganismos não apresentem resistência.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as características físico-químicas e a atividade antibacteriana do mel produzido em alguns municípios da Amazônia, Cerrado e Pantanal de Mato Grosso para consumo humano.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local de estudo e coleta do mel

O mel de abelha *A. mellifera* foi coletado em seis municípios de Mato Grosso (Figura 1). Um total de 18 amostras foram coletadas durante o estudo, 3 amostras por município.

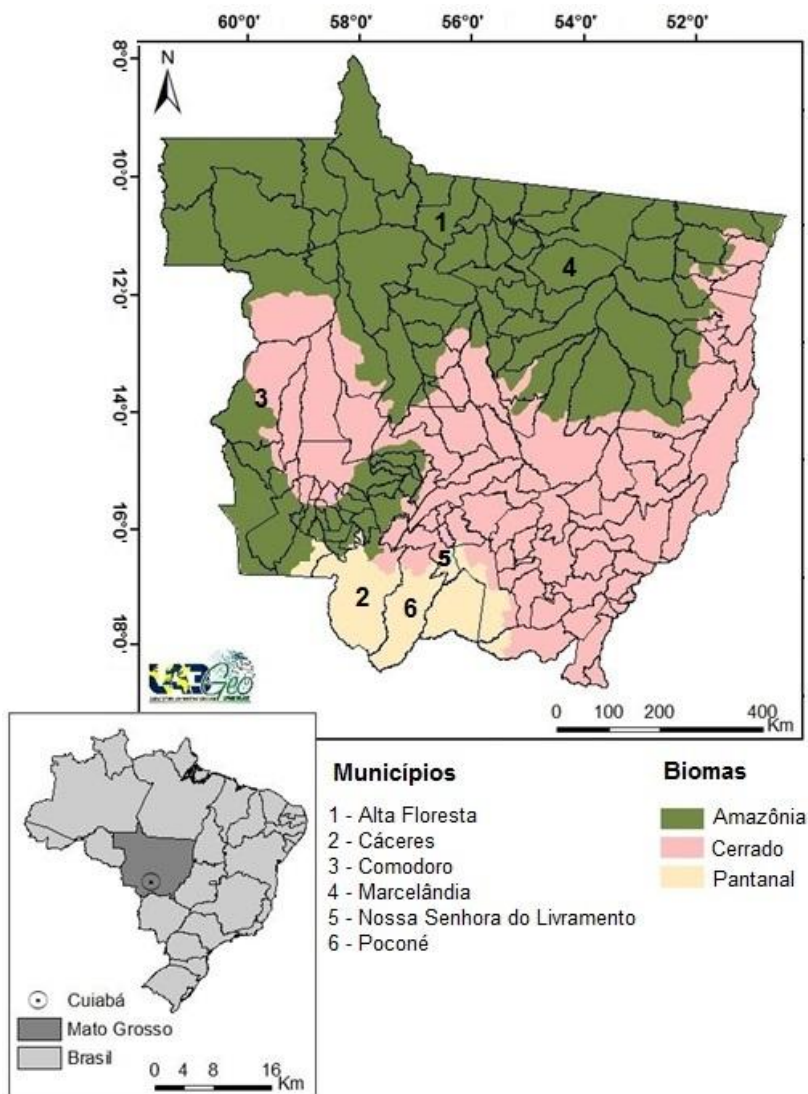


Figura 1. Municípios do estado de Mato Grosso selecionados para coleta do mel, distribuídos por biomas. Elaborado por: Jennifer Oberger Ferreira e Mirian Raquel da Silva Miranda, 2013.

Os municípios foram agrupados dentro do bioma que apresentava predominância da área de ocupação territorial (Tabela 1), utilizando o programa AutoCAD 2013 para isto. Esse critério foi usado devido a quatro dos seis

municípios estudados serem ocupados por dois biomas ou mais (Figura 1). Assim, as amostras de mel foram coletas no bioma Amazônico nos municípios de Alta Floresta e Marcelândia, no Cerrado em Comodoro e Nossa Senhora do Livramento e no Pantanal em Cáceres e Poconé.

Esses municípios foram selecionados por serem os maiores produtores do Estado (IBGE, 2013; FERREIRA, 2014) (Anexo A) ou por fazerem parte de um Arranjo Produtivo Local (CBA, 2013).

Tabela 1. Bioma predominante no município devido à área de ocupação territorial dos biomas Amazônia, Cerrado e Pantanal nos seis municípios selecionados no estudo.

Município	% do bioma no município			Bioma predominante
	Amazônia	Cerrado	Pantanal	
Alta Floresta	100	0,0	0,0	Amazônia
Cáceres	5,93	8,97	85,10	Pantanal
Comodoro	43,88	56,12	0,0	Cerrado
Marcelândia	100	0,0	0,0	Amazônia
N. S. Livramento	0,0	63,95	36,05	Cerrado
Poconé	0,0	15,74	84,26	Pantanal

A Amazônia ocupa um território de 480,215 km² no Mato Grosso, caracterizada por diferentes aspectos fisionômicos, com presença de palmeiras e cipós, clima úmido, sem período de estiagem, com chuvas bem distribuídas durante o ano e temperaturas elevadas (IBGE, 2013).

O Cerrado ocupa um território de 354,823 km² no Mato Grosso, caracteriza-se pela vegetação de Savana, com mais de 6,5 mil plantas catalogadas, o clima é quente, semiúmido e apresenta duas estações bem definidas: verão chuvoso e inverno seco. A biodiversidade é elevada no Cerrado (IBGE, 2013).

O Pantanal ocupa um território de 60,885 km² no Estado, possui vegetação aberta, semelhante ao Cerrado, mas apresenta partes de florestas úmidas e prolongamentos do ecossistema Amazônico. Sua localização em uma

depressão favorece inundações sazonais no verão chuvoso, época da enchente (IBGE, 2013).

Os méis utilizados no estudo são provenientes da safra de 2012/2013, colhidos entre os meses de julho e outubro, adquiridos diretamente com os apicultores, com as amostras armazenadas em frascos âmbar sob refrigeração.

2.2 Características físico-químicas

A determinação de compostos secundários (fenólicos e flavonoides), açúcares redutores, sacarose aparente, sólidos insolúveis, pH, acidez livre, atividade diastásica, condutividade elétrica, cinzas e a reação de Lugol foram realizadas no Laboratório do Centro de Estudos em Apicultura (CET*Apis*), Campus de Cáceres na Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT).

A determinação da umidade, cor, HMF, reações de Fiehe e Lund foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos no Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/ USP).

A umidade do mel foi determinada pelo método refratométrico de Chataway, com auxílio do refratômetro de Abbé (AOAC, 1990). Os açúcares redutores e a sacarose aparente foram quantificados através da titulação das soluções Fehling A e B (CAC, 1990). O teor de sólidos insolúveis foi determinado pelo peso do resíduo remanescente da lavagem da amostra (CAC, 1990).

A condutividade elétrica foi determinada com auxílio de condutímetro e da Tabela de Chataway, fundamentando-se no fato de que quanto maior o teor de cinzas e acidez no mel, maior a condutividade resultante (Vorwohl, 1964). O teor de cinzas foi calculado pelo método gravimétrico para quantificar as substâncias não orgânicas submetidas a altas temperaturas que se volatilização em mufla (CAC, 1990).

A acidez livre do mel foi determinada por meio de titulação simples em solução de mel e hidróxido de sódio 0,05 N em pHmetro até pH de 8,5 (AOAC, 1990). A faixa de pH ideal do mel está entre 3,2 e 4,5 (Bera & Almeida-Muradian, 2004). Para a determinação quantitativa do hidroximetilfurfural (HMF) utilizou-se o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC),

segundo Zappala et al. (2005). A atividade diastásica (diastase) foi baseada no procedimento de Schade, no qual se incuba uma solução tamponada de amido-mel e lê-se espectrofotometricamente (CAC, 1990).

A reação de Lund foi baseada na precipitação de proteínas naturais do mel pelo ácido tânico (IAL, 2005). A análise de cor do mel foi realizada por colorimetria com o uso do colorímetro “C 221 Honey color analyzer”, marca Hanna. O resultado obtido no aparelho foi comparado com a escala Pfund, em mm (Lanara, 1981).

A reação de Fiehe detectou qualitativamente a presença de HMF pelo método espectrofotométrico. A reação de Lugol detectou por reação colorimétrica qualitativa a adição de glicose comercial no mel (IAL, 2005).

2.3 Compostos secundários

Para a determinação do conteúdo de fenólicos totais foi empregado o método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton & Rossi (1985). Uma alíquota de 100 µL de solução aquosa de mel a 0,2 g/mL foi misturada a 0,5 mL de Folin-Ciocalteu e 1,5 mL de carbonato de sódio 20% m/v, e o volume aferido com água destilada para 10 mL. A leitura foi em absorbância a 765 nm. O ensaio foi realizado em triplicata, apresentando a média, expressa em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g de mel. Os dados da leitura foram extrapolados em uma curva analítica padrão de ácido gálico ($r=0,99$).

O teor de flavonoides totais foi determinado segundo metodologia descrita por Meda et al. (2005), com adaptações. Uma alíquota de 3 mL de solução de mel em metanol: água (1:1) na concentração de 500 mg/mL foi misturada a 3 mL de solução metanólica a 2% de cloreto de alumínio hidratado (Vetec). Após repouso de 30 minutos, as absorbâncias foram lidas no comprimento de onda de 415 nm, contra o branco consistindo de 3 mL de metanol. Os dados obtidos foram extrapolados em uma curva analítica padrão de quercetina em metanol ($r=0,99$).

2.4 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi avaliada contra cepas de bactérias provenientes do American Type Culture Collection (ATCC): *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus pyogenes* (ATCC NEWP 0015),

Escherichia coli (ATCC 25922), *Salmonella typhimurium* (ATCC NEWP 0028) e *Shigella flexneri* (ATCC NEWP 0122).

A determinação da atividade antimicrobiana do mel foi realizada usando o método de difusão em disco (MDD), estabelecido como padrão pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003), e foi estimada a mínima diluição ativa (MDA).

Os méis foram testados nas concentrações de 5%, 12,5%, 25%, 50%, 75% (p/v) e mel puro. Os microrganismos cresceram em Ágar Mueller Hinton (*S. aureus* e *E. coli*), Ágar Mueller Hinton enriquecido com 5% de sangue desfibrinado de carneiro em ambiente anaeróbico produzido pelo sistema de anaerobiose Anaerobac – PROBAC do Brasil (*S. pyogenes*) e Ágar Salmonella-Shigella (*S. typhimurim* e *Shigella flexneri*) vertidos em placas de Petri (NCCLS, 2003).

Uma suspensão de microrganismo a 10^6 na Escala de McFarland foi espalhada nas placas (NCCLS, 2003), e imediatamente depois, 10 μ L das soluções de mel foram adicionados sobre os discos de papel.

Como controle positivo foram utilizados discos comerciais dos antibióticos Oxacilina (1 μ g) e Amoxicilina (10 μ g) para *S. aureus* e *S. pyogenes* (Scalabrin et al., 2003; Cruvinel et al., 2011), Amoxicilina e Ciprofloxacina (5 μ g) para *E. coli* (Zanatta et al., 2004), Ciprofloxacina e Azitromicina (15 μ g) para *S. typhimurium*, e Amoxicilina e Azitromicina para *S. flexneri* (Tessmann et al., 2008; Mesquita et al., 2009).

Uma solução de mel artificial (com 3 g de sacarose, 35 g de frutose e 45 g de glicose em 17 g de água deionizada estéril) (Mercês et al., 2013) foi testada para determinar se os efeitos inibitórios estão ligados ao teor de açúcar dos méis.

A leitura da atividade antimicrobiana foi realizada após incubação de 24 e 48 h em temperatura de 37 °C (Ostrosky et al., 2008). A atividade antimicrobiana foi mensurada pelo diâmetro (mm) da zona de inibição (halos) ao redor dos discos, utilizando-se um paquímetro digital (Ferronato et al., 2007).

2.5 Análise estatística

As características físico-químicas foram analisadas por meio de estatística descritiva, com a média e o desvio padrão das características avaliadas.

O teor de fenólicos e flavonoides totais entre os méis de diferentes origens geográficas foi testado com análise de variância (Anova) para origem geográfica com seis níveis o modelo estatístico foi composto pelo conteúdo de fenólicos totais como variável dependente e pela origem como variável independente. O modelo estatístico foi simplificado para três níveis, testando a origem geográfica para os três biomas (Amazônia, Cerrado e Pantanal) como variável independente, ao nível de 5% de significância. O mesmo modelo estatístico foi usado para flavonoides totais.

O teste de contraste foi aplicado para agrupar os níveis de origem geográfica em relação à média dos compostos secundários do mel ($p > 0,05$). Os dados de fenólicos totais foram transformados para logaritmo e flavonoides totais para raiz quadrada para ajustar a distribuição de erros Normal.

Para testar a relação da cor dos méis com o teor de fenólicos e flavonoides, os dados foram submetidos à análise de correlação de Spearman por ser uma análise que não relaciona causa e efeito das variáveis incluídas no modelo estatístico, removendo a dependência entre elas e facilitando a interpretação da relação existente. O modelo estatístico para análise de correlação comparou a intensidade da cor do mel (em mm) e o teor de fenólicos. O mesmo modelo estatístico foi usado para flavonoide. A correlação de Spearman é indicada para distribuição de erros não Normal.

A mínima diluição ativa do mel de cada origem geográfica foi calculada por regressão linear, com um modelo estatístico formado pela zona de inibição bacteriana como variável dependente e as concentrações do mel como variável independente.

A mínima diluição ativa (MDA) do mel para *S. aureus* entre os méis de diferentes origens geográficas foi testada com análise de variância (Anova) do tipo Kruskal-Wallis. Esta análise foi utilizada, pois os dados não apresentaram normalidade. O modelo estatístico tem a MDA como variável dependente e os

municípios de origem como variável independente, a 95% de significância.

A mínima diluição ativa do mel para *E. coli* e *S. tythimurium* entre os méis de diferentes origens geográficas foi testada com análise de variância (Anova) para origem geográfica em seis níveis no modelo estatístico composto pela MDA do mel como variável dependente e pelos municípios de origem como variável independente. As médias foram comparadas por meio do teste de médias de Tukey ao nível mínimo de significância estatística de $p < 0,05$. Os dados de *E. coli* foram transformados para raiz quadrada para ajustar a distribuição de erros Normal.

As zonas de inibição dos antibióticos sobre as bactérias foram descritas quanto à média e desvio padrão das repetições.

O teste de Shapiro-Wilk foi usado para verificar o ajuste da distribuição de erros Normal. As análises foram realizadas no programa R (R version 3.0.3, 2014).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Características físico-químicas

O teor de umidade dos méis avaliados neste trabalho variou de 13,6 a 16,8%, com média de 15,2% (Tabela 2), com todas as amostras dentro do padrão de até 20% preconizado pela legislação nacional (Brasil, 2000) e internacional (Codex Alimentarius, 2001). Estes resultados assemelham-se aos valores encontrados para méis de São Paulo, que tiveram teor de umidade médio de 18,13% (Pontara et al., 2012).

Amostras de mel Mato Grosso apresentaram teor de umidade superior a 18% (Longo, 2013; Ferreira, 2014), diferente do presente estudo, o que indica que os apicultores têm adequado o manejo, melhorando a qualidade do mel mato-grossense. Alvarez-Suarez et al. (2010) atribuem o teor de umidade do mel ao período de colheita. O mel de São Paulo foi colhido no período de seca, assim como as amostras do presente trabalho.

A concentração de açúcares redutores dos méis mato-grossenses variou de 66,25 a 89,23%, com média de 74,39% (Tabela 2), todas as amostras dentro do padrão da legislação nacional (mínimo de 65%) (Brasil, 2000) e

internacional (mínimo de 60%) (Codex Alimentarius, 2001). Esses resultados são próximos aos observados por Alves et al. (2011) em méis produzidos em locais de vegetação nativa no Paraná (67,13 a 72,04%) e Belay et al. (2013) em méis produzidos na Etiópia (67,79 a 74,62%). Segundo Küçük et al. (2007) os açúcares são os principais constituintes do mel, compreendendo cerca de 95% do peso seco do mel. Este estudo confirmou que os açúcares redutores foram os principais constituintes do mel.

A sacarose aparente apresentou valores entre zero e 12,15%, com média de 2,41% (Tabela 2). Apenas uma amostra esteve fora do padrão da legislação (Brasil, 2000) que preconiza um máximo de 6% e três amostras estiveram em desacordo com o padrão internacional (Codex Alimentarius, 2001), de no máximo 5%. Kahraman et al. (2010) encontraram teores de sacarose aparente em desacordo com o padrão de qualidade internacional (1,98 a 6,22%) em amostras de mel da Turquia e atribuíram isso ao fato das abelhas possivelmente terem sido alimentadas com xarope de açúcar no lugar de néctar, que não foi o que ocorreu no presente estudo no Mato Grosso.

Gomes et al. (2010) atribuem a elevação da sacarose à colheita precoce do mel, quando os favos ainda não estão operculados ou até mesmo a adição de sacarose comercial. Esta característica do manejo deve servir de orientação aos apicultores como boas práticas apícolas para produção de mel de qualidade.

O teor de sólidos insolúveis do mel estudado variou de 0,0085 a 0,24% (Tabela 2) e seis amostras estiveram fora do padrão da legislação (Brasil, 2000; Codex Alimentarius, 2001), que limita a um máximo de 0,1%. Este resultado foi semelhante ao encontrado por Belay et al. (2013), que analisaram o mel da Etiópia e encontraram teores de até 0,38% de sólidos insolúveis. Segundo estes autores, a presença de impurezas no mel (cera, pólen, detritos do favo, abelhas e partículas de sujeira) pode ser atribuída à falta de conhecimento ou falta de qualidade na extração do produto, bem como no processamento e embalagem.

A condutividade elétrica variou de 147 a 901 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, com média de 433,67 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Tabela 2), com apenas uma amostra fora do parâmetro

internacional que preconiza um valor máximo de $800 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Codex Alimentarius, 2001). Para condutividade não há parâmetro na legislação nacional (Brasil, 2000). Abadio Finco et al. (2010) encontraram valores semelhantes (340 e $1040 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) para condutividade elétrica de amostras de mel de Tocantins, e relacionaram essa variação com o pH, a acidez, e o conteúdo de cinzas presentes no mel.

Os teores de sacarose aparente e a condutividade elétrica foram as duas características que apresentaram mais amostras fora do padrão para o mel de Mato Grosso analisado por Longo (2013) e Ferreira (2014), diferente do presente trabalho que só identificou uma amostra fora do padrão para estas características. Isto mostra que os apicultores estão se atentando para a realização na colheita no tempo certo, evitando pH extremamente ácido e altos níveis de sacarose aparente.

O teor de cinzas médio do mel foi de 0,24%, com valores de 0,02 a 0,87% (Tabela 2). Duas das amostras estiveram fora do preconizado pela legislação brasileira (máximo de 0,6% para amostras de mel floral) (Brasil, 2000). De acordo com Vilhena & Almeida-Muradian (1999) esta análise possibilita detectar algumas irregularidades no mel, especialmente a falta de higiene e a não decantação e/ou filtração após a colheita do mel pelo apicultor.

O nível de acidez livre dos méis variou de 23,13 a 59,81 mEq/kg (Tabela 2), com oito amostras fora do padrão de qualidade da legislação nacional (máximo 40 mEq/kg) (Brasil, 2000), mas apenas quatro amostras fora do padrão internacional (máximo 50 mEq/kg) (Codex Alimentarius, 2001). Alguns autores relatam que, além da florada, o armazenamento incorreto ou colheita precoce podem modificar a acidez do mel, o que pode ser melhorado com o emprego de boa prática de manejo apícola (Gomes et al., 2010).

De acordo com Longo (2013), o uso da casa do mel em conjunto com o número de colmeias são as práticas apícolas mais importantes para garantir as características físico-químicas do mel, sendo que o número de colmeias expressa o profissionalismo do apicultor da Baixada Cuiabana e do Pantanal de Mato Grosso.

A substância HMF apresentou média de $34,69 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, variando de 2,56

a 127,28 mg.kg⁻¹, com quatro amostras em desacordo com o padrão nacional (máximo de 60 mg/kg) e duas com o internacional (máximo de 80 mg/kg) (Brasil, 2000; Codex Alimentarius, 2001). De acordo com Bogdanov et al. (2004), o mel fresco não contém a substância HMF. Entretanto, se o mel for submetido a altas temperaturas, condições inadequadas de armazenamento ou longo tempo de estocagem passa a apresentar alto teor de HMF (Santos et al., 2010). No Mato Grosso predominam altas temperaturas durante todo o ano, o que demanda maior cuidado com a conservação do mel.

Tabela 2. Características físico-químicas do mel de *Apis mellifera* da Amazônia, Cerrado e Pantanal de Mato Grosso, 2014, expressas em média e desvio padrão (DP), em função dos padrões de qualidade nacional e internacional.

Características físico-químicas	Média ± DP (N=18)	MAPA ^a	Codex ^b
Umidade (%)	15,2 ± 0,95	Máx. 20	Máx. 20
Açúcares redutores (%)	74,39 ± 6,01	Mín. 65	Mín. 60
Sacarose aparente (%)	2,41 ± 3,18	Máx. 6	Máx. 5
Sólidos insolúveis (%)	0,10 ± 0,07	Máx. 0,1	Máx. 0,1
Condutividade elétrica (µS.cm ⁻¹)	433,67 ± 193,6	-	Máx. 800
Cinzas (%)	0,24 ± 0,20	Máx. 0,6	-
Acidez livre (mEq.kg ⁻¹)	38,27 ± 11,69	Máx. 40	Máx. 50
HMF (mg.kg ⁻¹)	34,69 ± 35,05	Máx. 60	Máx. 80
Diastase (Un. Goethe/g de mel)	50,65 ± 3,55	Mín. 3	Mín. 8
Reação de Fiehe (positiva)	11 amostras	-	-
Reação de Lund (mL)	0,81 ± 0,45	0,6 a 3	-
Reação de Lugol (positiva)	0 amostras	-	-

(-) Padrão não requerido.

^a Valor preconizado pela legislação (Brasil, 2000).

^b Valor preconizado pelo Codex Alimentarius (2001).

Apesar dos resultados de HMF, todas as amostras estiveram de acordo com a legislação nacional (mínimo de 3) (Brasil, 2000) e a internacional

(mínimo de 8) (Codex Alimentarius, 2001) para diastase, com média de 50,65 Un. Goethe/g de mel (Tabela 2). Alvarez-Suarez et al. (2010) encontraram valores dentro da norma internacional para o mel de Cuba (13,4 a 33,4 Un. Goethe/g de mel), e afirmam que esta característica indica que o mel tem qualidade. Logo, as amostras de mel de Mato Grosso não sofreram adulteração por adição de xarope de açúcar ou amido.

Onze das 18 amostras analisadas apresentaram reação positiva para o teste de Fiehe. Os resultados da análise qualitativa para o HMF de amostras de mel de Tocantins realizadas por Abadio Finco et al. (2010) demonstraram que 25% das amostras apresentaram resposta positiva à reação de Fiehe, indicando má qualidade desses méis por possível adulteração ou superaquecimento. Os resultados de HMF qualitativo do presente trabalho foram confirmados pela análise quantitativa, que encontrou quatro amostras em desacordo com o padrão nacional e duas com o internacional, apesar de todas estarem de acordo quanto à diastase, indicando possível superaquecimento de algumas amostras.

Para a reação de Lund, cinco das 18 amostras foram reprovadas (Tabela 2), pois formaram um depósito abaixo de 0,6 mL, divergindo da legislação brasileira (Brasil, 2000). Nos méis de Tocantins, Abadio Finco et al. (2010) encontram em oito amostras valor superior a referência da reação de Lund, o que sugere perdas ou adição de substâncias proteicas durante o processamento do produto (Bera & Almeida-Muradian, 2007).

Todas as amostras analisadas apresentaram reação negativa para Lugol. O mesmo resultado foi encontrado por Paulino & Marcucci (2009) no mel do sertão do Ceará. Este teste qualitativo descarta a possibilidade de adulteração por glicose comercial, xarope de açúcar ou a presença de dextrina no mel.

A cor dos méis apresentou grande variação, de extra branco (17 mm na escala Pfund) a âmbar (100 mm), mas na maioria das amostras (44%) predominou a cor âmbar claro (50 a 84 mm). O pH teve média de 3,9, variando de 3,6 a 4,4, semelhante aos resultados de Abadio Finco et al. (2010) para o mel de Tocantins que apresentou pH entre 3,35 e 4,50.

3.2 Compostos secundários

Para fenólicos totais os méis da Amazônia estudados neste trabalho apresentaram de 15,0 a 41,5 mg de EAG/100 g de mel ($x= 31,33$), os méis do Cerrado de 17,0 a 59,5 mg de EAG/100 g de mel ($x= 34,08$) e os méis do Pantanal de 14,0 a 122,5 mg de EAG/100 g de mel ($x= 47,92$) (Tabela 3), sem diferença significativa entre os biomas de origem ($p=0,64$).

O teor de fenólicos no mel foi semelhante entre a origem dos municípios de Alta Floresta, Cáceres e Comodoro ($x=26,67$), que foi agrupado pelo teste de contraste ($p=0,68$), os municípios de Marcelândia, N. S. Livramento e Poconé tiveram teor semelhante ($x=48,89$) e constituíram outro grupo ($p=0,24$).

Tabela 3. Teores de compostos secundários presentes nos méis de *Apis mellifera*, Mato Grosso, 2014.

Bioma de origem do mel	Compostos secundários (N=18)	
	Fenólicos totais * (mg de EAG/100 g de mel)	Flavonoides totais * (mg de QE/100 g de mel)
Pantanal	47,92 ± 37,96	0,26 ± 0,04
Cerrado	34,08 ± 15,03	0,28 ± 0,09
Amazônia	31,33 ± 11,18	0,27 ± 0,06

Legenda: EAG: equivalente ácido gálico, QE: equivalente quercetina.

* Médias nas colunas não diferem ao nível de 5% pelo teste F.

Rizelio (2011) encontrou teor de compostos fenólicos totais entre 36,37 e 71,69 mg de EAG/100 g de mel em méis de Santa Catarina, valores dentro dos encontrados neste trabalho. Meda (2005) analisou méis de outros países e de diferentes origens florais, e encontrou teores de fenólicos totais de 32,59 a 114,74 mg de EAG/100 de mel, enquanto um trabalho referente a méis do Pantanal do Mato Grosso do Sul identificou teores médios de compostos fenólicos totais de 61,52 e 222,03 mg de EAG/100 g de mel, dependendo do local de coleta (Bertoldi et al., 2012), valores consideravelmente superiores aos dos méis avaliados no presente trabalho.

Para o teor de flavonoides totais, a média dos méis da Amazônia foi de

0,27 mg de QE/100 g de mel, com a maior concentração de 0,36 e a menor de 0,19 mg de QE/100 g de mel, a média dos méis do Cerrado foi de 0,28 mg de QE/100 g de mel, variando de 0,21 a 0,47 mg de QE/100 g de mel, e a média dos méis do Pantanal foi de 0,26 mg de QE/100 g de mel, variando de 0,20 a 0,34 mg de QE/100 g de mel (Tabela 3), não diferindo significativamente entre os biomas de origem ($p=0,89$).

O teor de flavonoides no mel foi semelhante entre a origem dos municípios de Alta Floresta, Cáceres e Comodoro ($x=0,24$), que foi agrupado pelo teste de contraste ($p=0,69$), os municípios de Marcelândia, N. S. Livramento e Poconé tiveram teor semelhante ($x=0,30$) e constituíram outro grupo ($p=0,73$).

O teor de flavonoides encontrados nos méis estudados são inferiores aos encontrados por Meda et al. (2005), que analisou mel de diversos tipos, oriundos de vários países, e encontrou teores entre 0,17 e 8,35 mg de QE/100g de mel.

Assim, os compostos secundários foram agrupados em dois níveis quanto à origem geográfica dos municípios. A fonte botânica para compostos fenólicos e flavonoides pode ser a mesma, portanto os municípios agrupados devem ser semelhantes quanto à disponibilidade de recursos florais.

Estes resultados sugerem que os méis da Amazônia, Cerrado e Pantanal mato-grossenses são mais abundantes em compostos fenólicos do que flavonoides, e que origem geográfica dos municípios, e não o bioma de origem, influencia no teor destes metabólitos, entretanto existe semelhança entre os municípios de Alta Floresta, Cáceres e Comodoro e entre Marcelândia, N. S. Livramento e Poconé.

Essas substâncias dos compostos secundárias são as responsáveis pela bioatividade do mel. Elas apresentam capacidade antioxidante, antimicrobiana, antiviral e anticarcinogênica, gerando um efeito benéfico sobre a saúde humana, e despertando interesse em sua identificação e quantificação (Küçük et al., 2007; Rizelio, 2011).

De acordo com Beretta et al. (2005) e Alvarez-Suarez et al. (2010), a variação de cores encontrada no mel depende da combinação de muitos

fatores, dentre eles o conteúdo de ácidos fenólicos e flavonoides.

O conteúdo de fenólicos totais esteve correlacionado positivamente com a cor dos méis ($r=0,735$, $p<0,01$, Tabela 4, Figura 2), corroborando com o relato de Alvarez-Suarez et al. (2010), que encontraram maiores teores de fenólicos totais para o mel de cor âmbar, e menor teor para o mel extra branco. Ferreira et al. (2009) encontraram baixos teores de fenólicos para os méis portugueses mais claros, e altos teores para os mais escuros.

Tabela 4. Correlação de Spearman entre a cor e o teor de compostos secundários (fenólicos totais e flavonoides totais) do mel de *Apis mellifera*, Mato Grosso, 2014. N=18.

Parâmetros	Cor	Fenólicos	Flavonoides
Cor	1,00		
Fenólicos	0,735**	1,00	
Flavonoides	0,891**	0,764*	1,00

Legenda: * $p<0,05$, ** $p<0,01$.

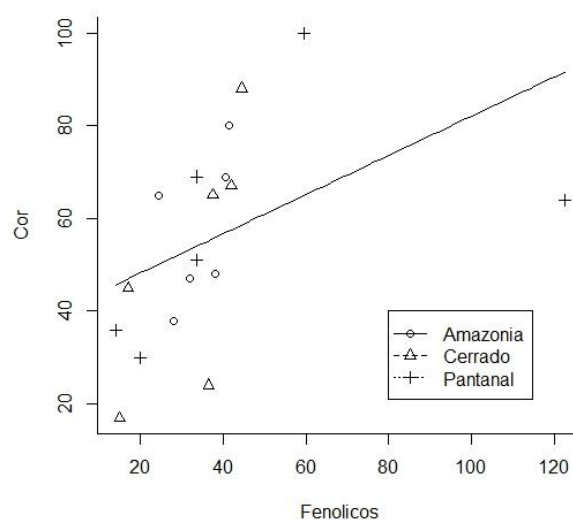


Figura 2. Relação da cor (mm na escala Pfund) e o teor de fenólicos totais (mg de EAG/100 g de mel) do mel da Amazônia, Cerrado e Pantanal de Mato Grosso, 2014. (Correlação de Spearman: $r=0,735$, $p<0,01$).

O mel âmbar (cor mais escura) apresentou maior teor de flavonoides totais (0,47 mg de QE/100 g de mel), enquanto que o mel de extra branco (cor mais clara) apresentou o menor conteúdo de flavonoides (0,19 mg de QE/100 g de mel). Isso foi confirmado pela correlação positiva entre cor e a quantidade de flavonoides totais ($r=0,891$, $p<0,01$, Tabela 4, Figura 3).

Alvarez-Suarez et al. (2010) encontraram correlação positiva entre o teor de flavonoides totais e a cor dos méis de Cuba, pois o mel âmbar apresentou alto teor de flavonoides e o mel extra branco teor muito baixo. A relação do aumento da intensidade da cor dos méis com a concentração de compostos secundários também foi percebida por Meda et al. (2005).

Uma correlação positiva significativa foi encontrada entre o conteúdo de fenólicos e flavonoides totais ($r=0,764$, $p<0,01$), assim como no trabalho de Alvarez-Suarez et al. (2010) que relatam que o aumento da intensidade da cor do mel em Cuba parece estar relacionado com o aumento da concentração de compostos fenólicos e flavonoides totais. Assim, os resultados do presente estudo parecem confirmar que o conteúdo destes compostos pode afetar diretamente a cor do mel.

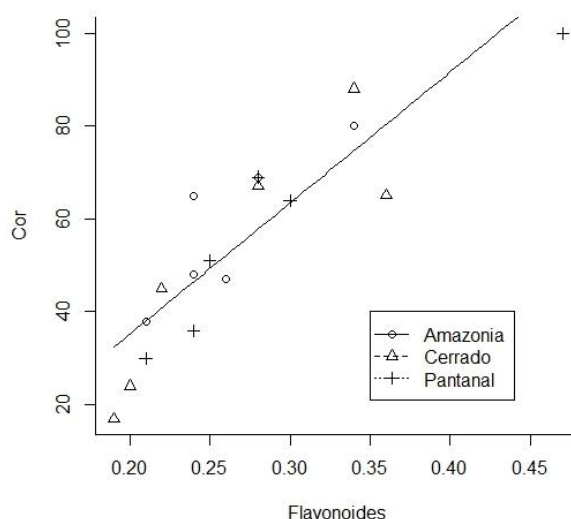


Figura 3. Relação da cor (mm na escala Pfund) e o teor de flavonoides totais (mg de QE/100 g de mel) do mel da Amazônia, Cerrado e Pantanal de Mato Grosso, 2014. (Correlação de Spearman: $r=0,891$, $p<0,01$).

3.3 Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana do mel de Mato Grosso estudada neste trabalho apresentou mínima diluição ativa para as bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *S. tythimurium* de 44,58% p/v (Tabela 5). A mínima diluição ativa para cada bactéria não diferiu entre as origens geográficas do mel (Tabela 5). Os méis não apresentaram ação antibacteriana contra as cepas *S. pyogenes* e *S. flexneri*, pois não houve a formação de zona de inibição em torno dos discos com tratamento.

Tabela 5. Mínima diluição ativa (MDA % p/v) do mel de *Apis mellifera*, Mato Grosso, 2014. N=18.

Bactéria	MDA dos méis (média ± SDM) ^a	R ²	p*
<i>Staphylococcus aureus</i>	44,58 ± 141,42	0,67	0,69 ¹
<i>Escherichia coli</i>	44,58 ± 99,84	0,84	0,98 ²
<i>Salmonella tythimurium</i>	44,58 ± 321,29	0,96	1,00 ²

^a Mínima diluição ativa do mel em % p/v resultando em uma zona de inibição de 1 mm.

* Probabilidade da Anova para comparação da mínima diluição ativa do mel entre as origens geográficas pelo teste Kruskal-Wallis para *S. aureus*¹ e pelo teste F² para *E. coli* e *S. tythimurium*.

A mínima diluição ativa de 44,58% p/v não foi considerada eficaz levando em consideração os dados de Alvarez-Suarez et al. (2010) que estimaram a MDA de 4,02% v/v para *S. aureus* em méis cubanos, e a consideraram sensível, e MDA de 7,96 e 8,02% v/v para *E. coli* e *Bacillus subtilis*, respectivamente, que consideraram moderada sensibilidade.

Voidarou et al. (2011) estimaram que para cada mm de zona de inibição de *S. aureus* foi necessária uma concentração de 15,5% p/v para mel da Grécia, concentração três vezes menor que a concentração encontrada para o mel de Mato Grosso. Em outro trabalho, a mínima diluição ativa do mel de Manuka e de um mel de pastagem contra *Staphylococcus* coagulase-negativa isolados de pacientes da Nova Zelândia variou de 2,7 a 5,0% v/v (French et al.,

2005), concentração cerca de nove vezes menor do que a apresentada pelo mel de Mato Grosso, confirmando a ineficácia desse mel.

O mel artificial não formou zona de inibição bacteriana para nenhum dos microrganismos testados, corroborando com o estudo de Sherlock et al. (2010), em que o mel Manuka e o mel Ulmo inibiram os microrganismos testados largamente mais do que o mel artificial. Hannan et al. (2009) negam o conceito de que o açúcar é o único responsável pela atividade antibacteriana do mel, e afirmam que o efeito antibacteriano do mel natural não está ligado apenas com a alta osmolaridade, pois em seu estudo, o mel artificial inibiu as bactérias testadas em concentrações muito superiores do que os méis naturais.

As bactérias foram sensíveis aos antibióticos comerciais testados, com zona de inibição média de 33,26 mm para *S. aureus*, 27,27 mm para *S. pyogenes*, 22,61 mm para *E. coli*, 22,09 mm para *S. typhimurium* e 24,88 mm para *S. flexneri*.

No trabalho de Alvarez-Suarez et al. (2010) a atividade antimicrobiana do mel de Cuba esteve relacionada à diferenças no perfil de compostos fenólicos e flavonoides (ácido gálico e quercetina, respectivamente), pois os méis que apresentaram maior teor de fenólicos e flavonoides apresentaram maior atividade antimicrobiana. Miguel et al. (2013) associaram a alta atividade antimicrobiana dos méis de Portugal ao alto conteúdo de fenólicos e flavonoides (ácido caféico e quercetina, respectivamente).

Os méis produzidos em outros países podem apresentar atividade antimicrobiana diferente dos méis produzidos no Brasil, mais especificamente dos méis mato-grossenses, pois pode haver grande variação do perfil de componentes terapêuticos (fenólicos e flavonoides) dependendo da sua origem geográfica (Molan, 2002; Estevinho et al., 2012).

Os méis da Amazônia, Cerrado e Pantanal de Mato Grosso precisam ser estudados em busca outros de compostos fenólicos diferente do ácido gálico investigado no presente trabalho, como o ácido protocatecuico, o ácido *p*-hidroxibenzóico, o ácido cafeico, o ácido clorogênico, o ácido vanílico, o ácido *p*-cumárico, o ácido benzóico, o ácido elágico e o ácido cinâmico, identificados no mel de Portugal por Estevinho et al. (2008). Outros flavonoides diferente da

quercetina devem ser investigados no mel de Mato Grosso, como a naringenina, o kaempferol, a apigenina, a pinocembrina e a crisina, identificados no mel por Estevinho et al. (2008). Estes compostos secundários também foram identificados por Yao et al. (2003) e Aljadi & Yusoff (2003), e podem estar associados a atividade antimicrobiana atribuída ao mel.

4 CONCLUSÃO

O Mato Grosso apresenta potencial para produção de mel floral, mas a qualidade físico-química do produto precisa ser adequada, principalmente em relação à sacarose aparente, sólidos insolúveis, cinzas e acidez livre.

Os méis da Amazônia, Cerrado e Pantanal mato-grossenses não são indicados no controle das cepas *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *S. typhimurium* e *S. flexneri*, mas apresentam teores de fenólicos e flavonoides que conferem aos méis potencial antioxidante e prebiótico.

Os méis de cor mais escura apresentam maior o teor de compostos secundários.

Os estudos sobre a presença de compostos fenólicos e flavonoides nos méis de Mato Grosso precisam ser aprofundados, para que outros compostos diferentes de quercetina e ácido gálico possam ser identificados e quantificados.

5 REFERÊNCIAS

- Abadio Finco, F. D. B., Moura, L. L., & Silva, I. G. (2010). Propriedades físicas e químicas do mel de *Apis mellifera* L. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30(3): 706-712.
- Aljadi, A. M., & Yusoff, K. M. (2003). Isolation and identification of phenolic acids in Malaysian honey with antibacterial properties. *Turkish Journal of Medicine and Sciences*, 33, 229–236.
- Alvarez-Suarez, J. M., Tulipani, S., Día, D., Estevez, Y., Romandini, S., Giampieri, F., Damiani, E., Astolfi, P., Bompadre, S., & Battino, M. (2010). Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds.

Food and Chemical Toxicology, 48, 2490-2499.

Alves, E. M., Sereia, M. J., Toledo, V. A. A. S., Marchini, L. C., Neves, C. A., Toledo, T. C. S. O. A., & Anacleto, D. A. (2011). Physicochemical characteristics of organic honey samples of africanized honeybees from Parana River island. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31, 635-639.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. (1990). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, AOAC: Arlington: 500p.

Azeredo, L. C., Azeredo, M. A. A., & Dutra, V. M. L. (2007). Protein contents and physicochemical properties in honey samples of *Apis mellifera* of different floral origins. *Food Chemistry*, 80, 249-254.

Baltrušaitytė, V., Venskutonis, P. R., & Čeksterytė, V. (2007). Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry*, 101(2), 502-514.

Belay, A., Solomon, W. K., Bultossa, G., Adgaba, N., & Melaku, S. (2013). Physicochemical properties of the Harena forest honey, Bale, Ethiopia. *Ethiopia Food Chemistry*, 35, 3386-3392.

Bera, A., & Almeida-Muradian, L. B. (2004). *Composição físico-química e nutricional do mel adicionado com própolis* (Dissertação de mestrado). Universidade de São Paulo, São Paulo.

Bera, A., & Almeida-Muradian, L. B. (2007). Propriedades físico-químicas de amostras comerciais de mel com própolis do estado de São Paulo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(1), 49-52.

Beretta, G., Granata, P., Ferrero, M., Orioli, M., & Facino, R. M. (2005). Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 533, 185–191.

Bertoldi, F. C., Gonzaga, L. V., Fett, R., dos Reis, V. D. A. (2012). Avaliação da atividade antioxidante e determinação de compostos fenólicos totais de méis produzidos no Pantanal. *Evidência, Joaçaba*, 12(2), 155-164.

Blair, S. E., Cokcetin, N. N., Harry, E. J., & Carter, D. A. (2009). The unusual antibacterial activity of medical-grade *Leptospermum* honey: antibacterial

spectrum, resistance and transcriptome analysis. *European Journal of Clinical Microbiology*, 28, 1199-208.

Bogdanov, S., Ruoff, K., & Oddo, L. P. (2004). Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: A review. *Apidologie*, 35, 4–17.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. (2000). *Instrução Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel.* (Normativa nº 11, de 20 de outubro de 2000). Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

CAC. Codex Alimentarius Commission. (1990). *Official methods of analysis*, 3, 15.

Codex Alimentarius Committee on Sugars. (2001) *Codex standard 12*, Revised Codex.

Cooper, R. A., Jenkins, L., Henriques, A. F. M., Duggan, R. S., & Burton, N. F. (2012). Absence of bacterial resistance to medical-grade manuka honey. *European Journal of Clinical Microbiology*, 29, 1237-1241.

Cruvinel, A. R., Silveira, A. R., & Soares, J. S. (2011). Perfil antimicrobiano de *Staphylococcus aureus* isolado de pacientes hospitalizados em UTI no Distrito Federal. *Cenarium Farmacêutico*, 4(4), 1984-3380.

Dallemole, D., Faria, A. M. M., Azevedo-Junior, W. C., & Gomes, V. M. (2010). O arranjo produtivo local da apicultura de Mato Grosso: evolução recente e necessidade de ajustes. *Revista de Estudos Sociais*, 2, 181-197.

Escuredo, O., Silva, L., Valentao, P., Seijo, M. C., & Andrade, P. (2012). Assessing Rubus honey value: Pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity. *Food Chemistry*, 130, 671-678.

Estevinho, L. M., Feás, X., Seijas, J. A., & Vázquez-Tato, M. P. (2012). Organic honey from Trás-Os-Montes region (Portugal): chemical, palynological, microbiological and bioactive compounds characterization. *Food and Chemical Toxicology*, 50(2), 258-264.

Estevinho, L., Pereira, A. P., Moreira, L., Dias, L. G., Pereira, E. (2008). Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3774–3779.

Ferreira, I., Aires, E., Barreira, J. C. M., & Estevinho, L. (2009). Antioxidant

activity of Portuguese honey samples: different contributions of the entire honey and phenolic extract. *Food Chemistry*, 114, 1438-1443.

Ferreira, J. O. (2014). *A influência da cobertura vegetal e do uso da terra dos biomas Amazônia, Cerrado e Pantanal na apicultura no Mato Grosso*. (Dissertação de mestrado). Universidade do Estado de Mato Grosso, Cáceres.

Ferronato, R., Marchesan, E. D., Pezenti, E., Bednarski, F., & Onofre, S. B. (2007). Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D. C. e *Baccharis uncinella* D. C. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(2), 224-230.

French, V. M., Cooper, R. A., & Molan, P. C. (2005). The antibacterial activity of honey against coagulase-negative staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 228–231.

Gomes, S., Dias, G. L., Moreira, L. L., Rodrigues, P., & Estevinho, L. (2010). Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food Chemistry*, 48, 544-548.

Hannan, A., Barkaat, M., Usman, M., Gilani, W. A., & Sami, W. (2009). *In Vitro* Antibacterial Activity of Honey Against Clinical Isolates of Multi-Drug Resistant Typhoidal Salmonellae. *Pakistan Journal of Zoology*, 41(1), 1-6.

IAL, Instituto Adolfo Lutz. (2005). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*, 4^oed., Agência Nacional de Vigilância Sanitária: Brasília.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2013). Retrieved from http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2009/tabelas_pdf/tab26.pdf.

Jenkins, R., Wootton, M., Howe, R., & Cooper, R. (2012). Susceptibility to manuka honey of *Staphylococcus aureus* with varying sensitivities to vancomycin. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(1), 88-9.

Kahraman, T., Buyukunal, S. K., Vural, A., & Altunatmaz, S. S. (2010). Physico-chemical properties in honey from different regions of Turkey. *Food Chemistry*, 123, 41-44.

Khalil, M. I., Alam, N., Moniruzzaman, M., Sulaiman, S. A., & Gan, S. H. (2011). Phenolic acid composition and antioxidant properties of Malaysian honeys. *Journal of Food Science*, 76, C921-C928.

- Küçük, M., Kolaylı, S., Karaoğlu, S., Ulusoy, E., Baltacı, C., & Candan, F. (2007). Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. *Food Chemistry*, 100, 526-534.
- Lacerda, J. J. de J., Santos, J. S., Santos, S. A., Rodrigues, G. B., & Santos, M. L. P. (2010). Influência das características físico-químicas e composição elementar nas cores de méis produzidos por *Apis mellifera* no sudoeste da Bahia utilizando análise multivariada. *Química Nova*, 33, 1022-1026.
- Lanara. (1981). Laboratório Nacional de Referência Animal, *Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes*. II – Métodos físicos e químicos. Mel. Ministério da Agricultura. Brasília: v. 2, p. 1-15.
- Liberato, M. C. T. C., Morais, S. M., Magalhães, C. E. C., Magalhães, I. L., Cavalcanti, D. B., & Silva, M. M. O. (2013). Physicochemical properties and mineral and protein content of honey samples from Ceará State, Northeastern Brazil. *Food Science and Technology*, 33(1), 38-46.
- Longo, L. (2013). *Caracterização da apicultura na Baixada Cuiabana no Pantanal matogrossense*. (Dissertação de mestrado). Universidade do Estado de Mato Grosso, Cáceres.
- Mato Grosso (Estado). (2013). Secretaria de Estado de Planejamento e Coordenação Geral – SEPLAN.
- Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., & Nacoulma, O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91, 571–577.
- Mercês, M. D., Peralta, E. D., & Uetanabaro, A. P. T., Lucchese, A. M. (2013). Atividade antimicrobiana de méis de cinco espécies de abelhas brasileiras sem ferrão. *Ciência Rural*, 43(4), 672-675.
- Mesquita, A. M. R. C., Leal Lima, N., Moreira Lima, A. A. (2009). Avaliação da susceptibilidade e resistência antimicrobiana de cepas de *Shigella* spp. isoladas de pacientes com diarreia nosocomial. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 8(3), 292-300.
- Miguel, M. G., Faleiro, L., Antunes, M. D., Aazza, S., Duarte, J., & Silvério, A. R.

- (2013). Antimicrobial, antiviral and antioxidant activities of “água-mel” from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 136-144.
- Molan, P. (2002). Not all honeys are the same for wound healing. *European Tissue Repair Society*, 9, 5–6.
- NCCLS. (2003). National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*. Wayne: Pennsylvania.
- Ostrosky, E. A., Mizumoto, M. K., Lima, M. E. L., Kaneko, T. M., Nishikawa, S. O., & Freitas, B. R. (2008). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18, 301-307.
- Paulino, R. S., & Marcucci, M. C. (2009). Análises físico químicas de méis do Ceará. *Rev. Pesq. Inov. Farm.*, 1(1), 63-78.
- Pontara, L. P. M., Clemente, E., Oliveira, D. M., Kwiatkowski, A., Rosa, C. I. L. F., & Saia, V. E. (2012). Physicochemical and microbiological characterization of cassava flower honey samples produced by africanized honeybees. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 32(3), 547-552.
- Rizelio, V. M. (2011). *Composição, atividade antioxidante e o uso da eletroforese capilar como alternativa na avaliação da qualidade* (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina.
- Sande, S. O., Crewe, R. M., Raina, S. K., Nicolson, S. W., & Gordon, I. (2009). Proximity to a forest leads to higher honey yield: another reason to conserve. *Biological Conservation*, 142, 2703-2709.
- Sant’ana, L., Sousa, J., Salgueiro, F., Affonso, M. C., & Castro, R. (2012). Characterization of Monofloral Honeys with multivariate analysis of their chemical profile and antioxidant activity. *Journal of Food Science*, 71, C135-C140.
- Santos, D. C., Oliveira, E. N. A., Martins, J. N., & Albuquerque, E. M. B. (2010). Qualidade físico-química e microbiológica do mel de *Apis mellifera* comercializado na cidade de Russas, CE. *Tecnologia e Ciência Agropecuária*, 5, 41-45.
- Scalabrin, R., Buss, G. D., Iamaguchi, K. C. S., Cardoso, C. L., & Garcia, L. B.

- (2003). Isolamento de *Streptococcus pyogenes* em indivíduos com faringoamigdalite e teste de susceptibilidade a antimicrobianos. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 69(6), 814-8.
- Sherlock, O., Dolan, A., Athman, R., Power, A., Gethin, G., Cowman, S., & Humphreys, H. (2010). Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(47), 1–5.
- Silici, S., Sagdic, O., & Ekici, L. (2010). Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys. *Food Chemistry*, 121, 238-243.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. Jr. (1985). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Tessmann, C., Zocche, F., Lima, A. S., Bassani, M., Lopes, G. V., & Padilha da Silva, W. (2008). Ocorrência e perfil de sensibilidade a antibióticos de *Salmonella* spp. isolada em cortes de carne suína comercializados em feiras-livres de Pelotas (RS). *B. CEPPA*, 26(2), 307-313.
- Vilhena, F., & Almeida-Muradian, L. B. (1999). Análises físico-químicas de méis de São Paulo. *Mensagem Doce*, 53, 17-19.
- Voidarou, C., Alexopoulos, A., Plessas, S., Karapanou, A., Mantzourani, I., Stavropoulou, E., Fotou, K., Tzora, A., Skoufos, I., & Bezirtzoglou, E. (2011). Antibacterial activity of different honeys against pathogenic bacteria. *Anaerobe*, 17, 375-379.
- Vorwohl, G. (1964). Die Beziehung zwischen der elektrischen Leitfähigkeit der Honige und ihrer trachmässiger Herkunft. *Ann. de Abeille*, 7(4) 301-309.
- Yao, L., Datta, N., Tomás-Barberán, F. A., Ferreres, F., Martos, I., & Singanusong, R. (2003). Flavonoids, phenolic acids and abscisic acid in Australian and New Zealand Leptospermum honeys. *Food Chemistry* 81, 159–168.
- Zanatta, G. F., Kanashiro, A. M. I., Castro, A. G. M., Cardoso, A. L. S. P., Tessari, E. N. C., & Pulici, S. C. P. (2004). Suscetibilidade de amostras de

Escherichia coli de origem aviária a antimicrobianos. *Arquivos do Instituto Biológico*, 71(3), 283-286.

Zappala, A., Fallico, B., Arena, E., & Verzera, A. (2005). Methods for the determination of HMF in honey: A comparison. *Food Control*, 16(3), 273–277.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO MEL DA AMAZÔNIA, CERRADO E PANTANAL NO CENTRO-OESTE DO BRASIL

[Preparado de acordo com as normas da Revista Food Chemistry]

Resumo:

O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória do mel de alguns municípios da Amazônia, Cerrado e Pantanal de Mato Grosso, Centro-Oeste do Brasil. O mel foi coletado em 6 municípios, totalizando 18 amostras (3 por município). A atividade antioxidante foi avaliada pelos ensaios de DPPH, FRAP e NO, o ácido ascórbico foi usado como padrão. Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados por microdiluição em caldo nas concentrações de 6,25 a 800 µg/mL contra as bactérias *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. flexneri*, *K. pneumoniae*, *H. pylori*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, e os fungos: *C. albicans*, *C. albicans fluconazol-resistente*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. neoformans*, *C. glabrata*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. parasiticus* e *A. terreus*. Os padrões antimicrobianos foram claritromicina, amoxicilina e anfotericina (0,39 a 50 µg/mL). A atividade anti-inflamatória foi avaliada pelo modelo de dermatite tópica por óleo de cróton. Os méis não apresentaram atividade antioxidante para DPPH e FRAP, apenas os méis de Marcelândia, Alta Floresta e N. S. Livramento apresentaram atividade antioxidante para NO (CI50% 485,44 µg/mL). Os méis não apresentaram atividade antimicrobiana, exceto para *H. pylori*, que resultou em até 88% de inibição. O mel de N. S. Livramento apresentou atividade anti-inflamatória significativa em relação ao controle negativo, especialmente o mel puro. O mel de Marcelândia, Alta Floresta e N. S. Livramento possui atividade antioxidante e N. S. Livramento apresenta ainda atividade anti-inflamatória. A atividade antioxidante e anti-inflamatória do mel são características locais, não comuns ao bioma de origem.

Palavra chave: *Helicobacter pylori*, Atividade biológica, Modelo animal.

ANTIOXIDANT, ANTIMICROBIAL AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF HONEYS FROM AMAZON, CERRADO AND PANTANAL IN BRAZIL'S MIDWEST

[Prepared in accordance to the patterns of the Food Chemistry Magazine]

Abstract:

This report's objective was to evaluate the antioxidant, the antimicrobial and the anti-inflammatory activities of the honey produced in some counties in Amazon, Cerrado and Pantanal of Mato Grosso, Brazil's Midwest. The honey was collected in six counties, totaling 18 samples (3 per county). The antioxidant activity was evaluated by DPPH, FRAP and nitric oxide (NO) assays, using ascorbic acid as a pattern. The antimicrobial activity assays were performed by broth microdilution method at concentrations of 6.25 to 800 µg/mL against the bacteria *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. flexneri*, *K. pneumoniae*, *H. pylori*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis* and *S. pyogenes*, and the fungi: *C. albicans*, *C. albicans fluconazol-resistente*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. neoformans*, *C. glabrata*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. parasiticus* and *A. terreus*. The antibacterial patterns used were clarithromycin, amoxicillin and amphotericin (0.39 to 50 µg/mL). In order to evaluate the anti-inflammatory activity, the model of topical dermatitis induced by croton oil was performed. The honeys did not present antioxidant activity to DPPH and FRAP, and only the honeys from Marcelândia, Alta Floresta and N. S. Livramento presented antioxidant activity to NO (IC₅₀ 485.44 µg/mL). The honeys did not present antimicrobial activity, except to *H. pylori*, which resulted in up to 88% of inhibition. The honey from N. S. Livramento presented significant anti-inflammatory activity related to the negative control, especially the pure honey. The honeys from Marcelândia, Alta Floresta and N. S. Livramento have antioxidant activity and the honey from N. S. Livramento also has anti-inflammatory activity. The honey's antioxidant and anti-inflammatory activities are local characteristics and are not common to the biome they are from.

Keyword: *Helicobacter pylori*, Biological activity, Animal model.

1 Introdução

Quase a totalidade do mel de abelhas comercializado no mundo provém de uma única espécie, *Apis mellifera* L. (ENGELSDORP e MEIXNER, 2010). O mel é um produto apícola com grande destaque pelas suas propriedades terapêuticas, como a atividade antioxidante, antibacteriana, antifúngica e anti-inflamatória (SAXENA et al., 2010).

O uso de produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todos os medicamentos de uso clínico no mundo. O interesse por produtos naturais com atividade funcional cresceu nos últimos anos, gerando uma demanda cada vez maior por produtos apícolas (BALTRUŠAITYTĖ et al., 2007).

Produtos naturais ricos em compostos antioxidantes têm despertado grande interesse dos cientistas (AMAROWICZ et al., 2010), como o mel, que é rico em ácidos fenólicos e flavonoides (AL et al., 2009; LACHMAN et al., 2010). Os compostos antioxidantes, identificados em diferentes méis, têm mostrado eficiência na redução do risco de doenças cardíacas, gastrointestinais, câncer, declínio do sistema imune, cataratas, cicatrização de feridas e queimaduras e processos inflamatórios devido à capacidade de capturar radicais livres (LACHMAN et al., 2010).

O papel benéfico do mel é atribuído ainda às suas propriedades antimicrobianas. Estudos recentes indicam que a presença de componentes químicos, como ácidos fenólicos (gálico, ferúlico, cafeico, siríngico, vanílico, dentre outros) e flavonoides (quercetina, rutina, narigenina, crisina, apigenina, dentre outros) é o principal fator determinante da atividade antimicrobiana do mel (ESTEVINHO et al., 2012; MIGUEL et al., 2013; COOPER, 2014).

Evidências indicam que o mel é um imunomodulador benéfico no tratamento da inflamação (TONKS et al., 2003; MESAİK et al., 2008). O mel tem mostrado ação antioxidante contra espécies reativas de oxigênio, tornando-se anti-inflamatório. Isso tem sido atribuído, especialmente, à presença de compostos fenólicos (HENRIQUES et al., 2006; VAN DEN BERG et al., 2008). Experimentos *in vivo* mostraram que a aplicação oral de mel Manuka reduziu a inflamação intestinal e a gastrite induzida por indometacina

em modelos com roedores (MEDHI et al., 2008; PRAKASH et al., 2008).

A utilização do mel e outros produtos naturais foram substituídos por antibióticos sintéticos e/ou semissintéticos (MOLAN et al., 1988). O uso indiscriminado e irracional de antibióticos por mais de 50 anos tem possibilitado a seleção de bactérias a esses medicamentos, caracterizando resistência (HSUEH et al., 2005), além disso, alguns produtos fármacos podem ter efeitos colaterais.

Desta forma, existe a importância de investigar novos compostos com ação terapêutica a partir de diferentes produtos naturais, como o mel, em substituição à terapia antibiótica convencional (GAREDEW et al., 2004). O espectro de bactérias Gram negativas e fungos estudados *in vitro* com mel são restritos e precisa ser ampliado (MANDAL e MANDAL, 2011; AL-WAILI et al., 2011; COOPER, 2014), especialmente quando se trata de méis brasileiros.

A atividade antioxidante e anti-inflamatória do mel brasileiro foi confirmada em estudos recentes no bioma de Mata Atlântica por Borsato et al. (2014) e Salgueiro et al. (2014) e no bioma Caatinga por Paulino e Marcucci (2009). O bioma Pantanal foi estudado por Bertoldi et al. (2012) no estado de Mato Grosso do Sul e a Amazônia no estado do Pará por Oliveira et al. (2012). Entretanto, pouco foi investigado sobre os méis da Amazônia, do Cerrado e do Pantanal de Mato Grosso, indicando a necessidade de ampliar a produção científica sobre esta região de alto potencial para a produção apícola (AMARAL, 2010; FERREIRA et al., 2014).

Logo, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória do mel produzido em alguns municípios da Amazônia, Cerrado e Pantanal de Mato Grosso, Centro-Oeste do Brasil.

2 Material e métodos

2.1 Amostras de mel

O mel de abelha *A. mellifera* foi coletado em seis municípios de Mato Grosso (Figura 1). Um total de 18 amostras foram coletadas durante o estudo, 3 amostras por município.

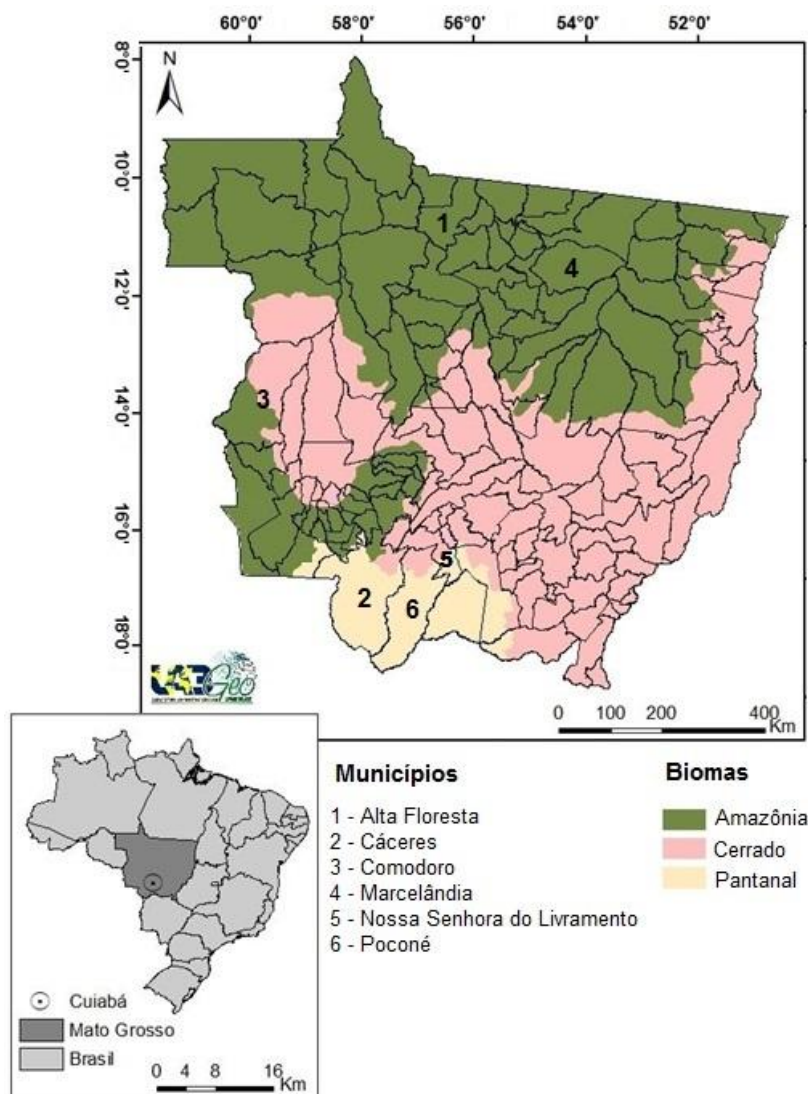


Figura 1. Municípios do estado de Mato Grosso selecionados para coleta do mel, distribuídos por biomas. Elaborado por: Jennifer Oberger Ferreira e Mirian Raquel da Silva Miranda, 2013.

Os municípios foram agrupados dentro do bioma que apresentava predominância da área de ocupação territorial (Tabela 1), utilizando o programa AutoCAD 2013 para isto. Esse critério foi usado devido a quatro dos seis municípios estudados serem ocupados por dois biomas ou mais (Figura 1). Assim, as amostras de mel foram coletas no bioma Amazônico nos municípios de Alta Floresta e Marcelândia, no Cerrado em Comodoro e Nossa Senhora do Livramento e no Pantanal em Cáceres e Poconé.

Esses municípios foram selecionados por serem os maiores produtores

do Estado (IBGE, 2013; FERREIRA, 2014) (Anexo A) ou por fazerem parte de um Arranjo Produtivo Local (CBA, 2013).

Tabela 1. Bioma predominante no município devido à área de ocupação territorial dos biomas Amazônia, Cerrado e Pantanal nos seis municípios selecionados no estudo.

Município	% do bioma no município			Bioma predominante
	Amazônia	Cerrado	Pantanal	
Alta Floresta	100	0,0	0,0	Amazônia
Cáceres	5,93	8,97	85,10	Pantanal
Comodoro	43,88	56,12	0,0	Cerrado
Marcelândia	100	0,0	0,0	Amazônia
N. S. Livramento	0,0	63,95	36,05	Cerrado
Poconé	0,0	15,74	84,26	Pantanal

No Estado de Mato Grosso a Amazônia ocupa 480,215 km² do território e o Pantanal 60,885 km² (IBGE, 2013). O clima da região Amazônica, pela classificação de Köppen, é o clima úmido, sem período de seca prolongado, com chuvas distribuídas ao longo do ano e altas temperaturas (IBGE, 2013).

O Cerrado apresenta vegetação de Savana, com árvores baixas e retorcidas, arbustos, subarbustos ervas e algumas espécies da mata. Ocupa 354,823 km² no Mato Grosso, com mais de 6,5 mil plantas catalogadas. O clima é quente, semiúmido e sazonal, com verão chuvoso e inverno seco (IBGE, 2013).

O Pantanal é composto por espécies vegetais semelhantes à do Cerrado, mas com a presença de partes de florestas úmidas e Amazônica, com nítida separação das estações seca e chuvosa, que se torna inundado no verão devido à depressão do relevo (IBGE, 2013).

Os méis utilizados no estudo são provenientes da safra de 2012/2013, colhidos entre os meses de julho e outubro, adquiridos diretamente com os apicultores, com as amostras armazenadas em frascos âmbar sob refrigeração.

Os experimentos para atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-

inflamatória foram realizados na Faculdade de Medicina, Departamento de Ciências Básicas em Saúde, Área de Farmacologia, Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Cuiabá, Mato Grosso, Brasil.

2.2 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada pelos ensaios de sequestro do radical livre 1,1-diphenil-2-picrilhidrazila (DPPH), captura do radical livre óxido nítrico (NO) e poder redutor do ferro (FRAP).

O sequestro do radical DPPH foi avaliado pelo método de Karki et al. (2011). As amostras de mel foram diluídas em metanol nas concentrações de 6,25 a 800 µg/mL e misturadas a uma solução metanólica do radical DPPH (50 µM) em microplacas de 96 poços. Após 30 minutos, foi realizada a leitura em leitor de microplacas (MULTISKAN) a 540 nm.

O poder redutor do íon férrico (FRAP) foi determinado pelo método desenvolvido por Benzie e Strain (1996) e Moyo et al. (2010). As amostras de mel foram diluídas em metanol 50% nas concentrações de 6,25 a 800 µg/mL e misturadas à solução tampão de fosfato de potássio (0,2 M; pH 7,2) mais ferrocianeto de potássio (1% p/v). Após incubação de 20 min a 50 °C adicionou-se ácido tricloroacético (10% p/v), cloreto férrico (0,1% p/v) e água destilada, seguidos por uma segunda incubação de 30 min à temperatura ambiente no escuro. A absorbância foi lida em leitor de microplacas a 620 nm.

A inibição da produção de nitrito a partir do nitroprussiato de sódio foi avaliada utilizando o método de Sreejayan e Rao (1997) com pequenas modificações. As amostras de mel foram diluídas em etanol nas concentrações de 6,25 a 800 µg/mL misturadas ao nitroprussiato de sódio (5 mM) em PBS em microplaca de 96 poços. Após a incubação de 150 minutos a 25 °C, o reagente de Griess foi adicionado e a leitura foi feita em leitor de microplacas a 540 nm.

O ácido ascórbico (Sigma®) (0,39 a 100 µg/mL) foi utilizado como padrão positivo para os três ensaios. A atividade sequestrante dos radicais foi expressa em CI50% (concentração da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical).

2.3 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana das amostras de mel foi testada contra seis bactérias Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) e *Helicobacter pylori* (ATCC 43504); quatro bactérias Gram positivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615); seis cepas de leveduras: *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida albicans fluconazol-resistente* (ATCC 64550), *Candida glabrata* (ATCC 9030), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32045), e quatro cepas de fungos filamentosos: *Aspergillus fumigatus* (ATCC 46640), *Aspergillus niger* (ATCC 10535), *Aspergillus parasiticus* (ATCC 15517) e *Aspergillus terreus* (ATCC 7860).

A determinação quantitativa das concentrações inibitórias mínimas (CIM) do mel foi realizada pelo método de microdiluição em caldo com meio Muller-Hinton (Himedia) (CLSI, 2012) para cepas bacterianas e fungos. A CIM é a menor concentração de um agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível de um microrganismo após uma noite de incubação. Para *H. pylori*, a atividade antibacteriana ainda foi expressa em porcentagem de inibição microbiana.

O mel foi solubilizado e adicionado ao meio de cultura das placas resultando em concentrações de 6,25 a 800 µg/mL obtidas por meio de diluição seriada. Os inóculos microbianos foram ajustados a 0,5 escala MacFarland, que corresponde a 1×10^8 UFC/mL.

Como drogas padrão de inibição de crescimento microbiano foram usadas clorofenicol (Sigma®) e amoxicilina para as cepas bacterianas Gram negativas (exceto *H. pylori*); claritromicina, polimixina B e ciprofloxacino para as Gram positivas e claritromicina para *H. pylori*. A anfotericina foi utilizada como droga padrão para as cepas de fungos filamentosos e leveduras.

Nas microplacas foram usados poços controle de esterilidade contendo apenas meio com bactérias, e poços somente com o meio, respectivamente.

As microplacas foram incubadas por 24 h a 37 °C, sob agitação constante e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (MULTISKAN, RC/MS/EX, EUA) a 450 nm.

A atividade antibacteriana e antifúngica foi interpretada com base nos parâmetros de Kuete (2010), que classifica como significativa: CIM < 100 µg/mL; moderada: 100 < CIM ≤ 625 µg/mL e fraca: CIM > 625 µg/mL.

2.4 Atividade anti-inflamatória

Uma amostra de mel do município de Nossa Senhora do Livramento foi escolhida para o teste anti-inflamatório *in vivo*, devido ao critério de seleção de um mel com a maior concentração de compostos secundários (fenólicos e flavonoides) e a menor atividade antioxidante do óxido nítrico, em que se aplicou a equação da soma dos teores dos compostos secundários dividido pelo CI50% do NO:

$$Mel = (fla + fen)/NO$$

Onde:

Mel = amostra de mel selecionada;

fla = teor de flavonoides totais;

fen = teor de fenólicos totais;

NO = CI50% para atividade antioxidante do óxido nítrico.

Esta amostra selecionada apresentou maior atividade antioxidante para captura do radical óxido nítrico e maior conteúdo de fenólicos e flavonoides totais (FRANZ, 2014, no prole) que as demais amostras de mel deste trabalho.

A atividade anti-inflamatória do mel de N. S. Livramento foi avaliada pelo teste de dermatite tópica por óleo de cróton, segundo Swingle et al. (1981). Camundongos albinos *Mus musculus*, variedade Swiss-Webster, com peso entre 28 - 30 g foram divididos em cinco grupos de tratamento: i) veículo (água destilada); ii) mel a 50 mg/mL; iii) mel a 200 mg/mL; iv) mel puro; v) dexametasona a 0,25 mg/mL. Os animais dos grupos foram tratados topicamente, em cada uma das orelhas, com 20 µL do respectivo tratamento. Após 30 min, cada animal recebeu na face interna da orelha direita 20 µL de óleo de cróton em acetona a 10 mg/mL, e na orelha esquerda igual volume de

acetona.

Após 6 h da aplicação do agente irritante, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, ambas as orelhas foram extirpadas na base (diâmetro de 6 mm) e pesadas em balança analítica. A extensão do edema foi expressa em termos da diferença de peso entre a orelha edemaciada e a orelha tratada com veículo (acetona) (SWINGLE et al., 1981).

O experimento com animais foi realizado após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMT), conforme processo nº. 23108.033074/14-9.

2.5 Análise estatística

Para testar a atividade antioxidante foi usada a análise de variância (Anova), o modelo estatístico foi composto pela variável dependente atividade sequestrante dos radicais (CI50%) para DPPH e a variável independente a origem dos municípios do mel, com seis níveis. As médias entre as origens dos municípios foram comparadas por meio do teste de médias de Tukey ao nível mínimo de significância estatística de $p < 0,05$. O mesmo modelo estatístico foi usado para comparar CI50% do FRAP e CI50% do NO com as origens dos méis, totalizando três modelos estatísticos para atividade antioxidante.

Os modelos estatísticos da atividade antioxidante foram simplificados para testar a origem do mel em função do bioma, com três níveis: Amazônia, Cerrado e Pantanal. A distribuição de erros Normal foi usada para os testes estatísticos da atividade antioxidante.

A atividade antimicrobiana foi determinada para cada microrganismo quanto a CIM (concentração inibitória mínima) usando uma regressão linear para dose-resposta em função da densidade ótica da concentração do mel.

Para testar a inibição do mel sobre a bactéria *H. pylori* foi usada uma Anova em que o modelo estatístico foi composto pela porcentagem de inibição da bactéria *H. pylori* como variável dependente em função do município de origem do mel como variável independente, com seis níveis, seguida do teste de médias de Tukey ao nível mínimo de significância estatística de $p < 0,05$. A distribuição de erros foi Normal. O modelo foi simplificado para testar a inibição

do mel em função do bioma de origem, com três níveis (Amazônia, Cerrado e Pantanal).

Os dados referentes à ação antioxidante e inibição do mel sobre *H. pylori* foram submetidos à análise de correlação de Pearson. O modelo estatístico para análise de correlação comparou a ação antioxidante do mel para óxido nítrico e porcentagem de inibição sobre *H. pylori*. A correlação de Pearson é indicada para dados de distribuição de erros Normal.

Para determinar a atividade anti-inflamatória do mel foi usada uma análise de variância (Anova), o modelo estatístico testado foi composto pela diferença do peso das orelhas dos camundongos como variável dependente e pelos tratamentos recebidos pelos animais como variável independente (5 níveis). As médias foram comparadas pelo teste de comparações múltiplas Newman-Keuls, que usa diferentes valores críticos para cada par de comparações de média, considerado mais poderoso e menos conservador que o teste de Tukey (ABDI e WILLIAMS, 2010). O programa GraphPad Prism (version 5.01) foi usado para essa análise.

Todas as outras análises estatísticas foram realizadas no programa R (R version 3.0.3, 2014). O teste de Shapiro-Wilk foi usado para verificar o ajuste da distribuição de erros Normal.

3 Resultados e discussão

3.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante expressa pelo CI50% foi maior que 1000 µg/mL para os méis de Mato Grosso para DPPH e FRAP (Tabela 2). Para a captura do radical óxido nítrico (NO) o CI50% foi maior que 1000 µg/mL para os municípios Cáceres, Poconé e Comodoro. Entretanto, para os méis de Marcelândia, Alta Floresta e Nossa Senhora do Livramento, o CI50% para NO variou de 328,49 a 784,48 µg/mL. Apesar de quanto menor o CI50% maior a atividade antioxidante, a origem do mel não explica atividade antioxidante para NO ($p=0,44$).

Omisore et al. (2005) consideram o ponto crítico para atividade antioxidante como 50 µg/mL. Compostos com CI50% < 50 µg/mL são

classificados com alta atividade antioxidante; compostos com CI50% entre 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ são classificados com atividade antioxidante moderada e compostos com CI50% > 100 $\mu\text{g/mL}$ são classificados com baixa atividade antioxidante.

Assim, o CI50% dos méis dos diferentes municípios de Mato Grosso não foi comparado entre si nos métodos DPPH e FRAP, pois este valor está muito acima do que é considerado de interesse farmacológico.

Tabela 2. Atividade antioxidante do mel de *Apis mellifera* pelo sequestro do radical livre DPPH, pela captura do radical livre óxido nítrico (NO) e pelo poder redutor do ferro (FRAP), Mato Grosso, Brasil, 2014.

Origem das amostras	[...] CI50% \pm SDM ($\mu\text{g/mL}$)		
	DPPH	FRAP	NO*
Cáceres	> 1000	> 1000	> 1000
Comodoro	> 1000	> 1000	> 1000
Poconé	> 1000	> 1000	> 1000
Marcelândia	> 1000	> 1000	542,00 \pm 209,25
Alta Floresta	> 1000	> 1000	395,96 \pm 86,77
N. S. Livramento	> 1000	> 1000	518,37 \pm 94,40
Ácido ascórbico	0,47 \pm 0,01	12,27 \pm 0,01	13,11 \pm 0,01

*Não significativo pelo teste F ao nível de 5%.

No mel de Portugal Miguel et al. (2013) encontraram maior atividade antioxidante de CI50% de 2603 $\mu\text{g/mL}$, valor consideravelmente superior ao que foi mensurado para os méis de Marcelândia, Alta Floresta e Nossa Senhora do Livramento.

Eles afirmam que esses méis que apresentam atividade contra o radical óxido nítrico podem contribuir para a saúde humana, especialmente em um efeito anti-inflamatório, devido a neutralização da formação de NO no corpo humano. Levando em conta essa diferença na atividade antioxidante, existe a possibilidade dos méis do Mato Grosso e de Portugal apresentarem diferente potencial antimicrobiano.

3.2 Atividade antimicrobiana

O mel de Mato Grosso apresentou CIM maior que 800 µg/mL para todas as bactérias Gram positivas e Gram negativas estudadas (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. flexneri*, *H. pylori*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. pyogenes* e *S. epidermidis*) (Tabela 3), o que indica que o mel não possui atividade antibacteriana. A CIM dos méis dos diferentes municípios não foi comparada entre si, pois este valor está muito acima do que é considerado de interesse farmacológico. As bactérias foram sensíveis aos antibióticos testados, com CIM entre 0,39 e 6,25 µg/mL (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade antibacteriana do mel de *Apis mellifera* pelo método da microdiluição em caldo, Mato Grosso, Brasil, 2014.

Tratamentos	Concentração mínima inibitória (µg/mL)									
	Bactérias									
	G (-)						G (+)			
	<i>Ec</i>	<i>Kp</i>	<i>Pa</i>	<i>St</i>	<i>Sf</i>	<i>Hp</i>	<i>Ef</i>	<i>Sa</i>	<i>Sp</i>	<i>Se</i>
Mel	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloranfenicol*	[Redacted]						1,56	1,56	1,56	1,56
Amoxicilina*	[Redacted]						0,39	0,39	0,39	0,39
Claritromicina*	0,39	0,39	6,25	0,78	0,78	0,39	[Redacted]			
Polimixina*	0,39	0,39	3,15	0,39	0,39	[Redacted]				
Ciprofloxacina*	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	[Redacted]				

Legenda: (-) CIM > 800 µg/mL; *Ec*: *Escherichia coli*; *Kp*: *Klebsiella pneumoniae*; *Pa*: *Pseudomonas aeruginosa*; *St*: *Salmonella typhimurium*; *Sf*: *Shigella flexneri*; *Hp*: *Helicobacter pylori*; *Ef*: *Enterococcus faecalis*; *Sa*: *Staphylococcus aureus*; *Sp*: *Streptococcus pyogenes*; *Se*: *Staphylococcus epidermidis*.

*Padrão (0,39 - 50 µg/mL).

A atividade antibacteriana e antifúngica foi interpretada com base nos parâmetros de Kuete (2010), que classifica como significativa: CIM < 100 µg/mL; moderada: 100 < CIM ≤ 625 µg/mL e fraca: CIM > 625 µg/mL. Da

mesma forma, Holetz et al. (2002) dão importância a baixas concentrações: boa atividade quando CIM < 100 µg/mL; atividade moderada quando CIM está entre 100 e 500 µg/mL; atividade fraca quando CIM está entre 500 e 1000 µg/mL e agente inativo quando a CIM > 1000 µg/mL.

Os méis produzidos em regiões distintas podem apresentar atividade antimicrobiana diferente, pois pode haver grande variação do perfil de componentes terapêuticos (fenólicos e flavonoides) dependendo da sua origem geográfica, levando a uma variação de até 100 vezes na potência antimicrobiana (MOLAN, 2002; ESTEVINHO et al., 2012).

Bazoni (2012) evidenciou essa variação no potencial antimicrobiano quando testou a atividade de méis de São Paulo e do Rio Grande do Norte contra *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* e encontrou diferenças na suscetibilidade dos microrganismos frente à atividade dos diferentes méis. Através da análise do perfil químico das suas amostras, alguns íons nos méis estudados foram identificados como flavonoides ou substâncias características da planta de origem do mel, como por exemplo, o ácido anacárdio no mel de caju.

O CIM dos méis para leveduras (*C. albicans*, *C. albicans* fluconazol-resistente, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. neoformans*, *C. glabrata*) foi maior que 800 µg/mL (Tabela 4), o que indica que o mel não tem atividade antifúngica segundo Keute (2010) e Holetz et al. (2002). A CIM dos méis dos diferentes municípios não foi comparada entre si, pois este valor está muito acima do que é considerado de interesse farmacológico. As leveduras foram sensíveis ao padrão (anfotericina) com CIM entre 0,39 e 12,5 µg/mL (Tabela 4).

O mel da República do Maurício, África, foi ativo contra *C. albicans* (DOR e MAHOMOODALLY, 2014) e o mel do Irã foi ativo contra *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* em concentrações muito maiores do que as testadas no presente trabalho (KATIRAEI et al., 2013). Entretanto, Bazoni (2012) não obteve êxito no combate a leveduras utilizando méis de São Paulo e do Rio Grande do Norte, assim como Cruz et al. (2014) não encontraram atividade antifúngica para amostras de mel da Amazônia contra *C. albicans*, mesmo em altas concentrações.

Tabela 4. Atividade antifúngica do mel de *Apis mellifera* contra leveduras pelo método da microdiluição em caldo, Mato grosso, Brasil, 2014.

Tratamentos	Concentração mínima inibitória (µg/mL)					
	Leveduras					
	<i>Ca1</i>	<i>Ca6</i>	<i>Cp</i>	<i>Ct</i>	<i>Cn</i>	<i>Cg</i>
Mel	-	-	-	-	-	-
Anfotericina (0,39 – 50 µg/mL)	0,39	3,12	0,78	0,39	3,12	12,5

Legenda: (-) CIM > 800 µg/mL; *Ca1*: *Candida albicans*; *Ca6*: *Candida albicans* fluconazol-resistente; *Cp*: *Candida parapsilosis*; *Ct*: *Candida tropicalis*; *Cn*: *Cryptococcus neoformans*; *Cg*: *Candida glabrata*.

O mel da África apresentou teor do fenólico ácido gálico superior ao mel de Mato Grosso (média de 65,7 e 37,7 mg de EAG/100 g de mel, respectivamente). Altos teores do flavonoide rutina foram quantificados no mel da África (média 8,17 mg de RE/100 g de mel), diferente do mel de Mato Grosso que apresentou baixos teores de quercetina (média 0,27 mg de QE/100g de mel). Logo, a atividade antifúngica pode estar ligada a outros flavonoides, como a rutina, que não foram quantificados no mel de Mato Grosso.

O mel da Amazônia, Cerrado e Pantanal de Mato Grosso não apresentou atividade antifúngica para os fungos filamentosos (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. parasiticus*, *A. terreus*), pois a concentração inibitória mínima para estas cepas foi maior que 800 µg/mL (Tabela 5). A CIM dos méis dos diferentes municípios não foi comparada entre si, pois este valor está muito acima do que é considerado de interesse farmacológico. O padrão (anfotericina) foi eficiente para todas as cepas de fungos avaliadas, que resultou em CIM de 0,39 µg/mL (Tabela 5).

O mel da República do Maurício, África, também não apresentou atividade contra *A. niger* (DOR e MAHOMOODALLY, 2014), mesmo tendo apresentado teores de fenólicos superiores e flavonoides diferentes que os méis de Mato Grosso. O mel da Algeria e do Irã foram ativos contra *Aspergillus niger* em concentrações muito maiores do que as testadas no presente trabalho

(BOUKRAA et al., 2008; KATIRAEI et al., 2013).

Tabela 5. Atividade antifúngica do mel de *Apis mellifera* contra fungos filamentosos pelo método da microdiluição em caldo, Mato Grosso, Brasil, 2014.

Tratamentos	Concentração mínima inibitória (µg/mL)			
	Fungos filamentosos			
	<i>Af</i>	<i>An</i>	<i>Ap</i>	<i>At</i>
Mel	-	-	-	-
Anfotericina (0,39 – 50 µg/mL)	0,39	0,39	0,39	0,39

Legenda: (-) CIM > 800 µg/mL; *Af*: *Aspergillus fumigatus*; *An*: *Aspergillus niger*; *Ap*: *Aspergillus parasiticus*; *At*: *Aspergillus terreus*.

As amostras de mel não alcançaram inibição de 90% para *H. pylori* para ser considerado CIM. Apesar disso, o mel promoveu a inibição de *H. pylori* em até 88% na concentração de 0,1 µg/mL (concentração muito baixa), semelhante ao padrão (claritromicina), que na mesma concentração inibiu $91,50 \pm 9,84\%$ (Tabela 6).

Tabela 6. Atividade antibacteriana do mel de *Apis mellifera* contra *Helicobacter pylori*, expressa em porcentagem de inibição, Mato Grosso, Brasil, 2014.

Bioma de origem do mel	% de inibição (1 µg/mL de mel)*
Amazônia	$82,33 \pm 4,58^a$
Cerrado	$71,50 \pm 8,68^b$
Pantanal	$60,33 \pm 7,39^c$
Claritromicina (0,1 µg/mL)	$91,50 \pm 9,84$

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($P < 0,05$).

A atividade de inibição dos méis sobre *H. pylori* diferiu ao nível de 5% entre os biomas Amazônia, Cerrado e Pantanal (Tabela 6), com maior potencial de inibição na Amazônia e menor no Pantanal. Isso indica que o bioma pode

influenciar ou ser um fator determinante do potencial antimicrobiano do mel contra *H. pylori*.

Manyi-Loh et al. (2012) testaram um extrato de mel da África a 5 mg/mL e encontraram inibição contra *H. pylori* acima de 90%. O mel da Arábia Saudita a uma concentração de 20% inibiu isolados de *H. pylori* (ALI et al., 1991). Essas concentrações são consideravelmente maiores do que a concentração apresentada neste trabalho, entretanto apresentaram aproximadamente a mesma inibição. Não foram encontrados estudos testando a ação inibitória de méis brasileiros contra *H. pylori*, o presente trabalho foi pioneiro no Brasil.

A descoberta da *H. pylori* como fator causador de úlceras pépticas fez crescer o interesse pela atividade antimicrobiana do mel. Estudos revelam que o mel tem uma atividade antibacteriana de nível médio em relação a essa bactéria, e sua ação é devido aos fitoquímicos presentes no mel (ESTEVINHO et al., 2012; MIGUEL et al., 2013).

O consumo diário do mel em pequenas quantidades pode reduzir a população de *H. pylori* e controlar problemas de gastrite, úlceras e câncer de estômago. Estudo pré-clínico deve ser desenvolvido para testar a atividade do mel no combate dessas doenças.

A inibição da bactéria *H. pylori* não foi correlacionada com a atividade antioxidante pelo modelo de sequestro do radical livre óxido nítrico (NO) ($r=-0,41$; $p=0,26$), podendo ser atribuída a outros radicais não explorados.

Os municípios do bioma Amazônia, que apresentaram inibição de *H. pylori* mais próxima do CIM (90%), Marcelândia ($x=81\%$) e Alta Floresta ($x=83\%$), apresentaram atividade antioxidante para NO (Tabela 2), apesar da ausência da correlação.

3.3 Atividade anti-inflamatória

O mel de Nossa Senhora do Livramento tem atividade anti-inflamatória, pois houve diferença entre o peso das orelhas dos camundongos nos tratamentos com mel e no veículo (água) (Figura 2). As concentrações de mel a 5% (50 mg/mL) e 20% (200 mg/mL) apresentam menor atividade anti-inflamatória comparadas ao veículo ($p<0,05$), enquanto o mel puro (100%) e a

dexametasona (10 mg/mL) apresentam maior atividade anti-inflamatória em relação ao veículo ($p < 0,0001$).

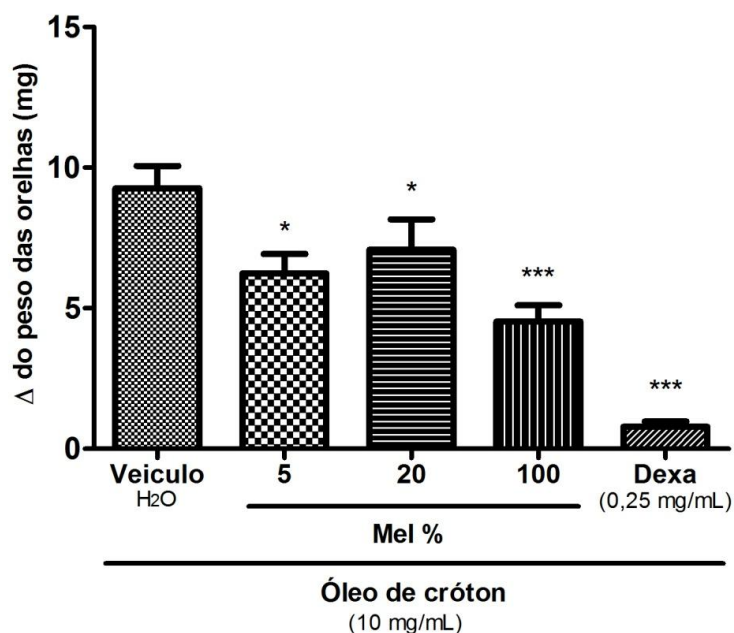


Figura 2. Atividade anti-inflamatória do mel do Cerrado de Mato Grosso, Brasil, e dexametasona (Dexa) administrados topicamente sob edema de orelha induzido por óleo de cróton. Cada barra representa a média \pm DP de 8 animais. * $P < 0,05$; *** $P < 0,0001$ vs. Veículo pelo teste de Newman-Keuls.

A dexametasona reduziu a inflamação em quase 100% e diferenciou-se significativamente de todos os outros tratamentos ($p < 0,0001$). O tratamento com mel puro diferenciou-se do tratamento com mel a 20% ($p < 0,05$), mas o tratamento com mel a 5% não se diferenciou dos tratamentos com mel puro e mel a 20% ($p > 0,05$).

O extrato de mel de abelhas sem ferrão do Paraná apresentou atividade anti-inflamatória no modelo de edema de orelha (BORSATO et al., 2014), assim como o mel puro de abelhas indígenas da Nova Zelândia (LEONG et al., 2011). Essas amostras foram consideradas de importância relevante para o tratamento tópico da inflamação aguda, assim como pode ser considerada a amostra de Nossa Senhora do Livramento, que apresentou resultado semelhante, com destaque para a aplicação do mel puro.

Nossa Senhora do Livramento é o único dos municípios estudados que a composição vegetal predomina o Cerrado e com parte do bioma Pantanal, formando um ambiente diferente dos demais. Cáceres, apesar de possuir na sua composição vegetal Cerrado e Pantanal, predomina o Pantanal. Além disso, esse município possui a segunda maior área de mata entre os municípios estudados, e a terceira maior área de pastagem degradada (Apêndice A). Ferreira (2014) concluiu que a presença destas duas formações vegetais é de extrema importância e favorecem a produção apícola de qualidade.

4 Conclusão

O mel de Mato Grosso não apresenta atividade antimicrobiana contra as bactérias, leveduras e fungos testados, com exceção da *Helicobacter pylori*, que foi sensível ao mel em baixíssima concentração, possibilitando o uso profilático do mel.

O mel de Marcelândia, Alta Floresta e Nossa Senhora do Livramento apresenta ação antioxidante na neutralização da formação do óxido nítrico. Isso indicou que a atividade antioxidante do mel é uma característica associada ao local e não ao bioma de origem.

O mel de Nossa Senhora do Livramento apresentou efeito anti-inflamatório tópico, especialmente quando aplicado puro, como costuma ser utilizado pela na medicina popular.

5 Referências

- Abdi, H., & Williams, L. J. (2010). Newman-Keuls Test and Tukey Test. *Encyclopedia of Research Design*, [s.i.],[s.n.].
- Al, M. L., Daniel, D., Moise, A., Bobis, O., Laslo, L., & Bogdanov, S. (2009). Physicochemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania. *Food Chemistry*, 112, 863–867.
- Ali, A., Chowdhury, M., & Al Humayyd, M. (1991). Inhibitory effect of natural honey on *Helicobacter pylori*. *Trop Gastroenterol*, 12, 139–143.
- Al-Waili, N. S., Salom, K., Butler, G., & Ghamdi, A. A. (2011). Honey and

Microbial Infections: A Review Supporting the Use of Honey for Microbial Control. *Journal of Medicinal Food*, 14(10), 1079–1096.

Amaral, A. M. (2010). *Arranjo produtivo local e apicultura como estratégias para o desenvolvimento do sudoeste de Mato Grosso*. (Tese de Doutorado). Universidade de São Carlos, São Carlos.

Amarowicz, R., Estrella, I., Hernandez, T., Robredo, S., Troszynska, A., & Pegg, A. K. R. B. (2010). Free radical-scavenging capacity, antioxidant activity, and phenolic composition of green lentil (*Lens culinaris*). *Food Chemistry*, 3, 705–711.

Baltrušaitytė, V., Venskutonis, P. R., & Čeksterytė, V. (2007). Radical scavenging activity of different floral origin honey and beebread phenolic extracts. *Food Chemistry*, 101, 502-514.

Bazoni, M. O. (2012). Atividade antimicrobiana dos méis produzidos por *Apis mellifera* e abelhas sem ferrão nativas do Brasil. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo.

Benzie, I. F. F., & Strain J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.

Bertoldi, F. C., Gonzaga, L. V., Fett, R., dos Reis, V. D. A. (2012). Avaliação da atividade antioxidante e determinação de compostos fenólicos totais de méis produzidos no Pantanal. *Evidência, Joaçaba*, 12(2), 155-164.

Borsato, D. M., Prudente, A. S., Doll-Boscardin, P. M., Borsato, A.V., Luz, C. F. P., Maia, B. H. L. N. S., Cabrini, D. A., Otuki, M. F., Miguel, M. D., Farago, P. V., & Miguel, O. G. (2014). Topical anti-inflammatory activity of a monofloral honey of *Mimosa scabrella* provided by *Melipona marginata* during winter in southern Brazil. *Journal of Medicinal Food*, 17, 817–825.

Boukraa, L., Benbarek, H., & Moussa, A. (2008). Synergistic action of starch and honey against *Candida albicans* in correlation with diastase number. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 40-43.

CBA. Confederação Brasileira de Apicultura, 2013. Disponível em: <http://www.brasilapicola.com.br>. Acesso em: 15/06/2013.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-

Second Informational Supplement. 9. ed. [S.I.]: [s.n.], 2012.

Cooper, R. (2014). Honey as an effective antimicrobial treatment for chronic wounds: is there a place for it in modern medicine? *Chronic Wound Care Management and Research*, 1, 15-22.

Cruz, C. B. N., Pieri, F. A., Carvalho-Zilse, G. A., Orlandi, P. P., Nunes-Silva, C. G., & Leomil, L. (2014). Antimicrobial activity of honeys from two stingless honeybee species and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) against pathogenic microorganisms. *Acta Amazonica*, 44, 287–290.

Dor, G. O. L. M., & Mahomoodally, M. F. (2014). Chemical profile and in vitro bioactivity of tropical honey from Mauritius. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, S1002-S1013.

Engelsdorp D. van, & Meixner M. D. (2010.) A historical review of managed honey bee populations in Europe and the United States and the factors that may affect them. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 580– 595.

Estevinho, L. M., Feás, X., Seijas, J. A., & Vázquez-Tato, M. P. (2012). Organic honey from Trás-Os-Montes region (Portugal): chemical, palynological, microbiological and bioactive compounds characterization. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 258-264.

Ferreira, J. O. (2014). *A influência da cobertura vegetal e do uso da terra dos biomas Amazônia, Cerrado e Pantanal na apicultura no Mato Grosso*. (Dissertação de mestrado). Universidade do Estado de Mato Grosso, Cáceres.

Garedew, A., Schmolz, E., & Lamprecht, I. (2004). Microcalorimetric investigation on the antimicrobial activity of honeyof the stingless bee *Trigona spp.* and comparison of some parameters with those obtained with standard methods. *Thermochimica Acta*, 415, 99-106.

Henriques, A., Jackson, S., Cooper, R., & Burton, N. (2006). Free radical production and quenching in honeys with wound healing potential. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58, 773–777.

Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Cortez, D. A. G., Nakamura, C. V., & Filho, B. P. D. (2002). Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97.

Hsueh, P., Chen, W., & Luh, K. (2005). Relationships between antimicrobial use and antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria causing nosocomial infections from 1991-2003 at a university hospital in Taiwan. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26, 463-472.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2013). URL http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2009/tabelas_pdf/tab26.pdf. Accessed 21.10.2014.

Karki, R., Sahi, N., Jeon, E. R., Park, Y. S., & Kim, D. W. (2011). Chungtaejeon, a Korean Fermented Tea, Scavenges Oxidation and Inhibits Cytokine Induced Proliferation and Migration of Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66, 27-33.

Katiraei, F., Mahmodi, R., Mardani, K., & Babaei, E. (2013). Antifungal activity of Iranian honeybees against *Candida*, *Aspergillus* species and *Trichophyton rubrum* farzad. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(5), 2078–2082.

Kuete, V. (2010). Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: A Review. *Planta Medica*, 76, 1479-1491.

Lachman, J., Orsak, M., Hejtmankova, L., & Kovarova, E. (2010). Evaluation of antioxidant activity and total phenolics of selected Czech honeys. *LWT – Food Science and Technology*, 43, 52–58.

Leong, A. G., Herst, P. M., & Harper, J. L. (2011). Indigenous New Zealand honeys exhibit multiple anti-inflammatory activities. *Innate Immunity*, 18, 459–466.

Mandal, M. D., & Mandal, S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 154-160.

Manyi-Loh, C. E., Clarke, A. M., & Ndip, R. N. (2012). Detection of phytoconstituents in column fractions of n-hexane extract of Goldcrest Honey exhibiting anti-*Helicobacter pylori* activity. *Archives of Medical Research*, 43, 197-204.

Medhi, B., Prakash, A., Avti, P. K., Saikia, U. N., Pandhi, P., & Khanduja, K. L. (2008). Effect of Manuka honey and sulfasalazine in combination to promote antioxidant defense system in experimentally induced ulcerative colitis model in

- rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 46, 583–590.
- Mesaik, M. A., Azim, M. K., & Mohiuddin, S. (2008). Honey modulates oxidative burst of professional phagocytes. *Phytother Research*, 22, 1404–1408.
- Miguel, M. G., Faleiro, L., Antunes, M. D., Aazza, S., Duarte, J., & Silvério, A. R. (2013). Antimicrobial, antiviral and antioxidant activities of “água-mel” from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 56, 136-144.
- Molan, P. (2002). Not all honeys are the same for wound healing. *European Tissue Repair Society*, 9, 5–6.
- Molan, P. C., Smith, I. M., & Reid, G. M. (1988). A comparison of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *Journal of Apicultural Research*, 27, 252-256.
- Moyo, M., Ndhlala, A. R., Finnie, J. F., & Staden, J. van. (2010). Phenolic composition, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Sclerocarya birrea* and *Harpephyllum caffrum* (Anacardiaceae) extracts. *Food Chemistry*, 123, 69–76.
- Oliveira, P. S., Müller, R. C. S., Dantas, K. G. F., & Alves, C. N. (2012). Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) e *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. *Química Nova*, 35(9), 1728-1732.
- Omisore, N. O. A., Adewunmi, C. O., Iwalewa, E. O., Ngadjui, B. T., Adenowo, T. K., Abegaz, B. M., Ojewole, J. A., & Watchueng, J. (2005). Antitrichomonal and antioxidant activities of *Dorstenia barteri* and *Dorstenia convexa*. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*, 38, 1087–1094.
- Paulino, R. S., & Marcucci, M. C. (2009). Análises físico químicas de méis do Ceará. *Rev. Pesq. Inov. Farm.*, 1(1), 63-78.
- Prakash, A., Medhi, B., Avti, P. K., Saikia, U. N., Pandhi, P., & Khanduja, K. L. (2008). Effect of different doses of Manuka honey in experimentally induced inflammatory bowel disease in rats. *Phytother Research*, 22, 1511–1519.
- Salgueiro, F. B., Lira, A. F., Rumjanek, V. M., & Castro, R. N. (2014). Phenolic composition and antioxidant properties of brazilian honeys. *Química Nova*, 37(5), 821-826.
- Saxena, S., Gautam, S., & Sharma, A. (2010). Physical, biochemical and

antioxidant properties of some Indian honeys. *Food Chemistry*, 118, 391–397.

Sreejayan, & Rao, M. N. A. (1997). Nitric oxide scavenging by curcuminoids. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49, 1997.

Swingle, K. F., Reiter, M. J., & Schwartzmiller, D. H. (1981). Comparison of croton oil and cantharidin induced inflammations of the mouse ear and their modification by topically applied drugs. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, 254, 168-176.

Tonks, A. J., Cooper, R. A., Jones, K. P., Blair, S., Parton, J., & Tonks, A. (2003). Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. *Cytokine*, 21, 242–247.

Van den Berg, A. J. J., van den Worm, E., van Ufford, H. C. Q., Halkes, S. B. A., Hoekstra, M. J., & Beukelman, C. J. (2008). An in vitro examination of the antioxidant and anti-inflammatory properties of buckwheat honey. *Journal Wound Care*, 17, 172–174.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Mato Grosso, com seus três biomas, possui potencial para produção de mel floral com diferentes características organolépticas. Entretanto, percebeu-se que as características físico-químicas que estiveram fora do padrão nacional e/ou internacional podem estar relacionadas à colheita, processamento e armazenamento do mel. Desta forma, faz-se necessária a adequação das práticas de manejo e treinamento dos apicultores.

O mel de Mato Grosso não apresentou atividade antimicrobiana contra os fungos e as bactérias testadas, com exceção da *Helicobacter pylori*, que foi sensível ao mel em baixíssima concentração. Sendo assim, o consumo diário de mel, além de fornecer ao organismo um alimento completo, com ampla gama de nutrientes, poderá ajudar na prevenção de gastrite, úlceras e câncer de estômago uma vez que auxiliará na eliminação da bactéria causadora destes problemas. Um estudo pré-clínico deve ser desenvolvido para testar a atividade do mel *in vivo* no controle dessas doenças.

As amostras de mel de Marcelândia, Alta Floresta (bioma Amazônia) e Nossa Senhora do Livramento (bioma Cerrado) apresentam importante ação antioxidante na neutralização da formação do óxido nítrico, que pode prevenir inflamação e outros efeitos nocivos deste radical no corpo humano. Além disso, o mel de Nossa Senhora do Livramento apresentou efeito anti-inflamatório tópico, especialmente quando aplicado puro, como costuma ser utilizado pela na medicina popular.

Os teores de fenólicos e flavonoides quantificados nas amostras conferem a algumas amostras de mel potencial antioxidante. Os méis mais escuros apresentaram maior o teor de compostos secundários. A presença de outros compostos fenólicos e flavonoides (como o ácido cafeico, o ácido vanílico, a apigenina, a crisina e outros) precisa ser investigada nos méis mato-grossenses, para que estes compostos possam ser identificados e quantificados, em busca de méis com maior atividade biológica.

A origem geográfica influenciou o teor de compostos secundários. Os municípios que apresentaram os maiores teores foram Marcelândia, N. S.

Livramento e Poconé. Dois dos três municípios que apresentaram atividade antioxidante para óxido nítrico estão entre os municípios com os maiores teores de compostos secundários. Os dois municípios do bioma Amazônico, que apresentou melhor atividade contra *H. pylori*, também apresentaram atividade antioxidante contra óxido nítrico. Para esta atividade antibacteriana, o bioma foi o fator determinante. Logo, o potencial antioxidante, antibacteriano e o teor de compostos secundários parecem ser dependentes, incitando a busca por méis que apresentem maior concentração de compostos secundários.

O presente trabalho contribui com a linha de pesquisa Uso sustentável e conservação da biodiversidade do Pantanal, Amazônia e Cerrado, pois a comprovação do uso do mel como agente antioxidante, antibacteriano para *H. pylori* e anti-inflamatório atribui ainda mais valor ao uso e consumo do mel. A valorização do mel incentiva o aumento da produção e fortalece os arranjos produtivos locais em apicultura no Mato Grosso, ampliando as áreas voltadas para a apicultura, atividade que favorece a conservação ambiental além dos benefícios econômicos e sociais.

APÊNDICES

Apêndice A: Tabela 1: Vegetação encontrada nos municípios do estudo.

Município	LA ha (%)	MA ha (%)	PN ha (%)	PD ha (%)	PP ha (%)
Alta Floresta	740.452 (58,59)	238.684 (18,88)	4.242 (0,33)	13.377 (1,05)	266.983 (21,12)
Cáceres	21.254 (1,84)	308.293 (26,77)	424.078 (36,83)	22.172 (1,92)	375.536 (32,61)
Comodoro	1029.794 (67,14)	306.776 (20,00)	7.123 (0,46)	11.568 (0,75)	178.471 (11,63)
Marcelândia	853.057 (45,23)	840.54 (44,57)	22.952 (1,21)	13.918 (0,73)	155.183 (8,22)
N. S. Livramento	9.834 (1,22)	542.71 (67,72)	86.524 (10,79)	15.166 (1,89)	147.092 (18,35)
Poconé	37.098 (5,54)	223.846 (33,42)	277.448 (41,43)	28.864 (4,31)	102.371 (15,28)

Legenda: LA: lavoura, MA: mata, PN: pastagem natural, PD: pastagem degradada, PP: pastagem plantada em boas condições.

ANEXOS

Anexo A: Tabela 1: Produção de mel na década (PD), média da produção (MP), contribuição da produção de mel no bioma (PB) e no estado (PE).

Municípios	PD (kg)	MP (kg)	PE (%)
Alta Floresta	67.795	6.780	1,96
Cáceres	201.452	20.145	5,83
Comodoro	164.320	16.432	4,75
Marcelândia	46.454	4.645	1,34
N. S. Livramento	21.080	3.011	0,61
Poconé	81.249	9.028	2,35

Fonte: FERREIRA (2014).

Anexo B: Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



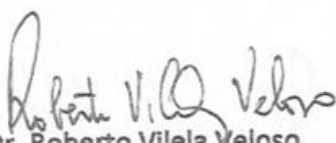
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº 23108.033074/14-9, sobre “Avaliação da atividade cicatrizante de feridas de méis produzidos no pantanal e em alguns municípios da Amazônia Mato-Grossenses”, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. DOMINGOS TABAJARA DE OLIVEIRA MARTINS & Col.**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT em reunião ordinária de **23/10/2014**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 23108.033074/14-9, entitled “Evaluation of wound healing activity of honeys produced in the Pantanal and in some municipalities of Amazon in Mato Grosso”, is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in the Use of Animals (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on **October 23, 2014**.

Cuiabá-MT, 24 de outubro de 2014


Prof. Dr. Roberto Vilela Veloso
Presidente


Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar
Vice-Presidente

Anexo C: Normas para publicação artigos na Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos (Food Science and Technology)

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A Food Science and Technology (CTA) publica artigos científicos na área. Os trabalhos devem ser apresentados em inglês, escritos com texto claro e conciso, devendo observar as disposições normativas relacionadas neste documento.

Política editorial

A Food Science and Technology (CTA) aceita submissões de artigos que contenham resultados de pesquisa original e artigos de revisão e adota a política de revisão por pares, anônima.

A rejeição de artigos pode ser feita pelo Editor Chefe, Editor Adjunto e pelos Editores Associados.

O aceite dos trabalhos depende do parecer de pelo menos dois revisores indicados pela Comissão Editorial. Os pareceres dos revisores serão encaminhados aos autores para que verifiquem as sugestões e procedam às modificações que se fizerem necessárias. Em caso de discordância, a decisão final caberá ao Editor responsável pelo artigo ou, se esse considerar necessário, outro revisor será consultado e os três pareceres serão analisados pela Diretoria de Publicações da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia – sbCTA, que tomará a decisão final.

Os trabalhos aceitos serão publicados na versão *on-line* da Revista e no SciELO, dentro um prazo médio de 12 meses.

Autoria

A autoria deve ser limitada a aqueles que participaram e contribuíram substancialmente para o desenvolvimento do trabalho.

O autor para correspondência deve ter obtido permissão de todos os autores para realizar a submissão do artigo e para realizar qualquer alteração na autoria do mesmo.

Termo de concordância e cessão de direitos de reprodução gráfica

O autor para correspondência deverá assinar e encaminhar à Diretoria de Publicações da sbCTA o Termo de Concordância e Cessão de Direitos de Reprodução Gráfica em nome de todos os autores. Assinando o Termo de Concordância e Cessão de Direitos de Reprodução Gráfica, os autores concordam com o seguinte, descrito no Termo:

- Que o trabalho não foi submetido para avaliação por outra publicação de mesma finalidade;
- A submissão do trabalho e a nomeação do autor para correspondência indicado;
- A cessão dos direitos de reprodução gráfica para a sbCTA, caso o trabalho seja aceito para publicação.

Conteúdo da publicação

Artigos originais

O trabalho deve apresentar o resultado claro e sucinto de pesquisa realizada com respaldo do método científico.

Artigos de revisão

O trabalho deve apresentar um *overview* relativo à temática desta revista, normalmente com foco em literatura publicada nos últimos cinco anos.

Trabalhos envolvendo humanos

Quando houver apresentação de resultados de pesquisas envolvendo seres humanos, citar o número do processo de aprovação do projeto por um Comitê de Ética em Pesquisa, conforme Resolução nº 196/96, de 10 de outubro de 1996 do Conselho Nacional de Saúde.

Formatação dos manuscritos

A checagem das informações e a formatação do manuscrito são de responsabilidade dos autores. Artigos originais não podem exceder 16 páginas (excluindo referências). O manuscrito deve ser digitado em espaçamento duplo, em uma única coluna justificada, com margens de 2,5 cm. Linhas e páginas devem estar numeradas sequencialmente. (Verifique também o item Formatos de arquivo ao final deste documento.)

Primeira página

A primeira página do manuscrito submetido deve conter obrigatoriamente as seguintes informações, nesta ordem:

- Relevância do trabalho: breve texto de no máximo 100 palavras que descreva sucintamente a relevância do trabalho;
- Títulos do trabalho:
 - a. Título em inglês;
 - b. Título para cabeçalho (6 palavras no máximo).

Página de autoria

A página de autoria do manuscrito deverá conter as seguintes informações:

- Nome completo e *e-mail* de todos os autores;
- Nomes abreviados de todos os autores para citação (ex.: nome completo: José Antonio da Silva; nome abreviado: Silva, J. A.);
- Informação do autor para correspondência (indicar o nome completo, endereço postal completo, números de telefone e fax e endereço de *e-mail* do autor para correspondência);
- Nome das instituições onde o trabalho foi desenvolvido, sendo: nome completo da instituição (obrigatório), unidade (opcional), departamento (opcional), cidade (obrigatório), estado (obrigatório) e país (obrigatório).

Página de *Abstract*, *Practical Application* e *Keywords*

Abstract

O *abstract* deve:

- Estar em inglês;
- Estar em um único parágrafo de, no máximo, 200 palavras;
- Explicitar claramente o objetivo principal do trabalho;
- Delinear as principais conclusões da pesquisa;
- Se aplicável, indicar materiais, métodos e resultados;
- Sumarizar as conclusões;
- Não usar abreviações e siglas.

O *abstract* não deve conter:

- Notas de rodapé;
- Dados e valores estatísticos significativos;

- Referências bibliográficas.

Practical Application

Texto curto, com no máximo 85 caracteres, apontando as inovações e pontos importantes do trabalho. O *Practical Application* será publicado.

Keywords e palavras-chave

O artigo deve conter no mínimo três (3) e no máximo seis (6) *keywords*. *Keywords* devem estar em inglês. Para compor o *Keywords* de seu artigo, evite a utilização de termos já utilizados no título.

Páginas de texto

O trabalho deverá ser dividido nas seguintes partes, que devem ser numeradas na seguinte ordem:

1. Introdução;
2. Material e métodos, que deve incluir delineamento experimental e forma de análise estatística dos dados;
3. Resultados e discussão (podem ser separados);
4. Conclusões;
5. Referências bibliográficas;
6. Agradecimentos (opcional).

No texto:

- Abreviações, siglas e símbolos devem ser claramente definidos na primeira ocorrência;
- Notas de rodapé não são permitidas;
- Títulos e subtítulos são recomendados, sempre que necessários, mas devem ser utilizados com critério, sem se prejudicar a clareza do texto. Títulos e subtítulos devem ser numerados, respeitando-se a ordem em que aparecem;
- Equações devem ser geradas por programas apropriados e identificadas no texto com algarismos arábicos entre parêntesis, na ordem que aparecem. Elas devem ser citadas no corpo do texto em formato editável e devem estar em posição indicada pelo autor. Por favor, não envie imagens de equações em hipótese alguma. Equações enviadas separadamente não serão aceitas, serão consideradas apenas as equações contidas no texto.

Tabelas, Figuras e Quadros

Tabelas, Figuras e Quadros devem formar um conjunto de no máximo sete elementos. Devem ser numerados com numerais arábicos, seguindo-se a ordem em que são citados. No Manuscrito.pdf – versão para avaliação – e no Manuscrito.doc – versão para produção –, tabelas, equações, figuras e quadros devem ser inseridos no texto completo e na posição preferida pelo autor e que também proporcione o melhor fluxo de leitura. Veja abaixo os detalhes para o envio desses itens na versão para produção.

Figuras e Quadros (versão para produção)

Figuras e Quadros devem ser citados no corpo do texto, em posição que proporcione o melhor fluxo de leitura, e ordenados numericamente, utilizando-se numerais arábicos; as respectivas legendas devem ser enviadas no texto principal de acordo com a indicação do autor. Ao enviar figuras com fotos ou micrografias certifique-se que essas sejam escaneadas em alta resolução, para que cada imagem fique com no mínimo mil pixels de largura. Todas as fotos devem ser acompanhadas do nome do autor, pessoa física. Para representar

fichas, esquemas ou fluxogramas devem ser utilizados Quadros.

Tabelas (versão para produção)

As tabelas devem ser citadas no corpo do texto e numeradas com algarismos arábicos. Devem estar inseridas no corpo do texto em posição indicada pelo autor. Tabelas enviadas separadamente não serão aceitas, serão consideradas apenas as tabelas contidas no texto. As tabelas devem ser elaboradas utilizando-se o recurso Tabela do programa Microsoft Word 2007 ou posterior; não devem ser importadas do Excel ou Powerpoint e devem:

- Ter legenda com título da Tabela;
- Ser autoexplicativas;
- Ter o número de algarismos significativos definidos com critério estatístico que leve em conta o algarismo significativo do desvio padrão;
- Ser em número reduzido, para criar um texto consistente, de leitura fácil e contínua;
- Apresentar dados que não sejam apresentados na forma de gráfico;
- Utilizar o formato mais simples possível, não sendo permitido uso de sombreamento, cores ou linhas verticais e diagonais;
- Utilizar somente letras minúsculas sobrescritas para indicar notas de rodapé que informem abreviações, unidades etc. Demarcar primeiramente as colunas e depois as linhas e seguir essa mesma ordem no rodapé.

Nomes proprietários

Matérias-primas, equipamentos especializados e programas de computador utilizados deverão ter sua origem (marca, modelo, cidade, país) especificada.

Unidades de medida

- Todas as unidades devem estar de acordo com o Sistema Internacional de Unidades (SI);
- Temperaturas devem ser descritas em graus Celsius (°C).

Referências bibliográficas

Citações no texto

As citações bibliográficas inseridas no texto devem ser feitas de acordo com o sistema "Autor Data". Por exemplo, citação com um autor: Sayers (1970) ou (Sayers, 1970); com dois autores: Moraes & Furuie (2010) ou (Moraes & Furuie, 2010); e acima de dois autores apresenta-se o primeiro autor seguido da expressão "et al.". Nos casos de citação de autor entidade, cita-se o nome dela por extenso.

Lista de referências

A revista **Food Science and Technology (CTA)** adota o estilo de citações e referências bibliográficas da American Psychological Association - APA. A norma completa e os tutoriais podem ser obtidos no link <http://www.apastyle.org>.

A lista de referências deve ser elaborada primeiro em ordem alfabética e em seguida em ordem cronológica, se necessário. Múltiplas referências do mesmo autor no mesmo ano devem ser identificadas por letras "a", "b", "c" etc. apostas ao ano da publicação.

Artigos em preparação ou submetidos à avaliação não devem ser incluídos nas referências. Os nomes de todos os autores deverão ser listados nas referências, portanto não é permitido o uso da expressão "et al."

Segundo determinação da Diretoria de Publicações da sbCTA, os artigos aceitos cujas referências bibliográficas estejam fora do padrão determinado ou com informações incompletas NÃO SERÃO PUBLICADOS até que os autores adequem as referências às normas.

Exemplos de referências

Livro

Baccan, N., Aleixo, L. M., Stein, E., & Godinho, O. E. S. (1995). *Introdução à semimicroanálise qualitativa* (6. ed.). Campinas: EduCamp. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. (2006). *Tabela brasileira de composição de alimentos – TACO* (versão 2, 2. ed.). Campinas: UNICAMP/NEPA.

Capítulo de livro

Sgarbieri, V. C. (1987). Composição e valor nutritivo do feijão *Phaseolus vulgaris* L. In E. A. Bulisani (Ed.), *Feijão: fatores de produção e qualidade* (cap. 5; p. 257-326). Campinas: Fundação Cargill.

Artigo de periódico

Versantvoort, C. H., Oomen, A. G., Van de Kamp, E., Rompelberg, C. J., & Sips, A. J. (2005). Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, 43(1), 31-40.

Sillick, T. J., & Schutte, N. S. (2006). Emotional intelligence and self-esteem mediate between perceived early parental love and adult happiness. *E-Journal of Applied Psychology*, 2(2), 38-48. Retrieved from <http://ojs.lib.swin.edu.au/index.php/ejap>

Trabalhos em meio eletrônico

Richardson, M. L. (2000). *Approaches to differential diagnosis in musculoskeletal imaging* (version 2.0). Seattle: University of Washington, School of Medicine. Retrieved from <http://www.rad.washington.edu/mskbook/index.html>

Legislação

Brasil, Ministério da Educação e Cultura. (2010). *Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos; altera a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências* (Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010). Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

Teses e dissertações

Fazio, M. L. S. (2006). *Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em polpas congeladas de frutas* (Dissertação de mestrado). Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

Eventos

Sutopo, W., Nur Bahagia, S., Cakravastia, A., & Arisamadhi, T. M. A. (2008). A Buffer stock Model to Stabilizing Price of Commodity under Limited Time of Supply and Continuous Consumption. In *Proceedings of The 9th Asia Pacific Industrial Engineering and Management Systems Conference (APIEMS)*, Bali, Indonesia.

Formatos de arquivo

O texto principal do manuscrito deve ser submetido da seguinte forma:

Manuscrito.pdf: versão para avaliação

- Formato .pdf;
- Fonte Times New Roman, tamanho 12;

- Espaçamento duplo entre linhas;
- Texto completo do manuscrito (no máximo 16 páginas);
- Figuras, Quadros e Tabelas com as respectivas legendas devem ser submetidos junto ao texto completo e na posição preferida pelo autor;
 - Linhas e páginas devem ser numeradas sequencialmente;
 - Deve ter a folha de rosto excluída;
 - Deve ter os nomes de autores e instituições removidos da página de título;
 - Deve ser nomeado `manuscritoavaliacao.pdf`.

Manuscrito.doc: versão para produção

- Formato Microsoft Word® 2007 ou posterior;
- Fonte Times New Roman, tamanho 12;
- Espaçamento duplo entre linhas;
- Figuras, Quadros, Tabelas, equações e respectivas legendas devem ser incorporados no texto na posição preferida pelo autor;
 - Linhas e páginas devem ser numeradas sequencialmente;
 - Deve-se apresentar a folha de rosto em arquivo separado;
 - Deve-se apresentar os nomes dos autores e instituições na primeira página;
 - Deve ser nomeado `manuscritoproducao.doc`.

Cheque a preparação de seu manuscrito utilizando a Checklist_Autor_Food Science and Technology (CTA) (Download Checklist for Authors).

Após conferir a formatação e ter preparado os arquivos de acordo com as recomendações, siga para a etapa submissão *on-line* (veja abaixo).

Instruções gerais para submissão *online*

Taxa de submissão

A Food Science and Technology (CTA) cobrará taxa de publicação dos artigos aceitos de acordo com os seguintes critérios:

- USD 220.00 – De autores não associados à sbCTA;
- USD 200.00 – Se ao menos um autor for associado da sbCTA e estiver quite com a anuidade;
- USD 180.00 – Se ao menos dois autores forem associados da sbCTA e estiverem quites com a anuidade;
- USD 160.00 – Se ao menos três autores forem associados da sbCTA e estiverem quites com a anuidade;
- USD 140.00 – Se ao menos quatro autores forem associados da sbCTA e estiverem quites com a anuidade.

O processo de publicação do artigo só se inicia após o pagamento da taxa de publicação, que pode ser feito de duas formas, sendo o *e-mail* sempre o do autor que realizou a submissão:

- Autor no Brasil: através de boleto bancário, enviado por e-mail;
- Autor no exterior: através do site de pagamentos PayPal, enviado por e-mail.

Revisão do inglês

Os trabalhos devem ser apresentados em inglês, com carta de comprovação de revisão assinada por especialista no idioma inglês (brasileiro ou estrangeiro). Todas as revisões de inglês devem ser acompanhadas de uma

carta detalhando as alterações feitas no documento original.

Antes de realizar a submissão *on-line*, o autor para correspondência deverá preencher e assinar o Termo de Concordância e Cessão de Direitos de Reprodução Gráfica. Esse termo pode ser baixado *on-line* no endereço http://cta.submitcentral.com.br/terms_sbcta_br.pdf.

Encaminhar o termo para o e-mail publicacoes@sbcta.org.br. O processo de avaliação não se inicia até que o Termo de Concordância e Cessão de Direitos de Reprodução Gráfica seja recebido.

Submissão do manuscrito

O programa Submit para submissão dos artigos está otimizado para os seguintes navegadores, em sua versão mais atual: Internet Explorer, Firefox, Opera, Safari e Google Chrome.

Os autores devem acessar o programa Submit no endereço <http://cta.submitcentral.com.br> e, no painel do autor, clicar em iniciar uma nova submissão.

Siga passo a passo as indicações e copie com atenção os itens de seu manuscrito que são requeridos pelo sistema de submissão.

Passo 1: Título, Resumo e Palavras-chave

- Preencha o campo título;
- Cole ou digite o resumo no campo resumo;
- Adicione no mínimo três palavras-chave, preenchendo o campo palavras-chave e clicando no botão adicionar;
- Clique no botão continuar.

Passo 2: Autores e Instituições

- Preencha as informações de cada autor do trabalho. É necessário preencher todos os campos e clicar em adicionar antes de passar ao próximo autor. Para acertar a ordem, utilize as setas na coluna ordem;
- Marque o autor para correspondência clicando no botão autor para correspondência (troca);
- Informe pelo menos uma (1) instituição para cada autor. Se necessário, clique no botão editar instituições;
- Clique no botão continuar.

Passo 3: Referees

- Indique três revisores potenciais para avaliar seu trabalho – essa etapa pode ajudar muito a agilizar o início do processo de avaliação;
- Clique no botão continuar.

Passo 4: Envio de arquivos

- Cheque todos os arquivos, conferindo se estão formatados adequadamente, de acordo com as regras da Revista Food Science and Technology (CTA);
- Envie todos os arquivos do seu trabalho utilizando o botão procurar ou *Brow se*. Escolha o tipo de arquivo: Manuscrito em PDF sem os autores (para revisores); Manuscrito em DOC completo (para produção); Folha de Rosto; Figura; Tabela ou Arquivo suplementar;
- Clique no botão enviar. Repita a operação até ter enviado todos os arquivos;
- Clique no botão continuar.

Passo 5: Informações gerais

- Escolha o tipo de contribuição (artigo científico) da caixa de seleção;
- Escolha a área do trabalho da caixa de seleção;
- Confirme que assinou e enviou o Termo de Concordância e respostas às outras perguntas;
- Escreva sua carta ao editor;
- Clique no botão continuar.

Passo 6: Checar e submeter

- Verifique todas as informações e corrija-as, se necessário, clicando no botão editar;
- Baixe todos os arquivos e abra-os para certificar-se de que não estejam corrompidos;
- Marque a caixa, informando que baixou e abriu todos os arquivos;
- Clique no botão finalizar submissão para concluir o processo de submissão.

Uma confirmação será exibida. Você pode imprimir a confirmação de envio, que também será enviada a você via *e-mail*.

Contato**Diretoria de Publicações**

Av. Brasil, 2880 – 13001-970 Campinas – SP, Brasil – Caixa Postal: 271

Fone/Fax: +55 (19) 3241-0527; +55 (19) 3241-5793

e-mail: publicacoes@sbcta.org.br

Anexo D: Normas para publicação de artigo na Revista Food Chemistry.

GUIDE FOR AUTHORS

.INTRODUCTION

Ten essential rules to ensure your manuscript is handled promptly

The manuscript fits the Aims and Scope of the journal (<http://www.journals.elsevier.com/food-chemistry>) Manuscript is in accordance with ARTICLE TYPE – GUIDELINES (<http://www.elsevier.com/journals/food-chemistry/0308-8146/guide-for-authors#14000>) The text is written in good English. Authors who feel their manuscript may require editing to conform to correct scientific English may wish to use an English Language Editing service such as the one available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>). Manuscript text is divided into numbered sections; line and page numbers are added and text is double spaced An ethical statement is required for experiments involving humans or animals Conflict of interest statement is included at the end of the manuscript The number of figures and tables combined does not exceed a total of 6; additional tables and figures can be submitted as supplementary material. All relevant references should be provided in the Reference list. Cover letter is prepared, introducing your article and explaining the novelty of the research Highlights are prepared (a birds' eye view of your article in 3-5 points, 85 characters each)

Types of paper

Original research papers; review articles; rapid communications; short communications; viewpoints; letters to the Editor; book reviews.

1. Research papers - original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, and should not exceed 7,500 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations). Research papers should not contain more than 40 references.

2. Review articles - will be accepted in areas of topical interest, will normally focus on literature published over the previous five years, and should not exceed 10,000 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations). Review articles should not contain more than 80 references.) If it is felt absolutely necessary to exceed this number, please contact the editorial office for advice before submission.

3. Rapid communications - an original research paper reporting a major scientific result or finding with significant implications for the research community, designated by the Editor.

4. Short communications - Short communications of up to 3000 words, describing work that may be of a preliminary nature but which merits immediate publication. These papers should not contain more than 30 references.

5. Viewpoints - Authors may submit viewpoints of about 1200 words on any subject covered by the Aims and Scope.

6. Letters to the Editor - Letters are published from time to time on matters of topical interest.

7. Book reviews

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

The work described in your article must have been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html> ; EU Directive 2010/63/EU for animal experiments http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm.

Guidelines in the US and Canada, Europe and Australia specifically state that hypothermia (use of ice slurries) is not an acceptable method for killing fish in the research environment. We are aware that in the past papers using the same or similar methods have been accepted in *Food Chemistry*. However, the journal reserves the right to change/enforce submission criteria especially in the relation to publication of ethical research.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the

corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, Who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

For subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential

manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for noncommercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The open access publication fee for this journal is **\$2,200**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language

Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

Referees

Authors are required to submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 3 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Review Policy

A peer review system involving two or three reviewers is used to ensure high quality of manuscripts accepted for publication. The Managing Editor and Editors have the right to decline formal review of a manuscript when it is deemed that the manuscript is

- 1) on a topic outside the scope of the Journal;
- 2) lacking technical merit;
- 3) focused on foods or processes that are of narrow regional scope and significance;
- 4) fragmentary and providing marginally incremental results; or
- 5) is poorly written.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

General: Manuscripts must be typewritten, double-spaced with wide margins on one side of White paper. Each page must be numbered, and lines must be consecutively numbered from the start to the end of the manuscript. Good quality printouts with a font size of 12 or 10 pt are required. The corresponding author should be identified (include a Fax number and E-mail address). Full postal addresses must be given for all co-authors. Authors should consult a recent issue of the journal for style if possible. An electronic copy of the paper should accompany the final version. The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity. Authors should retain a copy of their manuscript since we cannot accept responsibility for damage or loss of papers. Original manuscripts are discarded one month after publication unless the Publisher is asked to return original material after use.

Article structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text, Acknowledgements, Appendix, References, Vitae, Figure Captions and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All

other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should not exceed 150 words.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in

the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). The PubChem CIDs can be found via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>. Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article

Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

More information is available at: <http://www.elsevier.com/PubChem>.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' is ambiguous and should not be used.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers oneclick access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the printed version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of

the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Please insert the following text before the standard text - Photographs, charts and diagrams are all to be referred to as "Figure(s)" and should be numbered consecutively in the order to which they are referred. They should accompany the manuscript, but should not be included within the text. All illustrations should be clearly marked with the figure number and the author's name. All figures are to have a caption. Captions should be supplied on a separate sheet.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Example: CTAHR (College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii). Tea (*Camellia sinensis*) a New Crop for Hawaii, 2007. URL http://www.ctahr.hawaii.edu/oc/freepubs/pdf/tea_04_07.pdf . Accessed 14.02.11.

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. See Types of Paper for reference number limits. In the text refer to the author's name (without initials) and year of publication (e.g. "Steventon, Donald and Gladden (1994) studied the effects..." or "...similar to values reported by others (Anderson, Douglas, Morrison & Weiping, 1990)..."). For 2-6 authors all authors are to be listed at first citation. At subsequent citations use first author et al.. When there are more than 6 authors, first author et al. should be used throughout the text. The list of references should be arranged alphabetically by authors' names and should be as full as possible, listing all authors, the full title of articles and journals, publisher and year. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a

scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). New York: E-Publishing Inc.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, highresolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

Additional information

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and '/' should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full. Current recognised (IUPAC) chemical nomenclature should be used, although commonly accepted trivial names may be used where there is no risk of ambiguity.

The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately - please upload all of your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is

received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/89/p/8045/. You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.