

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE CÁCERES JANE VANINI
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS -FACAB
CURSO DE AGRONOMIA**

KAMILA MARA FRANCISCA DE LIMA

**COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIBACTERINA
DE MEL DE *Apis mellifera* EM MUNICÍPIOS DE MATO
GROSSO**

**CÁCERES-MT
2015**

KAMILA MARA FRANCISCA DE LIMA

COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIBACTERINA DE MEL DE *Apis mellifera* EM MUNICÍPIOS DE MATO GROSSO

Monografia apresentada como requisito obrigatório para obtenção do título de Engenheira Agrônoma a Universidade do Estado de Mato Grosso – Campus de Cáceres.

Orientadora

Prof^a Dr^a Carla Galbiati

**CACERES-MT
2015**

KAMILA MARA FRANCISCA DE LIMA

COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIBACTERINA DE MEL DE *Apis mellifera* EM MUNICÍPIOS DE MATO GROSSO

Esta monografia foi julgada e aprovada como requisito para obtenção do Diploma de Engenheira Agrônoma no Curso de Agronomia da Universidade do Estado de Mato Grosso – UNEMAT.

Cáceres, 03 de junho de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Kelly Lana Araújo (UNEMAT)

Ms^a Elaine Maria Loureiro (UFAM/ UNEMAT)

Prof^a Dr^a Carla Galbiati (UNEMAT)

Orientadora

Dedico esse trabalho em especial para minha mãe, uma pessoa que sempre esteve do meu lado e nunca deixou desistir, mesmo diante dos problemas que vivemos, contribuindo sempre positivamente para concretizar esse sonho.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Universidade do Estado de Mato Grosso pelo seu corpo docentes que oportunizam as pessoas a um horizonte superior. Ao laboratório CETApis que contribuiu para que pudesse concluir essa monografia.

A professora Carla Galbiati que dedicou um pouco do seu tempo com suas orientações e compartilhou com sua experiência para que a minha formação fosse um aprendizado de vida.

As meninas do laboratório Elaine, Claudia, Gabriela e Joziane pelos bons momentos e boa parte do tempo juntas compartilhando experiências práticas.

Ao amigo acadêmicos que encontrei ao longo dessa trajetória Joziane Mendonça, Dania Cardoso, Nisleyne Ribeiro, Erica Martins e Aline Moraes, que contribuíram para que hoje pudesse concluir mais um ciclo da minha vida.

Primeiramente agradeço a Deus pela dádiva da vida, e por ter me ajudado a manter a fé nos momentos mais difíceis. Em especial a minha família Ermelina minha mãe, Mario júnior meu irmão e Mario José meu pai, vocês que compartilharam o meu ideal e alimentaram os meus sonhos para que eu pudesse concluir essa jornada, me mostrando que devia seguir o meu caminho sem medo.

Aos meus amigos Flaviele Fernanda Leite, Leni Fontes, Marinete Oliveira, Francinete Oliveira e Marcos Fabio que ouviram os meus desabafos, que partilharam este longo passar dos anos com os momentos alegres e tristes.

E a todos as pessoas que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, que fizeram do meu sonho real, me proporcionando forças para que eu não desistisse de ir atrás do que eu buscava para a minha vida, muitos obstáculos foram impostos para mim durante esses últimos anos mais graças a Deus e a vocês eu não fraquejei, e deixo o meu muito obrigada a todos

“A vida é soma de todas as suas escolhas. ”

(Albert Camus)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Mapa de Mato Grosso apresentando em destaque os seis municípios onde foram coletados os méis da safra de 2012 ou 2013 para a realização do presente estudo.....14
- Figura 2** - Zona de inibição (mm) sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* das amostras de méis dos municípios do estado de Mato Grosso. (Teste Kruskal-Wallis, P= 0,01). Letras iguais não diferentes entre si pelo teste de Wilcoxon ao nível de 5%.....24

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Produção de Mel da Abelha *Apis mellifera* (kg), durante os anos de 2012 e 2013 nos municípios do Estado de Mato Grosso, selecionados neste estudo.....15
- Tabela 2** - Quantificação dos teores de fenólicos totais e flavonoides totais presentes no mel de *Apis mellifera* do Mato Grosso, safra 2012/ 2013.....20
- Tabela 3** - Mínima diluição ativa (MDA) em % p/v \pm desvio padrão dos méis da abelha (*Apis mellifera*) dos municípios de Mato Grosso, safra de 2012/2013, pela metodologia em difusão em disco.....22
- Tabela 4** - Zona de inibição, em (mm), \pm desvio padrão das amostras de méis da abelha *Apis mellifera* dos municípios de Mato Grosso, safra de 2012/2013, pela metodologia em difusão em disco.....23

RESUMO

O mel tem-se destacado na indústria dos produtos naturais pelas suas propriedades terapêuticas como atividade antioxidante e antimicrobiana, e também pela aplicação nas indústrias alimentar e de cosméticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o teor de compostos fenólicos e a atividade antibacteriana do mel para três diferentes bactérias em alguns municípios de Mato Grosso. As amostras de mel analisadas foram originárias de seis municípios de Mato Grosso: Cáceres, Nossa Senhora do Livramento e Poconé (bioma Pantanal), Alta Floresta, Comodoro e Marcelândia (bioma Amazônia), totalizando 18 amostras. Para a quantificação de fenólicos foi determinado o teor de fenólicos totais, usando uma curva padrão de ácido gálico, e o teor de flavonoides totais, que foi extrapolado em uma curva padrão de quercetina. As culturas bacterianas foram de *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, no método de difusão em disco. Nos ensaios antibacterianos foram testadas as diluições de mel de 5%, 12,5%, 25%, 50%, 75% (p/v) e mel puro. Uma solução de mel artificial (glicose, frutose e sacarose) foi testada sobre as bactérias. Como padrão antibacteriano utilizou-se Oxacilina (1 µg), Amoxicilina (10 µg) e Ciprofloxacina (5 µg). A mínima diluição ativa (MDA) foi estimada por regressão linear. Análise de variância comparou a mínima diluição ativa do mel para cada bactéria e a origem do mel entre os municípios. As análises estatísticas foram realizadas no programa R. Referente aos compostos fenólicos, o teor máximo no mel de fenólicos totais foi 66,33 mg de EAG/100 g e de flavonoides totais 0,23 mg de EQ/100 g. As amostras de mel dos municípios de Mato Grosso não apresentaram sensibilidade à bactéria *Streptococcus pyogenes*. Uma pequena zona de inibição contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foi observada para o mel, com mínima diluição ativa de 39,17% e 44,58% e não houve diferença entre os municípios. Para *Staphylococcus aureus* a zona de inibição do mel foi entre 6,0 a 13,77 mm, com a maior inibição para o mel de Marcelândia. O mel artificial não inibiu a atividade das bactérias. Os teores de fenólicos e flavonoides no mel de Mato Grosso dos municípios estudados conferem potencial antioxidante, porém o mel não apresentou atividade antibacteriana.

Palavras-chave: Mel, atividade antibacteriana, Pantanal, Amazônia, fenólico.

SUMÁRIO

ARTIGO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1 Amostras de mel	13
2.2 Coleta das amostras	15
2.3 Determinação dos compostos fenólicos	15
2.4 Preparação das diluições de mel.....	17
2.5 Inoculo bacterianos e antibióticos	17
2.6 Cultura das bactérias.....	17
2.7 Análise antibacteriana.....	18
2.8 Determinação da diluição mínima inibitória	18
2.9 Análise estatística	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
3.1 Compostos fenólicos no mel	19
3.2 Atividade antibacteriana.....	21
4. CONCLUSÃO.....	24
5. REFERÊNCIAS	25
6. APÊNDICES	29

COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE MEL DE *Apis mellifera* EM MUNICÍPIOS DE MATO GROSSO

Preparado de acordo com as normas da Revista Arquivos do Instituto Biológico – Versão preliminar

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar o teor de compostos fenólicos e a atividade antibacteriana do mel para três diferentes bactérias em alguns municípios de Mato Grosso. As amostras de mel analisadas foram originárias de seis municípios, três no bioma Amazônia (Alta Floresta, Comodoro e Marcelândia) e três no bioma Pantanal (Cáceres, Nossa Senhora do Livramento e Poconé). O mel foi coletado em colmeias Langstroth na safra de 2012 ou 2013. Para a determinação do teor de fenólicos totais foi empregado o método descrito de Folin-Ciocalteu, o teor de flavonoides totais foi determinado em uma curva padrão de quercetina. As culturas bacterianas foram de *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Nos ensaios antibacterianos foram testadas as diluições de mel 5%, 12,5%, 25%, 50%, 75% (p/v) e o mel puro pelo método de difusão em disco (MDD). A mínima diluição ativa (MDA) foi estimada por regressão linear e a comparação entre os municípios foi pela ANOVA. Os compostos fenólicos no mel tiveram como teor máximo de fenólicos totais 66,33 mg de EAG/100 g e de flavonoides totais 0,23 mg de EQ/100 g de mel. O mel de Mato Grosso não apresentou sensibilidade a bactéria *Streptococcus pyogenes*. O mel apresentou pequena zona de inibição contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, o que correspondeu a MDA de 39,17% e 44,58%, respectivamente. A mínima diluição ativa do mel para as bactérias não diferiu entre os municípios. A partir desses resultados pode observar que os teores de fenólicos e flavonoides no mel de Mato Grosso dos municípios estudados conferem potencial antioxidante, porém o mel não apresentou atividade antibacteriana.

Palavras-chave: Atividade inibitória, composto fenólicos, mel, sensibilidade.

PHENOLIC COMPOUND AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF HONEY'S *Apis mellifera* IN MUNICIPALITIES OF MATO GROSSO

Prepared according to the Journal of Biological Institute of Standards Archives - Preliminary version

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate the content of phenolic compounds and the antibacterial activity of honey for three different bacteria in some municipalities of Mato Grosso. The honey samples analyzed were originating from six municipalities, three in the Amazon biome (Alta Floresta, Comodoro and Marcelândia) and three in the Pantanal (Cáceres, Nossa Senhora do Livramento and Poconé). The honey was collected in Langstroth hives in 2012 or 2013 crop. To determine the total phenolic content was used the method of Folin-Ciocalteu, the total flavonoid content was determined in a standard curve of quercetin. Bacterial cultures were *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. In antibacterial tests were tested to 5% Dilutions of honey, 12.5%, 25%, 50%, 75% (w/v) and pure honey by disk diffusion method (MDD). The minimum active dilution (MDA) was estimated by linear regression and the comparison between the municipalities was by ANOVA. Phenolic compounds in honey had the maximum total phenolics 66.33 mg GAE/g and 100 mg total flavonoids 0.23 EQ/100 g honey. Honey Mato Grosso showed no sensitivity to the bacterium *Streptococcus pyogenes*. Honey showed a small zone of inhibition against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, which corresponded to 39.17% MDA and 44.58%, respectively. The minimum active dilution of honey for the bacteria did not differ between municipalities. From these results can note that phenolic and flavonoid contents in Mato Grosso honey from the municipalities studied confer antioxidant potential, but Honey showed no antibacterial activity.

Keywords: Antibacterial activity, phenolic compound, honey, sensitivity.

1. INTRODUÇÃO

O mel tem-se destacado na indústria dos produtos naturais pelas suas propriedades terapêuticas como atividade antioxidante e antimicrobiana, e também pela aplicação nas indústrias alimentar e de cosméticos (GOMES, 2009). De acordo com Borsato (2009) a atividade antimicrobiana pode ser devida a muitos fatores, como diferenças no solo e nas condições atmosféricas, bem como relacionados ao tipo e fisiologia de cada planta, que contribui para a formação do mel, que resultam nas diferentes composições química.

Segundo Adcock (1962) e Molan (1992), os responsáveis por essa habilidade antimicrobiana são os fatores físicos, como sua alta osmolaridade e acidez, e os fatores químicos relacionados com a presença de substâncias inibidoras, como o peróxido de hidrogênio, e substâncias voláteis, como os flavonoides e ácidos fenólicos. Alvarez-Suarez et al. (2010) complementaram que quanto mais teor fenólico e quantidade de flavonoides o mel possuir maior será a atividade antimicrobiana.

O uso indiscriminado e irracional de antibióticos tem possibilitado a seleção de bactérias a esses medicamentos, caracterizando resistência (HSUEH et al., 2005, GUIMARÃES et al, 2010), diante dessa problemática novos fármacos são procurados com menos efeitos colaterais.

A composição química do mel é devido a diversidade florística da região, que representa o conjunto de plantas fornecedoras de pólen e néctar (VIDAL, et al 2008). As espécies vegetais que contribuem para produção do mel caracterizam seus compostos secundários como fenólicos e flavonoides, além ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Esses compostos são agentes antioxidantes que atacam o envoltório dos microrganismos, preservando e mantendo a esterilidade do mel durante a maturação (SILVA et al., 2006).

A capacidade do mel de inibir o crescimento de várias bactérias provém, possivelmente, de fenólicos e flavonoides (Alvarez-Suarez et al., 2010), que são produzidas pelo metabolismo secundário das plantas e são responsáveis também pelo efeito antioxidante (Silici et al., 2010). O mel com maior teor de fenólicos apresentam maior atividade para inibição do crescimento de bactérias e possuem coloração mais escura (LACERDA et al. 2010).

A atividade antibacteriana dos méis de abelha sem ferrão e de *Apis mellifera* sobre as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* pode ser devida as fontes florais segundo Bozoni (2012).

Os méis brasileiros de diferentes regiões apresentaram atividade antibacteriana para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, nas amostras da região dos Campos Gerais, no Paraná (VARGAS, 2006) e amostras de São Paulo e do Rio Grande do Norte (BAZONI, 2012). O mel de Cuba estudado por Alvarez-Suarez et al. (2010) também apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, assim como o mel da Grécia frente a *Staphylococcus aureus* (VOIDAROU et al., 2011). A atividade antibacteriana para *Streptococcus pyogenes* foi observada para o mel de Manuka (MADDOCKS, 2012) e para o mel encontrado na época de floração do Oeste Argélia. (MOUSSA, 2012).

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria esférica, do grupo dos cocos gram-positiva, relacionada a infecções na pele e nas fossas nasais podendo atingir os tecidos mais profundo (SANTOS et al 2007), comum em estudos de atividade antibacteriana *in vitro*. *Streptococcus pyogenes* é uma espécie de bactérias coco gram-positiva, que pode ser encontrado nas vias aéreas superiores e causar infecções (TONAKA 2009). A *Escherichia coli* é gram-negativas, a bactéria mais representativa do grupo das bactérias coliformes fecais e está relacionada a aproximadamente a 50% das infecções hospitalares, e de 70 a 90% dos episódios de infecções do trato urinário (KORB et al, 2013).

O mel de origem monoflorais não são comuns no Brasil devido à sua produção ser predominante em áreas de vegetação nativa onde a diversidade florística é grande (MILFONT et al, 2009). O Mato Grosso possui diversidade florística conferida por seus três biomas Amazônia, Pantanal e Cerrado (IBEG, 2014), o que pode influenciar na origem do mel.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o teor de compostos fenólicos e a atividade antibacteriana do mel para três diferentes bactérias em alguns municípios de Mato Grosso.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras de mel

As amostras de mel de *Apis mellifera* foram obtidas de seis municípios do estado de Mato Grosso, no bioma Amazônia (Alta Floresta, Comodoro e Marcelândia) e no bioma Pantanal (Cáceres, Nossa Senhora do Livramento e Poconé) (Figura 1).

O bioma Amazônia tem como diversidade florística a Floresta Amazônica é a maior floresta tropical do planeta e é composta por diversos ecossistemas: além da floresta úmida e firme, apresenta tipos de matas, campos abertos e espécies do Cerrado, apresentando

aproximadamente de 4.196.943 km², ocupando parte do estado de Mato Grosso com aproximadamente 54% (IBGE, 2014).

O Pantanal possui uma região formada por uma variedade de ecossistema que são periodicamente inundados, o que constitui o principal fator para a sua formação e diferenciação em relação ao demais biomas, apresentando uma área de aproximadamente 150.355 km², com território no estado de Mato Grosso apresentando 25 % da área (IBGE, 2014).

Os seis municípios em que as amostras foram obtidas foram escolhidos por serem maiores produtores de mel do Estado de Mato Grosso (Tabela 1). Na região Centro-Oeste em 2013 Mato Grosso do Sul produziu 49% de mel, Mato Grosso 28%, Goiás 22% e Distrito Federal 1% (IBGE, 2014).

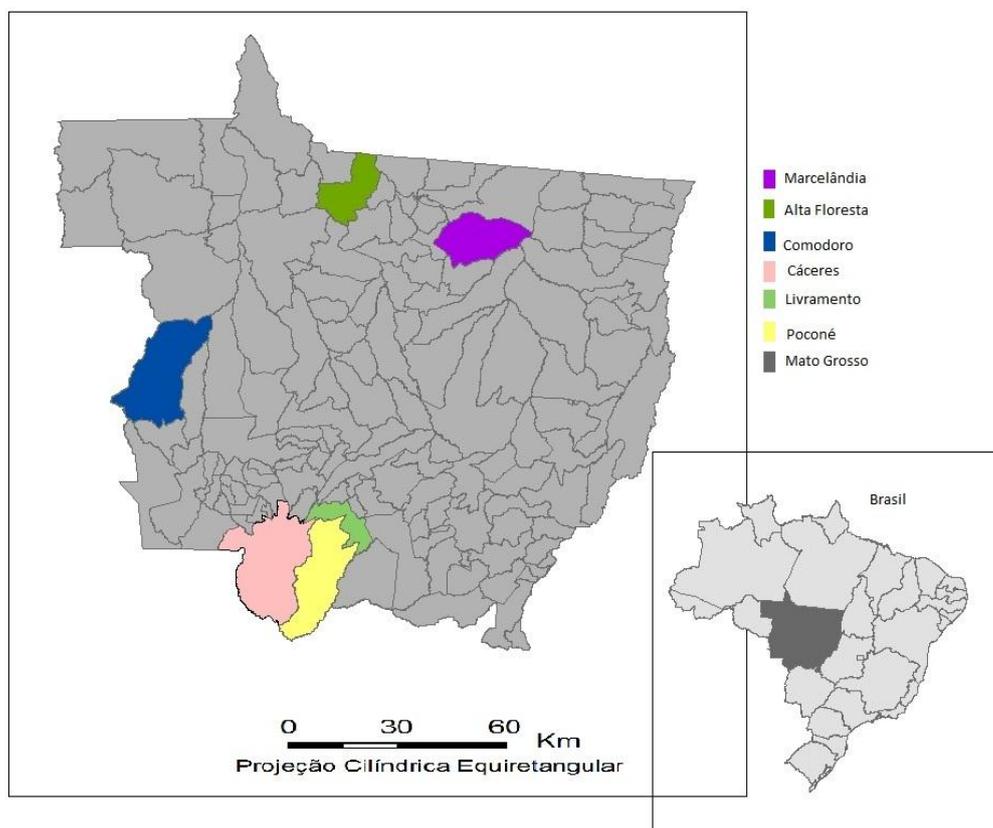


Figura 1. Mapa de Mato Grosso apresentando em destaque os seis municípios onde foram coletados os méis da safra de 2012 ou 2013 para a realização do presente estudo.

Tabela.1. Produção de Mel da Abelha *Apis mellifera* (kg), durante os anos de 2012 e 2013 nos municípios do Estado de Mato Grosso, selecionados neste estudo.

Municípios	Produção de Mel (kg)	
	2012	2013
Alta Floresta	2,600	3,920
Cáceres	12,600	4,430
Comodoro	38,000	38,000
Marcelândia	2,000	-
Nossa Senhora do Livramento	3,800	4,620
Poconé	9,214	6,892

(-) não apresentou produção (IBGE, 2014).

2.2 Coleta das amostras

As amostras de mel de abelha foram coletadas junto aos apicultores comerciais dos seis municípios. O mel foi produzido em colmeia Longstroth e colhido nos meses de julho a outubro nas safras de 2012 ou 2013. Após a coleta as amostras foram armazenadas em frasco plásticos e mantido em temperatura ambiente.

Dezoito amostras foram analisadas, 3 amostras por município. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três repetições e a fonte de variação foi a origem dos municípios com seis níveis.

2.3 Determinação dos compostos fenólicos

Fenólicos totais do mel

As análises da atividade inibitória do mel e seus compostos fenólicos foi realizado na Universidade Estadual de Mato Grosso (UNEMAT), campus Universitário de Cáceres, no laboratório do Centro de Estudo em Apicultura (CET*Apis*).

Para a determinação do conteúdo de fenólicos totais foi empregado o método descrito de Folin-Ciocalteu por SINGLETON e ROSSI (1965).

Aliquotas de 100 μ L de uma solução aquosa de mel (0,2 g/ml) foram misturadas com 2 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu em balão volumétrico de 10 mL. Após 2 minutos, foram adicionados 1,5 mL de carbonato de sódio 20% m/v, a solução será novamente misturada, e o volume será completado com água destilada com posterior homogeneização. A solução permanecerá 2 horas no escuro, em seguida a absorbância em

765 nm foi determinada em espectrofotômetro. Para cada amostra foram efetuados três ensaios, apresentando a média, expressa em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) /100 g de mel.

A partir da solução aquosa padrão de ácido gálico (1 mg/mL \equiv 0,0059 mm), a partir de alíquotas de diferentes volumes (2, 6, 8, 10, 20, 30, 50, 75 e 100 μ L) misturadas com 0,5mL de Folin-Ciocalteu e 1,5mL da de Na₂CO₃ (Apêndice A). Deixar o espectrofotômetro estabilizar por 30 minutos. A leituras espectrofotométrica do branco de água. A curva analítica foi construída no Excel®, por regressão linear da equação da reta [$y = a + b.x$] relacionando concentração de ácido gálico em absorvância para leitura a 760 nm.

A equação [$y = a + b.x$] determinou indiretamente o teor de fenóis totais nas amostras, em que se substitui x pela média da absorbância de cada amostra de mel para se calcular y (concentração).

Flavonoides totais no mel

O teor de flavonoides totais foi determinado segundo metodologia descrita por MEDA et al. (2005), AHN et al. (2007), com adaptações, com solução de cloreto de alumínio 2% em metanol.

O processo inicia-se com a adição de 3,0 mL de solução metanólica a 2% de cloreto de alumínio hidratado (Vetec) a 3,0 mL da solução de mel. Deixar o espectrofotômetro estabilizar por 30 minutos, as absorbâncias das soluções foram lidas no comprimento de onda de 415 nm, contra o branco consistindo de 3 mL de metanol (MEDA et al., 2005; AHN et al., 2007).

A partir de uma solução padrão de quercetina em metanol (1,78 mg/mL \equiv 0,0059 mM). Acrescentar 3,0 mL de solução de cloreto de alumínio 2% nas alíquotas da solução original com diferentes volumes (2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 μ L) (Apêndice B). Após 30 min em repouso realizou a leitura das absorbâncias das soluções no comprimento de onda de 415 nm contra o branco, consistindo de 3,0 mL de solução de mel misturados a 3,0 mL de metanol sem cloreto de alumínio. A curva analítica foi feita no Excel®, efetuando-se a regressão linear, obtida pela equação da reta [$y = a + b.x$] que relacionou a concentração de quercetina e a absorbância de cada leitura a 415 nm.

A equação $y = a + b.x$ determinou indiretamente o teor de flavonoides totais nas amostras, em que substitui x pela média da absorbância de cada amostra de mel para se calcular y (concentração).

2.4 Preparação das diluições de mel

As diluições de mel usadas para testar a atividade antibacteriana foram 5%, 12,5%, 25%, 50%, 75% (p/v) e mel puro. O mel foi pesado em balança de precisão e diluído em água destilada e esterilizada nas proporções descritas acima. Essas diluições foram definidas a partir de modificações dos estudos de Molan (1992), Basualdo et al. (2007), Lee et al. (2008), Voidarou et al. (2011) e Moussa et al. (2012).

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 (mel artificial) foi testada para determinar se os efeitos inibitórios estão ligados ao teor de açúcar dos méis (COOPER et al., 1999; MERCÊS et al., 2013).

2.5 Inoculo bacterianos e antibióticos

As linhagens usadas para teste foram as bactérias gram positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Streptococcus pyogenes* (ATCC NEWP 0015) e gram negativa *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Os controles positivos para verificar a atividade inibitória das bactérias foram os antibióticos Oxacilina e Amoxicilina para *Staphylococcus aureus* (MELO-CRISTINO et al., 2001; SCALABRIN et al., 2003; SPERANÇA, GOMES e PRAZERES, 2010; CRUVINEL et al., 2011), Amoxicilina e Ciprofloxacina para *Escherichia coli* (ZANATTA et al., 2004; VIEIRA et al., 2007), Ciprofloxacina e Azitromicina para *Streptococcus pyogenes*.

2.6 Cultura das bactérias

O método de difusão em disco (MDD), para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foi usado o meio de cultura Ágar Mueller Hinton (AMH), diluído em água destilada. Para *Streptococcus pyogenes* o meio de cultura foi enriquecido com 5% de sangue de carneiro desfibrinado estéril.

Para o preparo do meio foi pesado 3,8 g do ágar AMH em balança analítica, diluído 100 mL de água destilada e esterilizada, com aquecimento até completa dissolução. O meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Após o preparo do meio de cultura foi distribuído 20 ml em cada placa de Petri e após a solidificação, foram incubadas a 35-37 °C por 24 h, para avaliar a contaminação do meio de cultura (NCCLS, 2003).

As bactérias foram incubadas para crescimento na placa de Petri no meio de cultura específico antes da replicação nas demais placas. A replicação foi com auxílio de *swabs*, na

concentração bacteriana da solução salina de 10^6 na Escala de McFarland, nas placas com o meio de cultura nas três direções (NCCLS, 2003).

2.7 Análise antibacteriana

As placas com meio de cultura replicadas e com a bactéria foram usadas no ensaio da atividade antibacteriana para estimar a mínima diluição ativa (MDA), de acordo com padrão estabelecido pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003).

Em cada placa de Petri com a bactéria crescida foram colocados 04 discos estéreis de papel 6 mm (blank disc) e aleatoriamente e adicionada uma das diluições de mel testadas (5%, 12,5%, 25%, 50%, 75% (p/v) e o mel puro). As placas foram incubadas por 24 h em temperatura de 35-37 °C.

Os ensaios foram realizados em triplicata, com o delineamento inteiramente casualizado. Para cada bactéria foi testada as diluições em triplicata, para isso utilizou-se 83 placas de Petri (6 municípios X 6 diluições X 3 repetições) mais 2 antibióticos e o mel artificial. Que resulta em 332 discos, distribuídos 4 discos por placas. Para as 3 bactérias foram utilizadas um total de 249 placas.

2.8 Determinação da diluição mínima inibitória

A atividade antibacteriana foi mensurada pelo diâmetro (mm) da zona de inibição (halos) ao redor dos discos, utilizando-se um paquímetro digital. A leitura da zona de inibição foi realizada após incubação de 24 h.

Como o teste foi realizado em triplicata, calcula-se a média aritmética das zonas (BASTOS et al., 2001; FERRONATTO et al., 2007).

2.9 Análise estatística

A mínima diluição ativa (MDA) foi estimada por regressão linear, o modelo estatístico teve a zona de inibição como a variável resposta (y) e as diluições de mel como a variável explicativa (x). Este modelo foi usado para as três bactérias. As origens distintas do mel dos seis municípios foram testadas em regressões separadas.

A atividade antibacteriana do mel foi analisada por meio da análise de variância (ANOVA), o modelo estatístico foi composto pela variável resposta (y) representada pela mínima diluição ativa (MDA) e pela variável origem dos municípios do mel (x_1), com 6 níveis e 3 repetições. O teste F foi usado para ANOVA e o Tukey para comparação de média, ao nível de 5%.

A zona de inibição do mel sobre a bactéria em função da origem dos municípios foi comparada pela ANOVA, usando o mesmo modelo estatístico da atividade antibacteriana usado acima.

A ANOVA não paramétrica foi usada, com aplicação do teste de Kruskal Wallis, quando a variável resposta não ajustou a distribuição Normal. O teste de comparação de médias de Wilcoxon foi usado ao nível de 5%.

O teste de normalidade de Shapiro foi usado para verificar o ajuste da variável resposta a distribuição de erros Normal.

As análises estatísticas foram realizadas no programa R (versão 2.12.0).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Compostos fenólicos no mel

Os fenólicos totais no mel dos municípios do Mato Grosso apresentaram o teor máximo de 66,33 mg de Equivalente Ácido Gálico (EAG) /100 g de mel e mínimo de 25,00 EAG/100 g de mel.

Os valores de fenólicos totais no mel de Mato Grosso foram menores do que o de Santa Catarina com 71,69 mg EAG/100 g e da Índia com 98,0 mg EAG/100 g (RIZELIO, 2011; SAXENA et al., 2010), porém o mel da Malásia teve menos fenólicos totais que os de Mato Grosso, 52,6 mg EAG/100 g (KHALIL et al., 2011).

Meda et al. (2005) identificou uma variação teores de fenólicos totais de 32,59 a 114,74 mg de EAG/100 de mel dependente das regiões geográfica dos países e da origem floral. Enquanto nos méis do Pantanal do Mato Grosso do Sul os teores médios de compostos fenólicos totais variaram de 61,52 a 222,03 mg de EAG/100 g de mel, dependendo do local de coleta (Bertoldi et al., 2012).

Bertoldi et al. (2012) ainda relataram que a variação da composição química do mel pode ser em decorrência das inundações sazonais, causando possivelmente algum tipo de estresse na flora local provocando, assim, um aumento na produção de compostos fenólicos pelas plantas desta região do Pantanal com a finalidade de aumentar suas defesas contra possíveis pragas, fungos, bactérias, entre outros. O maior teor de composto fenólicos encontrado nas amostras de mel no presente trabalho esteve localizado na região do Pantanal, nos municípios de Poconé, com 66,33 mg de EAG/100g de mel, dessa forma pode-se associar

essa relação de composto devido a decorrência de inundações em determinadas épocas do ano.

Resultados de estudos semelhantes para méis de *Apis mellifera* do Rio de Janeiro e São Paulo encontraram valores de fenólicos totais na faixa de 42,08 a 78,02 mg EAG 100 g⁻¹ para o mel silvestre, e para de laranjeira valores de fenólicos de 34,00 a 53,02 mg EAG 100 g⁻¹ (LIANDA et al., 2012). O mel dos municípios de Nossa Senhora do Livramento e Poconé (MT) foram semelhantes a esses, com 43,17 e 66,33 mg EAG/100g de mel, respectivamente. O teor de fenólico do mel de Marcelândia (MT) foi semelhante ao mel monofloral de laranjeira.

Tabela 2. Quantificação dos teores de fenólicos totais e flavonoides totais presentes no mel de *Apis mellifera* do Mato Grosso, safra 2012/ 2013

Municípios	Fenólicos mg de EAG/100g de mel	Flavonoides mg de EQ/100g de mel
Alta Floresta	25,50 ± 14,08	0,24 ± 0,08
Cáceres	29,50 ± 13,44	0,23 ± 0,02
Comodoro	25,00 ± 8,26	0,25 ± 0,03
Marcelândia	37,17 ± 3,51	0,30 ± 0,06
N. S. Livramento	43,17 ± 15,08	0,32 ± 0,14
Poconé	66,33 ± 15,78	0,30 ± 0,04

EAG: equivalente ácido gálico, EQ: equivalente quercetina.

Oliveira (2012) encontrou maior atividade antioxidante para mel com teor mais elevado de fenólicos totais, entre 36,68 a 154,28 mg EAG 100g⁻¹ de mel. O mel dos municípios de Mato Grosso estudados na presente pesquisa apresentou uma faixa semelhante a esses teores, possivelmente o que confere potencial para atividade antioxidante.

Os teores de flavonoides encontrados nos municípios de Mato Grosso foram de 0,23 a 0,32 mg de Equivalente quercetina (EQ) /100g, inferiores ao encontrados por Meda et al.

(2005) em mel de acácia de Burkina Faso teve um teor de flavonoides totais de 6,14 mg EQ/100 g e mel multifloral entre 0,17 a 8,35 mg de EQ/100 g de mel.

Segundo Socha et al. (2009) os compostos fenólicos e flavonoides estão relacionados com a atividade antioxidante, a qual pode inibir os radicais livres responsáveis pelo envelhecimento celular.

Uma das propriedades mais interessantes do mel é a atividade antioxidante, destacando-se os ácidos fenólicos e flavonoides presentes, considerados os principais antioxidantes naturais desse alimento. A quantificação da atividade antioxidante pode ser utilizada para assegurar a qualidade e o possível potencial terapêutico dos méis (PEREIRA, 2010).

Os biomas Amazônia e Pantanal apresentam diversidade florística importante na sua vegetação que não são encontrados em outros lugares, apresentando um grande potencial a ser investigado na sua atividade antioxidante.

3.2 Atividade antibacteriana

A mínima diluição ativa (MDA) do mel para a bactéria *Escherichia coli* variou de 39,17 a 44,58% e não houve diferença entre os méis dos municípios (Tabela 2). Para *Staphylococcus aureus* a mínima diluição ativa foi de 44,58 a 52,82% e os municípios não diferiram entre si.

As amostras de mel de Mato Grosso não apresentaram sensibilidade contra a bactéria *Streptococcus pyogenes* no presente estudo.

Alvarez-Suarez et al. (2010) considerou atividade antibacteriana para os méis cubanos com mínima diluição ativa de 7,96 % v/v para *Escherichia coli* e de 4,02 % v/v para *Staphylococcus aureus*. O mel de Mato Grosso em comparação com o mel de Cuba não teve atividade antibacteriana devido às diluições serem superiores de 6 a 13 vezes maior.

O mel da Grécia apresentou a mínima diluição ativa de 15,5% p/v para *Staphylococcus aureus* (VOIDAROU et al., 2011), mesmo assim o mel de Mato Grosso tem MDA superior a este valor.

No presente estudo o mel artificial não inibiu a atividade das bactérias. Bozoni (2012) relatou que nos testes com a solução concentrada (mel artificial) não teve efeito contra nenhum microrganismo testado, portanto o resultado não atribuiu ao efeito osmótico.

Hannan et al. (2009) não confirmam 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.

Tabela 3. Mínima diluição ativa (MDA) em % p/v \pm desvio padrão dos méis da abelha (*Apis mellifera*) dos municípios de Mato Grosso, safra de 2012/2013, pela metodologia em difusão em disco.

Municípios	<i>Escherichia coli</i> ¹	<i>Staphylococcus aureus</i> ²
Alta Floresta	44,58 \pm 178,75	44,58 \pm 173,93
Cáceres	44,58 \pm 163,98	44,58 \pm 87,14
Comodoro	44,58 \pm 46,99	44,58 \pm 46,97
Marcelândia	---	44,58 \pm 37,83
Nossa Senhora do Livramento	---	44,58 \pm 61,31
Poconé	39,17 \pm 71,41	52,82 \pm 291,01

--- Zona <6mm. ¹Médias na coluna não diferiram pelo teste F (p=0,16). ²Médias na coluna não diferiram pelo teste de Kruskal-Wallis (p=0,54).

A bactéria *Escherichia coli* apresentou baixa sensibilidade ao mel de Mato Grosso com zona de inibição de 6,0 a 9,64 mm, sem diferença entre os municípios (Tabela 3). Para *Staphylococcus aureus* a zona de inibição do mel foi maior 6,0 a 13,77 mm, com a maior inibição no mel de Marcelândia, que diferiu de todos os outros cinco municípios.

A zona de inibição média de *Staphylococcus aureus* dos méis dos municípios estudados de Mato Grosso foi aproximadamente 6,0 mm exceto para Marcelândia, que apresentou aproximadamente 8,0 mm (Figura 2), com amplitude máxima de 13,77 mm.

Peralta (2010) observou zona de inibição para *Staphylococcus aureus* de 28,0 a 52,0 mm, superior ao mel de Mato Grosso, aproximadamente 3 vezes maior, por isso as diluições mínimas inibitória do mel de Mato Grosso foram consideradas sem atividade antibacteriana eficiente para essa bactéria.

Basualdo (2007) verificou diâmetro médio das zonas de inibição de *Staphylococcus aureus* de 17,1 mm para mel in natura e de 13,2 mm par mel embalado para comercialização, demonstrando que o mel in natura é eficiente para atividade antibacteriana. As amostras de mel de Marcelândia (MT) apresentaram zona de inibição semelhante ao mel embalado, o que não confere potencial antibacteriano para essa bactéria.

Tabela 4. Zona de inibição, em (mm), \pm desvio padrão das amostras de méis da abelha *Apis mellifera* dos municípios de Mato Grosso, safra de 2012/2013, pela metodologia em difusão em disco.

Municípios	<i>Escherichia coli</i> ¹	<i>Staphylococcus aureus</i> ²
Alta Floresta	6,03 \pm 0,11	6,03 \pm 0,11 ^a
Comodoro	6,53 \pm 1,11	6,53 \pm 1,11 ^a
Nossa Senhora do Livramento	6,00 \pm 0,00	6,03 \pm 0,10 ^a
Cáceres	6,02 \pm 0,11	6,14 \pm 0,44 ^a
Marcelândia	6,00 \pm 0,00	7,99 \pm 2,61 ^b
Poconé	6,09 \pm 0,23	6,10 \pm 0,20 ^a

¹Médias na coluna não se diferiram pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5%. ²Médias na coluna diferiram pelo teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5%. Letras iguais não diferiu entre si pelo teste de Wilcoxon ao nível de 5%.

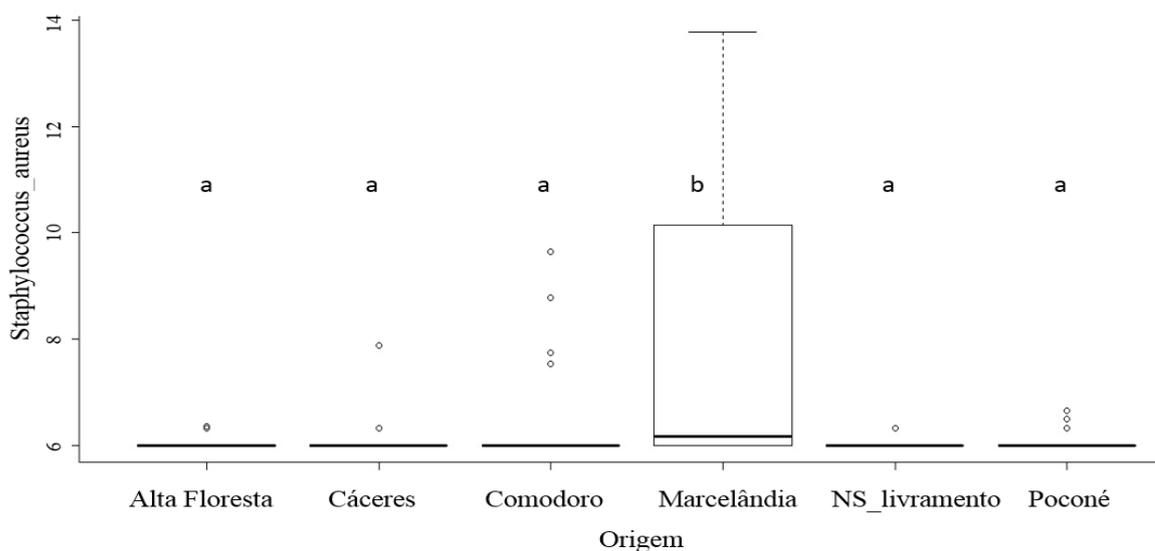


Figura. 2. Zona de inibição (mm) sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* das amostras de méis dos municípios do estado de Mato Grosso. (Teste Kruskal-Wallis, $P= 0,01$). Letras iguais não diferentes entre si pelo teste de Wilcoxon ao nível de 5%.

As bactérias no presente estudo apresentaram sensibilidades aos antibióticos comerciais testados, com zona de inibição média dos dois antibióticos para *Staphylococcus aureus* de 33,26 mm; para os dois antibióticos contra *Streptococcus pyogenes* de 27,27 mm e para os dois antibióticos contra *Escherichia coli* de 22,61 mm.

4. CONCLUSÃO

O teor de fenólicos totais no mel de Mato Grosso foi considerado com potencial à para atividade antioxidante a ser investigado.

O mel dos municípios de Mato Grosso não tem atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Streptococcus pyogene*.

5. REFERÊNCIAS

- ADCOCK, D. The effect of catalase on the inhibine and peroxide values of various honeys. **Journal of Apicultural Research**. 1:38-40, 1962.
- 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 mono floral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. **Food and Chemical Toxicology**. 48:2490-2499, 2010.
- BASUALDO, C.; SGROY, V.; FINOLA, M. S.; MARIOLI, J. M. Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. **Veterinary Microbiology**. 124:375–381, 2007.
- BAZONI, M. O. **Atividade antimicrobiana dos méis produzidos por *Apis mellifera* e abelha sem ferrão nativa do Brasil**. São Paulo: Faculdade de medicina de Ribeirão Preto, 2012. 116. Tese de Doutorado (Programa de pós-graduação em Genética).
- BORSATO, D. M.; CRUZ, M.C.R.; ALMEIDA, M.M. Atividade antimicrobiana de méis comercializados na região dos Campos Gerais. 10:48-53, 2009.
- FERRONATTO, R.; MARCHESAN, E. D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D. C. e *Baccharis uncinella* D. C. (Asteraceae). **Revista Brasileira Farmacognosia**. 17:224-230 2007.
- GOMES, S. P. M. **Caracterização e Avaliação Biológica de Méis Comerciais**. Instituto Politécnico Bragança. Dissertação (Qualidade e Segurança Alimentar). Bragança, São Paulo, 67 ff., 2009.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectiva para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**. 33:667-679, 2010.
- HANNAN, A.; BARKAAT, M.; USMAN, M.; GILANI, W. A.; SAMI, W. In Vitro Antibacterial Activity of Honey Against Clinical Isolates of Multi-Drug Resistant Typhoidal Salmonellae. **Pakistan Journal of Zoology**, 41:1-6, 2009.
- HSUEH, P.; CHEN, W.; LUH, K. 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, 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2013). Síntese das informações 2013/2015. <http://www.cidades.ibge.gov.br/comparamun/compara.php?lang=&coduf=51&idtema=135&codv=v19&search=mato-grosso|pocone|sintese-das-informacoes-2013#>. Acesso em 11, de maio, 2015.

KHALIL, M. I.; ALAM, N.; MONIRUZZAMAN, M.; SULAIMAN, S. A.; GAN, S. H. Phenolic Acid Composition and antioxidant properties of malaysian honey. **Journal of Food Science**. 76:921-928. 2011.

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

LEE, H.; CHUREY, J. J.; WOROBO, R. W. Antimicrobial activity of bacterial isolates from different floral sources of honey. **International Journal of Food Microbiology**. 126: 240-244, 2008.

LIANDA, R. L. P.; SANT'ANA L. D'O.; ECHEVARRIA A. & CASTRO R.N. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Brazilian Honeys and their Extracts. **Journal Brazilian Chemical Society**. 23:618-627, 2012.

MADDOCKS, S. E.; LOPEZ, M. S.; ROWLANDS, R. S. COOPER, R. S. Manuka honey inhibits the development of streptococcus pyogenes biofilms and causes reduced expression of two fibronectin binding proteins. **Microbiology**. 158:781-790, 2012.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. G. 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, 2005.

MILFONT, M. O.; FREITAS, B. M.; RIZZARDO, R. A, G.; GUIMARAES, M. O. Produção de mel por abelhas africanizadas em plantio de mamoneira. **Ciência Rural**. 39:1206-1211, 2009.

MOLAN, P. C. The antibacterial nature of honey. 1. The nature of the antibacterial activity. **Bee World**. 73: 5-28, 1992.

MOUSSA, A.; NOUREDDINE, D.; MOHAMED, H. S.; ABDELMELEK, M.; SAAD, A. Antibacterial activity of various honey types of Algeria against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pyogenes*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. 773-776, 2012.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Wayne: Pennsylvania, 2003.

OLIVEIRA, P. S.; MULLER, R. C. S.; DANTAS, K. G. F.; ALVES, C. N. Ácidos Fenólicos, Flavonoides e Atividade Antioxidante em Méis de *Melípona fasciculada*, *M. flavolineata*, (apidae, Meliponini) E *Apis melífera* (Apidae, Apini) da Amazônia. **Química Nova**, 35: 1728-1732. 2012.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 18: 301-307, 2008.

PEREIRA, M. A. **Perfil Cromatográfico das Substâncias Fenólicas Presentes em Extratos de Mel de Assa Peixe e Avaliação de seu Poder Antioxidante**. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2010. 77 p. Monografia.

RIZELIO, V. M. **Composição, atividade antioxidante e o uso da eletroforese capilar como alternativa na avaliação da qualidade**. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina, 2011. (Dissertação de Mestrado).

SABATIER, S.; AMIOT, M. J.; TACCHINI, M.; AUBERT, S. Identification of Flavonoids in Sunflower Honey. **Journal of Food Science**. 57:773-777, 1992.

SHERLOCK, O.; DOLAN, A.; ATHMAN, R.; POWER, A.; GETHIN, G.; COWMAN, S.; HUMPHREYS, H. Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Complementary & Alternative Medicine**. 10:1472-6882, 2010.

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

SILVA, R. A.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; COSTA, J. M. C. Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha. **Alimentos e Nutrição**. 17:113-120, 2006.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**. 16: 144, 1965.

SOCHA, R.; JUSZCZAK, L.; PIETRZYK, S.; FORTUNA, T. Antioxidant activity and phenolic composition of herbhoneys. **Food Chemistry**. 113: 568-574, 2009.

VANDAMME, L.; HEYNEMAN, A.; HOEKSEMA, H.; VERBELEN, J.; MONSTREY, S. Honey in modern wound care: A systematic review. **SciVerse ScienceDirect**. 39: 1515-1523 2013.

VARGAS, T. **Avaliação da Qualidade do Mel Produzido na Região dos Campos Gerais do Paraná**. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2006. 148. Dissertação para a obtenção de título de mestre em Ciências e Tecnologia de Alimento.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. **Características do Mel**. Universidade Federal do Espírito Santo- UFES. Pró Reitoria de Extensão. Boletim Técnico – PIE-UFES: 01107- editado 18.08.2007.

VIDAL, M.G.; SANTANA, N. S.; VIDAL, D. Flora Apícola e Manejo de Apiários na Região do Recôncavo sul da Bahia. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**. 6: 503-509, 2008.

VIEIRA, J. M. S.; SARAIVA, R. M. C.; MENDONÇA, L. C. V.; FERNANDES, V. O.; PINTO, M. R. C.; VIEIRA, A. B. R. Suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de infecções do trato urinário de pacientes atendidos no Hospital Universitário Bettina Ferro de Souza. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. 39: 119-121, 2007.

VOIDAROU, C.; ALEXOPOULOS, A.; PLESSAS, S.; KARAPANOU, A.; MANTZOURANI, A.; STAVROPOULOU, E.; FOTOU, K.; TZORA, A.; SKOUFOS, I.; BEZIRTZOGLU, E. Antibacterial activity of different honeys against pathogenic bacteria. **Anaerobe**. 17:375-379, 2011.

ZANATTA, G. F.; KANASHIRO, A. M. I.; CASTRO, A. G. M.; CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; PULICI, S. C. P. Suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária a antimicrobianos. **Arquivos do Instituto Biológico**. 71:283-286, 2004.

6. APÊNDICES

Apêndice A. Valores padronizados para curva de ácido gálico usada para quantificar os fenóis totais presentes nas amostras de mel.

Níveis de concentração	Solução padrão de ácido gálico (µL)	Balão de diluição (mL)	Concentração final (µL/mL)	Volume reativo de Folin/mL	Solução de Na ₂ CO ₃ (mL)
Branco	0	10	0	0,5	1,5
1	2	10	0,2	0,5	1,5
2	6	10	0,6	0,5	1,5
3	8	10	0,8	0,5	1,5
4	10	10	1	0,5	1,5
5	20	10	2	0,5	1,5
6	30	10	3	0,5	1,5
7	50	10	5	0,5	1,5
8	75	10	7,5	0,5	1,5
9	100	10	10	0,5	1,5

Apêndice B. Valores padronizados para curva de quercetina usada para quantificar os flavonoides totais presentes nas amostras de mel.

Níveis de concentração	Solução estoque de quercetina (μL)	Balão de diluição (mL)	Concentração final injetada (mg/mL)	Cloreto de alumínio 2% (mL)
Branco	0	10		3
1	2	10		3
2	4	10		3
3	6	10		3
4	8	10		3
5	10	10		3
6	15	10		3
7	20	10		3
8	25	10		3
9	30	10		3
10	40	10		3