CAROL VIVIANA SERNA GONZÁLEZ

AVALIAÇÃO DO MEL DE *APIS MELLIFERA* NA CICATRIZAÇÃODE FERIDAS CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2016

CAROL VIVIANA SERNA GONZÁLEZ

AVALIAÇÃO DO MEL DE *APIS MELLIFERA* NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientadora: Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos

Versão original

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Serna González, Carol Viviana
Avaliação do mel de Apis Mellífera na cicatrização de feridas cutâneas em Camundongos diabéticos / Carol Viviana Serna González; orientadora Marinilce Fagundes dos Santos. -- São Paulo, 2016.
93 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Apiterapia: Mel. 2. Cicatrização de feridas. 3. Camundongos. 4. Diabetes Mellitus. 5. Tratamento experimental de feridas. I. Fagundes dos Santos, Marinilce , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Carol Viviana Serna González

Titulo da Dissertação/Tese: Avaliação do mel de Apis Mellífera na cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos

Orientador: Profa. DraMarinilce Fagundes dos Santos

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **44** nas fls. **18** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Marinilce Fagundes dos Santos,** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Avaliação de produtos de aplicação tópica e oral na cicatrização de feridas cutâneas de camundongos diabéticos*" do qual participam o(s) aluno(s) **Carol Viviana Serna González, Ana Flávia Marçal Pessoa, Juliana Costa Florim,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **18.08.2014, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 19 de agosto de 2014.

Prof. Dr. ANDERSON DE SÁ NUNES
Vice-Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Á minha família: Paola, Nelly e Felipe,

Aos meus gatos Antônia, Fonce, Oliver e Samuel

Dedico

AGRADECIMENTOS

À*Deus* por permitir que meus sonhos se tornassem uma realidade; por sempre ser meu lugar de descanso.

A todos os *Brasileiros* que com seus impostos fazem possível a pesquisa, o ensino e o intercâmbio internacional na Universidade Pública, do qual me beneficiei como Colombiana.

À *Universidade de São Paulo* e nela ao Instituto de Ciências Biomédicas e à Escola de Enfermagem por ter me acolhido nestes anos de formação no Brasil.

Ao *Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento* pela abertura multidisciplinar.

Às agências de fomento *CAPES, FAPESP e CNPq* pelo financiamento pessoal e do laboratório.

À minha orientadora *Marinilce* por ter falado “sim” para minha idéia de projeto, pela sua infinita paciência, pelos ensinamentos sobre como ser uma grande cientista e por cada esforço para que o nosso laboratório e as pessoas nele dêem frutos.

À *Gabriella Moraes Malheiros*, grande bióloga e técnica do nosso laboratório, por me ensinar todos os procedimentos necessários para meu projeto, pelo suporte experimental e pelos carinhosos abraços.

Ao *Álvaro* por ter suportado comigo todo um semestre de experimentos trabalhando inclusive nos finais de semana.

À *Cilene* por ser um grande exemplo como cientista, pelas aulas sobre planejamento experimental e pela motivação contínua. Você é uma fonte de energia inesgotável.

À *Cibele* por sua amizade e companhia. Você é um exemplo de superação e excelência.

Ao Douglas por me ensinar português de rua e por descontrair nossas tardes no laboratório.

À *Mariana, Maíra, Kelly, Carol, Robson e Luana* pelo convívio no laboratório e pelos agradáveis momentos.

À *Ana Flavia Pessoa* e *Juliana Florim* pela construção e caracterização do modelo experimental e resultados preliminares. Os seus projetos são de grande relevância para a área clínica: os pacientes e pessoal clínico agradecem. Jú, a organização do seu caderno experimental tornou possível a replicação dos protocolos, muitíssimo obrigada.

Às colegas de Departamento *GabriellaLustoza e Ana Carolina Ralph* pela amizade, caronas, almoços e presentes desde Manaus.

À *Emília Ribeiro* pelos ensinamentos sobre técnicas histológicas e à *Fernanda Barrence* pelo treinamento em histologia e por ter feito o processamento e coloração das minhas amostras.

Ao professor *Jose Roberto Cunha da Silva* e seus alunos por me permitir usar os equipamentos para processamento histológico.

À professora *Patricia Gama* e suas aulas, por compartilhar seus conhecimentos sobre microscopia óptica e me permitir usar o microscópio.

À *Regina Valbom* pelo excelente trabalho administrativo e sempre me lembrar das datas importantes.

À professora *Ligia Bicudo de Almeida Muradian* por abrir as portas do seu laboratório de Análise de Alimentos na FCF-USP, por compartilhar sua experiência e conhecimentos sobre a caracterização físico-química do mel. Agradeço na sua equipe: à *Luciene Lauer* por construir e validar os protocolos experimentais, pelos ensinamentos sobre técnicas de laboratório, análise de dados e química. Ao *Jose Augusto Gasparoto* pelas idéias inovadoras e ao *Elias Araujo* pelos ensinamentos em CLAE e por ter feito alguns dos experimentos.

Ao professor *AroniSattler*e ao Laboratório de Apicultura (LABAPIS) do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pela doação das amostras.

À *Kelly Nascimento* por me ensinar e me auxiliar na obtenção dos resultados. Também pelas receitas vegetarianas, as dicas nutricionais e a linda amizade.

À professora *Marcia Pinto Alves Mayer*e ao pesquisador*Bruno Bueno-Silva* pelos ensinamentos sobre metodologias microbiológicas e à disponibilidade em fazer parceria conosco.

Aos profissionais da *Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas* pela sua dedicação em revisar e corrigir este texto.

Aos professores que participaram da banca avaliadora de qualificação por aprimorar este projeto com suas sugestões: *Viviane Carvalho, Fávio Siviero e Maria Inês Borella.*

À professora *Vera Lucia Santos* da EEUSP pela recomendação inicial de fazer este projeto nas ciências básicas, usando modelo animal. Por ter sido minha primeira orientadora no Brasil e ser um exemplo de excelência.

À professora *Sandra Guerrero* da UNAL pelos ensinamentos, por ter me introduzido na área de cuidado de feridas e por ter sido a principal ponte para que eu pudesse vir ao Brasil.

À *Mily Moreno* e *Angela Mariño* pela primeira experiência de pesquisa no tratamento de feridas com mel na *Fundación Hospital de La Misercodia*. Obrigada por vivenciar comigo cada momento que nos tornou enfermeiras de coração.

À *Luciana Pacheco* por acreditar nas minhas ideias e pelas experiências clínicas de cuidado de feridas no Hospital Pediátrico Darcy Vargas.

À *Erika León, Margarita Ortiz, Arthur Menezes* por ser parte da minha família no Brasil.

À *Danielle Costa* pelo apoio incondicional, pelo *personalcoaching* e pela amizade.

À minha irmã e confidente *Paola* por ser quem semeou e apoiou todos os meus grandes projetos desde o início e por fazer de mim seu principal projeto. Você é meu mais importante exemplo de vida.

À minha mãe *Nelly* pelo grande amor, os ensinamentos de vida, os sacrifícios, e cada cuidado fornecido com amor e paciência. Você foi minha primeira e mais ilustre professora.

Ao meunamorado *Felipe* por cuidar de mim cada dia desde minha chegada ao Brasil, pelas suas deliciosas comidas, inteligentes conversas e por me ensinar a amar as plantas e os animais.

A todos os animais que fizeram parte do meu mestrado principalmente os *camundongos*.

Os animais são inocentes; os humanos só tinhamum trabalho: cuidar deles...

RESUMO

GONZÁLEZ, C. V. S.**Avaliação do mel de *Apis Mellífera* na cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos.** 2016. 94f.Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Feridas crônicas de difícil cicatrização em pessoas com Diabetes Mellitus (DM) têm sido associadas com o estresse oxidativo causado pela hiperglicemia crônica. O mel de abelhas foi descrito como tendo propriedades terapêuticas na cicatrização devido as diferentes propriedades, p.ex. antioxidação. Este estudo teve como principal objetivo avaliar os efeitos da aplicação tópica do mel de Eucalipto (ME) do Brasil em feridas cutâneas de camundongos diabéticos e comparar os resultados com aqueles obtidos com o mel de Manuka da Nova Zelândia (MK); um padrão internacional. Métodos: Estudo experimental usando camundongos Swiss adultos machos induzidos ao DM com Aloxana. Após 30 dias, foram realizadas feridas cutâneas dorsais de 1 cm^2 (espessura total), que foram diariamente tratadas com os méis mencionados, utilizando como controles o mel artificial (MA) e a ausência de tratamento. A cinética da cicatrização e a análise histológica foram aferidas, assim como as características físico-químicas e propriedades antioxidantes das amostras de mel. O protocolo de pesquisa foi aprovado pela comissão de ética do ICB/USP. Os tratamentos com ME e MK aceleraram o fechamento das feridas dos animais diabéticos de 18 para 15 dias, similar aos animais controles (tratados ou não tratados). O tratamento com MA não teve o mesmo efeito. A análise histológica das feridas, no dia 3 mostrou um melhor aspecto da lesão nos animais diabéticos tratados com mel, comparado com os diabéticos não tratados. Aparentemente, o ME e o MK promoveram maior recrutamento de células inflamatórias para a lesão. No dia 15, apenas os animais controle e os diabéticos tratados com ME e MK apresentaram reepitelização completa. Quanto à análise das amostras de mel, ME em comparação ao MK, teve menor concentração de ácidos fenólicos (109,6 ± 2,3 vs. 171,6 ± 5,9 vs. 22,7 ± 0,9 $mg.100g^{-1}$ para o mel artificial) e maior capacidade antioxidante (36,5±2,1 vs. 22,6±1,6 vs $mg.L^{-1}$; não detectada no mel artificial). Como conclusão, este estudo mostra que o ME e o MK promovem a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos, provavelmente pela presença de ácidos fenólicos e flavonóides entre outros compostos, promovendo a atividade antioxidante.

Palavras-chave: Mel de abelhas. Apiterapia. Cicatrização. Feridas. Diabetes Mellitus. Antioxidante.

ABSTRACT

GONZÁLEZ, C. V. S. **Evaluation of bee*Apis Mellífera* honey in the healing of cutaneous wounds in diabetic mice.** 2016. 94 f. Dissertation *(*Mastherthesis in CellandTissueBiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Difficult-to-heal, chronic wounds in people with Diabetes Mellitus (DM) have been associated with oxidative stress caused by chronic hyperglycemia. Bee honey was described as having therapeutic properties in healing due to different properties, i.e. antioxidation. This study aimed to evaluate the effects of topical applications of Eucalyptus Honey (EH) from Brazil on cutaneous wounds of diabetic mice compared to the results obtained with Manuka's honey from New Zealand (MH); an international standard. Methods: Experimental study using Swiss adult, male mice induced to DM using Alloxan. After 30 days, dorsal cutaneous wounds of 1 cm^2 (total thickness) were performed and were treated daily with the said honeys, using as controls the artificial honey (AH) and the absence of treatment. The wound healing kinetics and histological analyses were assessed, as well as the physicochemical and antioxidant properties of honey samples. The research protocol was approved by the ethics committee of the ICB / USP. Treatments with EH and MH accelerated the closure of wounds in diabetic animals from 18 to 15 days, similar to the control animals (treated or untreated). Treatment with AH did not have the same effect. Histological examination of the wounds on day 3 showed a better appearance of the lesion in the diabetic animals treated with honey, compared to untreated diabetics. Apparently, the EH and MH promoted increased recruitment of inflammatory cells to the lesion. On the 15th day, only the control animals and diabetics treated with EH and MH showed complete epithelialization. Concerning the analysis of honey samples, EH compared to MH, had lower concentrations of phenolic acids (109.6 ± 2.3 vs. 171.6 ± 5.9 vs. 22.7 ± 0.9 mg / 100 g for artificial honey) and higher antioxidant capacity (36.5 ± 2.1 vs. 22.6 ± 1.6 vs mg / L; not detected in artificial honey). In conclusion, this study shows that the EH and MH promote the healing of skin wounds in diabetic mice, probably by the presence of phenolic acids and flavonoids between other compounds, promoting antioxidant activity.

Keywords: Bee honey. Apitherapy. Wound healing. Diabetes Mellitus. Antioxidant.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Distribuição dos animais segundo modelo experimental 31
Tabela 2- Relação das amostras de mel analisadas por tipo e região.....35
Tabela 3 -Análise físico-química de indicadores de qualidade e de atividade antioxidante em amostras de mel.....42
Tabela 4- Caracterização dos animais de experimentação 56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Capacidade antioxidante de amostras de mel.....43
Figura 2 - Identificação e quantificação de açúcares presentes em amostras de mel de Manuka e de Eucalipto 45
Figura 3 - Análise de pH e Acidez Livre.....46
Figura 4 - Concentração de HMF em amostras de mel. 47
Figura 5 - Teor de Umidade.....48
Figura 6 - Classificação das amostras de mel por cor 49
Figura 7 - Capacidade de absorção do radical oxigênio ORAC 50
Figura 8 - Determinação do poder redutor de Ferro-FRAP 51
Figura 9 - Sequestro do radical estável DPPH 52
Figura 10 - Capacidade redutora do Folin-Ciocalteu. Fenólicos totais 53
Figura 11 - Concentração de flavonóides totais 54
Figura 12 - Análise histológica da pele pré-lesão de camundongos controles e diabéticos 57
Figura 13 - Cinética da cicatrização de animais diabéticos e controles não tratados.59
Figura 14 - Cinética da cicatrização de animais tratados com mel de Manuka 61
Figura 15 - Cinética da cicatrização de animais tratados com mel de Eucalipto 63
Figura 16 - Cinética da cicatrização de animais tratados com mel artificial.....65
Figura 17 - Comparação da cinética da cicatrização entre os diferentes tratamentos67
Figura 18 - Análise histológica das feridas dos animais controles e diabéticos no 3° dia de cicatrização.....70
Figura 19 - Análise Histológica das feridas dos animais controles e diabéticos no 15° dia de cicatrização.....73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA – *American Diabetes Association*

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CFT- Conteúdo de fenólicos totais

DATASUS – Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde do Brasil

DM – Diabetes mellitus

DPPH – 2,2 –difenil- l -picrilhidrazil

ECM – *Extracellularmatrix*

EAG – Equivalente de ácido gálico

EQ – Equivalente de Quercetina

ET – Equivalente Trolox

FRAP – *Ferric reducing ability plasma*

HMF– Hidroximetilfurfural

HPLC – *High performance liquid chromatography*

IHC – *International Honey Comission*

IWGDF–*International Working Group on the Diabetic Foot*

MMPs – *Matrix metalloproteases*

ORAC – Capacidade de absorção do radical oxigênio

pH – PotencialHidrogeniônico

ROS – *Reactive oxygen species*

RNS – *Reactive nitrogen species*

SBCAL – Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes

WHO – *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

1.1 Diabetes Mellitus no contexto internacional e Nacional 19
1.2 Feridas cutâneas decorrentes do Diabetes Mellitus 20
1.3 Processo de cicatrização no Diabetes Mellitus 21
1.4 Tratamento de feridas nas pessoas com Diabetes Mellitus 21
1.5 Compostos à base de glicídeos no tratamento de feridas 23
1.6 Mel no Tratamento de Feridas 24

2 OBJETIVOS 29

2.1 Objetivo Geral 29
2.2 Objetivos Específicos 29

3 MATERIAIS E MÉTODOS 30

3.1 Materiais 30
3.2 Animais 30
3.3 Indução do Diabetes Mellitus (DM) 31
3.4 Confecção da ferida 32
3.5 Tratamentos tópicos 32
3.5.1 Escolha dos produtos para tratamento tópico *32*
3.5.2 Protocolo de Aplicação *33*
3.6 Análise do processo de cicatrização 34
3.6.1 Cinética do fechamento das feridas *34*
3.6.2 Análises Histológicas *34*
3.7 Análises físico-químicas das amostras de mel 35
3.7.1 pH e Acidez Livre *35*
3.7.2 Concentração de Hidroximetilfurfural (HMF) *36*
3.7.3 Classificação de Cor *36*
3.7.4 Teor de umidade *36*
3.7.5 Concentração de Açúcares *37*

3.7.6 Fenólicos Totais *37*
3.7.7 Flavonóides Totais *38*
3.7.8 Atividade Antioxidante *38*
3.7.8.1 Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) 38
3.7.8.2 Sequestro do radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) 39
3.7.8.3 Determinação do poder redutor do ferro – Método FRAP 39
3.8 Análise Estatística 40

4 RESULTADOS 41

4.1 Caracterização físico-química das amostras de mel 41
4.1.1 Escolha do mel para tratamento experimental *41*
4.1.2 pH e Acidez Livre *46*
4.1.3 Hidroximetilfurforal *47*
4.1.4 Umidade *48*
4.1.5 Cor *49*
4.1.6 Atividade antioxidante das amostras de mel por ORAC *50*
4.1.7 Atividade antioxidante das amostras de mel por FRAP *51*
4.1.8 Atividade antioxidante das amostras de mel por DPPH *52*
4.1.9 Teor de Fenólicos totais *53*
4.1.10 Teor de Flavonoides totais *54*
4.2 Caracterização dos animais de experimentação 55
4.3 Cicatrização de animais diabéticos e controles não tratados 58
4.4 Atividade biológica do mel de Manuka na cicatrização de feridas 60
4.5 Atividade biológica do mel de Eucalipto na cicatrização de feridas 62
4.6 Atividade biológica do mel artificial na cicatrização de feridas 64
4.7 Comparação da cinética da cicatrização do mel de Manuka, Eucalipto e Mel Artificial 66
4.8 Morfologia do dia 3º das feridas dos animais controles e diabéticos tratados com mel de *Apis Mellífera* e mel artificial 68
4.9 Morfologia do dia 15º das feridas dos animais controles e diabéticos tratados com mel de Eucalipto, mel de Manuka e mel artificial 71

5 DISCUSSÃO 74

5.1 **O Mel Brasileiro de Eucalipto tem características com potencial bioativo** 74
5.2 **O mel de Eucalipto tem capacidade antioxidante relevante** 78
5.3 **O Mel de Manuka e de Eucalipto favorecem a cicatrização cutânea em camundongos diabéticos** 80

6 CONCLUSÃO 87

REFERÊNCIAS 88

1 INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Mellitus no contexto internacional e Nacional

O Diabetes Mellitus (DM) acomete cerca de 422 milhões de pessoas em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016), sendo a causa de 5,2% dos óbitos (5ª principal causa de morte), devido às suas variadas complicações, destacando-se as cardiovascularese cerebrovasculares(SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2015). Segundo estes dados, a doença configura-se na atualidade como uma epidemia de alto impacto em países em desenvolvimento, onde vivem cerca de dois terços das pessoas diagnosticadas no mundo. No Brasil, como país emergente, o comportamento epidemiológico da doença nas últimas décadas caracterizou-se pelo aumento exponencial da incidência, seguido pelo aumento da população idosa e a prevalência de obesidade e sedentarismo, coexistindo com o desafio que as doenças infecciosas ainda representam (WILD; ROGLIC; GREEN, 2004). Segundo a SBD (2014), existem no país atualmente 12.054.827 pessoas diabéticas; segundo o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde do Brasil, no setor público foram diagnosticadas 1.036.007 pessoas no período de janeiro de 2008 a abril de 2015, com maior incidência na região sudeste (35% dos casos) seguida pela região nordeste (31% dos casos); no estado de São Paulo foram diagnosticados 164.010 casos no mesmo período.

O DM é definido como um grupo de distúrbios metabólicos caracterizado por hiperglicemia crônica (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014), independentemente de sua etiologia. Fatores genéticos (p.ex. a herança familiar) e ambientais (p.ex. o estilo de vida) são determinantes no estabelecimento desta doença. As principais complicações relatadas são a retinopatia diabética, doença renal crônica, doenças cardiovasculares, maior susceptibilidade a infecções, neuropatia diabética e atraso na cicatrização de feridas, foco deste trabalho.

1.2 Feridas cutâneas decorrentes do Diabetes Mellitus

As feridas cutâneas são definidas como uma alteração da integridade dos tecidos cutâneos causada por agentes externos (físicos ou químicos) ou internos (p.ex. derivados de patologias) (BRYANT; NIX, 2007). O processo de cicatrização ocorre em 3 etapas principais: inflamação (incluindoa coagulação), formação do tecido de granulação e remodelação tecidual (KONDO; ISHIDA, 2010; GURTNER et al., 2008). Normalmente, este processo dura em média 20 dias para restaurar a barreira física da pele e até 1 ano para recuperar a resistência mecânica prévia. No DM, no entanto, o tempo de cicatrização pode-se estender até meses, anos ou simplesmente não ser concluído.

Nas pessoas diabéticas, feridas localizadas nos membros inferiores são frequentes, decorrentes de traumas, uma vez que a sensibilidade cutânea está diminuída devido à neuropatia periférica. A ferida rapidamente se cronifica em resposta a diversos fatores: deficiência vascular periférica, colonização do leito da ferida, infecção dos tecidos superficiais e profundos e cicatrização deficiente, podendo ocasionar a necessidade de amputação do membro ou septicemia, que pode levar ao óbito (INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE DIABETIC FOOT, 2015).

A probabilidade da pessoa com diabetes desenvolver úlceras nos membros inferiores dependerá de múltiplos fatores; atualmente a incidência anual é de 2-4% (IWGDF, 2015) e a incidência cumulativa do aparecimento de lesões é de 25% (SINGet al., 2005). Dois terços das lesões chegam a cicatrizar com taxa de recidiva de 30-40% no primeiro ano e 28% evoluem para uma amputação. Atualmente, aproximadamente a cada 20 segundos é amputada alguma parte dos membros inferiores de um paciente diabético (IWGDF, 2015), sendo que 85% das amputações são precedidas por lesões na pele (BHARARA et al., 2009).No Brasil estima-se que existam ao redor de 3.013.706 pessoas com feridas nos membros inferiores por esta etiologia, o que representa um número de 80.123 pessoas na região sudeste (DATASUS, 2014).

1.3 Processo de cicatrização no Diabetes Mellitus

No DM, a cicatrização apresenta-sealterada em todas as fases: a fase inflamatória inicia-se lentamente, com menor presença de neutrófilos e macrófagos (KOMESUet al., 2004), há menor atividade fagocitária, menor produção de citocinas e de fatores quimiotáticos; a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), no entanto, está aumentada (OCHOA et al., 2007). Na fase de granulação ocorre persistência das células inflamatórias, o que contribui para os elevados níveis das citocinas pró-inflamatórias IL1-β, TNF-α e IL-6 e de mediadores inflamatórios como as enzimas COX-2 e iNOS (WETZLER, 2000).

Ocorre também elevação de ROS(PÉREZ-MATUTE et al., 2009), diminuição de citocinas anti-inflamatórias (p.ex. IL-10) (MIRZA; KOH, 2011), redução de fatores de crescimento e consequentemente diminuição na formação de novos vasos (MARTIN et al., 2003, CERIELLO et al., 2007), aumento das metaloproteinases de matriz (MMPs) e diminuição dos seus inibidores, diminuição na síntese de colágenos fibrilares e retardo na reepitelização (ZHU et al.,2010). Na fase final de remodelação ainda se observa a persistência de células inflamatórias, com altos níveis das citocinas inflamatórias, presença de elevada atividade de MMPS e ROS. Produtos da peroxidação lipídica como o malondialdeído (MDA) e 4-hidroxi-nonenal (4-HNE) estão elevados, ao menos parcialmente, como resultado da diminuição de componentes do sistema antioxidante celular (glutationa, catalase, superóxido dismutase) (PÉREZ-MATUTE et al., 2009).

Em resumo, a cicatrização nas pessoas diabéticas está prejudicada pela alteração na resposta inflamatória e seus mecanismos de regulação, pelo desequilíbrio entre o acúmulo e degradação de componentes da matriz extracelular, pelo estresse oxidativo (maior geração de ROSe diminuição nos mecanismos antioxidantes naturais) e, finalmente, pela alteração na migração celular devido à excessiva produção de ROS(LAMERSet al., 2011).

1.4 Tratamento de feridas nas pessoas com Diabetes Mellitus

Infelizmente, além do retardo na cicatrização, a possibilidade de amputação ou recidivas após o fechamento da ferida é um dos riscos para a saúde derivados da perda da integridade tecidual. A permanência das feridas crônicas nas pessoas

diabéticas traz grande impacto negativo para suas vidas, com diminuição naqualidade de vida pelas demandas econômicas do tratamento, a perda do trabalho, o aumento na necessidade de atividades de auto-cuidado diário, o isolamento social e o desconforto pelo odor, alémda dor nos casos de infecção (JAKSA, 2010).

O tratamento das feridas em pacientes diabéticosé complexo, uma vez que abrangea resolução integral dos diferentes aspectos que convergem para o aparecimento das lesões (BOULTONet al., 2005). Dentre as intervenções mais importantes estão: avaliação periódica e tratamento dos níveis glicêmicos, cuidados para prevenção cardiovascular, acompanhamento das neuropatias e vasculopatias nos membros inferiores e tratamento tópico específico para cada uma das necessidades da ferida, segundo suas características: desinfecção e descolonização, tratamento com antioxidantes, estímulo da granulação, estímulo da epitelização, proteção da pele sadia e, finalmente, a reabilitação da pessoa com ferida ou coto de amputação para suas atividades da vida diária e convivência social.

A atenção integral sobre aferida é chave, então, para a prevenção das amputações e da disseminação das infecções (BHARARA et al., 2009). Atualmente, diversas terapias são utilizadas em complementação à abordagem sistêmica e até cirúrgica, mas nem sempre com sucesso. Em geral, estas terapias complementares geram um custo de tratamento inviável para o perfil socioeconômico predominante das pessoas com DMe representando uma carga que os sistemas de saúde dos países em desenvolvimento não podem financiar completamente (BOULTONet al., 2005).

O guia internacional sobre o uso de intervenções para melhora da cicatrização das feridas crônicas nos pés de pessoas com DM (IWGDF, 2015a) preconiza a limpeza frequente, o desbridamento e o uso de coberturas para gerenciamento do exsudato como principais atividades de cuidado da lesão. Apenas após atingir uma aderência adequadarecomenda-se o uso de terapias complementares, devido ao fato de que estas carecem, muitas vezes, de evidências científicas conclusivas e de qualidade sobre sua eficiência.

Exemplos destas terapias mencionados no guia são o uso de câmara hiperbárica, pressão negativa (indicada após abordagem cirúrgica das lesões) e produtos cujo alvo é o estímulo biológico dos tecidos envolvidos na cicatrização alterada: matriz de colágeno e celulose controladoras da atividade deMMPs, matriz acelular derivada do intestino suíno, fatores de crescimento derivados de plaquetas (autólogos e heterólogos),fatores derivados de fibroblastos e fator de crescimento epidérmico,utilização de pele confeccionada *in vitro* (cultura de queratinócitos e fibroblastos autólogos) e o uso de injeções intramusculares contendo vetores com o gene do fator de crescimento vascular endotelial (IWGDF, 2015b).

1.5 Compostos à base de glicídeos no tratamento de feridas

Além das terapias mencionadas anteriormente, vários estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de oferecer opções mais acessíveis às pessoas diabéticas combaixos recursos socioeconômicos.Um exemplo é o uso do açúcar,documentado desde a antiguidade, no tratamento de feridas de diversas etiologias, devido aoseu poder antisséptico (FORREST, 1982). Biswaset al. em 2010 relataram,em uma revisão, o potencial deste produto e suas aplicações nas feridas diabéticas, destacando os seguintes efeitos: hiperosmolaridade local (favorece a formação de tecido de granulação e reduz o edema), efeito bacteriostático devido ao pH e baixo teor de umidade(dificulta o crescimento de microrganismos) (LISLE, 2002; KILIC, 2001).

Estes resultados contradizemuma crença geral sobre apotencial ação hiperglicêmica do açúcar tópico na lesão, que poderia dificultar a cicatrização e agravar a doença (VELANDERet al., 2008). Segundo o autor, o açúcar (sacarose) não pode ser metabolizado fora do intestino, o que impede que seja absorvido localmente, chegando ao sangue como glicose e promovendo efeitos sistêmicos. Vários estudos clínicos com séries de casos reportam a resolução de 99% das infecções locais e média de tempo de cicatrização de 5 semanas, eliminação do odor e desbridamentodo tecido necrótico (HERSZAGE et al., 1980; VIAU et al., 1986; KILIC, 2001; LISLE, 2002); nenhum destesestudos reportou hiperglicemia como complicação. O açúcar foi descrito considerado seguro, custo-efetivo, de fácil auto-aplicação e como um tratamento alternativo ao tratamento de feridas diabéticas.

Atualmente existem vários grupos de investigação em universidades e empresas farmacêuticas interessados na utilização do mel como produto fitoterapêutico, expandindouma nova área denominada Apiterapia. Um dos méis que têm sido utilizados em apiterapia é o mel de Manuka, descoberto em 1981, produzido pelas abelhas *Apis mellifera* a partir do néctar coletado da árvore *Leptospermumscoparium* (Myrtaceae-Manuka), nativa da Nova Zelândia (MOLAN, 2014). Este mel monofloral atualmente é o único aceito para apiterapia em países como a Austrália e Estados Unidos da América (MOLAN, 2006).

O mel de Manukatraz consigo uma elevada atividade antibacteriana, atribuída aos seus componentes não-peróxido (diferentes dos glúcidos) que, juntos, formam o fator único Manuka (UMF). Um estudo recente, no entanto, descreveu alguns tipos de mel brasileiro (monofloral ou multifloral) como potenciais produtos terapêuticos quando comparados ao mel de Manuka, possuindo inclusive propriedades microbicidas superiores (BAZONI, 2012). Não foi possível, naquele estudo, no entanto, determinar se o mel multifloral teria propriedades diferentes dos monofloraisanalisando a atividade animicrobiana exclusivamente. O mel multifloral está disponível em regiões tropicais de grande diversidade floral como o Brasil e tem, portanto, um importante potencial fitoterapêutico. Aindaé necessária, no entanto, uma diferenciação da atividade biológica dos diferentes tipos de méis segundo suas características e origem botânica (SUBRAHMANYAM, 2007).

1.6 Mel no Tratamento de Feridas

Entende-se por mel o produto produzido pelas abelhas, a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas, ou de excreções de insetos sugadores que permanecem sobre as partes vivas de plantas (melato). As abelhas recolhem, transformam, combinam estas substâncias com outras substâncias específicas próprias (enzimas salivares), armazenam e o deixam amadurecer nos favos da colmeia; é um produto totalmente natural que, segundo o *CodexAlimentarius Internacional* (2001), não pode conter qualquer tipo de conservante. A composição clássica do mel inclui sacarose (0,2-7%), glicose (22-40%), frutose (28-44%), flavonóides (0,5-1%), aminoácidos (0,2-2%), água 14-22% e enzimas (0,5-1%), com um pH próximo a 3,9 (norma MERCOSUL/GMC/RES. Nº

89/99). A composição pode variar, no entanto, segundo a região de produção, clima e a origem botânica.

Diferente do açúcar, o mel, além de conter monossacarídeos (glicose e frutose) e dissacarídeos (sacarose), quando natural e de qualidade comprovada, temtrissacarídeos (erlose) eoligoelementosfitoquímicos que enriquecem sua composição, como flavonóides e traços de proteínas e minerais, sendo responsáveis porpropriedades bioquímicas adicionais (MOLAN, 2012). Mphandeet al. (2007) compararam o uso destes dois produtos similares (açúcar e mel) em 40 pacientes com feridas abertas infectadas, encontrando redução de 32% das infecções em feridas em tratamento com mel depois de uma semana, superior à redução de 13% das infecções em feridas em tratamento com açúcar. Os autores avaliaram a taxa de cicatrização, superior no mel (3,8 cm^2/semana) em comparaçãoao açúcar (2,2 cm^2/semana). Finalmente, a presença de dor na troca do curativo estava ausente em 86% dos pacientes tratados com mel durante3 semanas, enquanto que no grupo tratado com açúcar a dor estava ausente em 72% dos pacientes. Concluiu-se que os dois produtos são eficazes, mas o mel é superior.

Segundo um dos maiores pesquisadores do mel de Manuka, Peter Molan (2016), da Universidade de Waikato na Nova Zelândia, e também segundo estudos mais recentes, as propriedades do mel são:

- *Capacidade antimicrobiana*: esta propriedade é atribuída a várias características físico-químicas, como:1) a hiperosmolaridadeconferidapela elevadaconcentração de açúcares (80%), que desidrata os microrganismos; 2) o pH ácido (3,2-4,5), com ação bacteriostática,devido aoácido glucônico presente em baixas concentrações;este ácidoé formado pela ação a enzima glicose oxidase, adicionada ao mel pelas abelhas a partir das suas glândulas hipofaríngeas;3) o peróxido de hidrogênio, um subproduto da mesma enzima que é gerado quando o mel é exposto ao ar, diluído e aquecido ao contato com a ferida;este subproduto é mantido em concentrações equilibradas pela enzima catalase presente no néctar; 4)abaixa atividade de água, propriedade que evita o crescimento bacteriano no meio rico em açúcares e 5).a atividade não-peróxido do mel, presente em maior ou menor medida segundo o tipo de mel, comefeito antimicrobiano residual;a enzima lisozima e os

flavonóidespresentes no mel têm sido consideradosresponsáveis por esteefeito antimicrobiano (MOLAN, 1997; 1999). As propriedades mencionadas são ativas contra bactérias formadoras de biofilme (camada de proteção das colônias de microrganismos, formada por proteoglicanos), que nas feridas crônicas é um grande problema para otratamento (MERCKOLL, et al., 2009; MADDOCKSet al., 2012).

- *Capacidade desodorizante:* o odor das feridas é conferidopelo metabolismo dos microrganismos, que produzem amônia e derivados do enxofre. Alternativamente, na presença de altas concentrações de açúcar,os microrganismos produzem ácido láctico, que não gera mal cheiro. A presença deste ácido, em combinação com a contínua diminuição da população bacteriana, eliminam este desconforto.

- *Capacidade desbridante:* o efeito osmótico do mel e sua higroscopicidade (capacidade de absorver água) geram uma saída de líquido dos tecidos (a partir do interstício, soro elinfa), com a consequente formação de uma camada úmida na área da lesão que permite que diferentes enzimas proteolíticas, como MMPs e proteases de serina secretadas pelos leucócitos, sejam ativadas pelo peróxido de hidrogênio e façam um debridamentoautolítico e enzimático dos resíduos teciduais e de biofilme, o que favorece a limpeza da ferida (PEPPIN, 1986; MOLAN, 2009).

- *Capacidade antioxidante:* a formação natural de radicais livres nos tecidos e células, aumentada no DM, necessita de defesas antioxidantesque diminuam os danoscelulares e teciduais (LAMERS et al., 2011). Esta função é exercida por flavonóides e outros polifenóis presentes no mel, que tiveram sua ação comprovada por meio de diferentes técnicas como a inibição da quimioluminescência em sistema produtor de superóxido (BRANGOULO, 2011).

- *Capacidade imuno-estimuladora e anti-inflamatória:*a hiperosmolaridade e higroscopicidadedo mel, já mencionadas,possuem um efeito anti-inflamatório no tecido circundante à lesão, diminuindo o edema. A capacidade antioxidante do mel é, em parte, também responsável pela atividade anti-inflamatória, uma vez que os radicais livres promovem a inflamação tecidual e sua neutralização evita o processo de lise celular. O mel também estimula a proliferação dos linfócitos T e B e a secreção de citocinaspelosmacrófagos,tornando a resposta inflamatória mais

eficiente contra a colonização dos microrganismos, além de aumentar a quantidade de fatores de crescimentoque promovem vasculogênese e proliferação celular (TONKSet al., 2001).

-*Estímulo da proliferação e granulação:* a higroscopicidadee hiperosmolaridadeprovoca fluxo de líquido desde o tecido até o exterior, diluindo o mel. Este processo favorece a diminuição do edema e favorece o ambiente úmido, aumentando a distribuição de moléculasprovenientes de tecidos profundos que favorecem a proliferação celular nos tecidos. O pH ácido favorece a proliferação de fibroblastos e fibrilogênese de colágeno(MOLAN, 2012).

Vários estudos clínicos têm sido desenvolvidos na última década reportando os benefícios do mel para a cicatrização, abrangendo diferentes tipos de pacientes e feridas: queimaduras, feridas pós-cirúrgicas, feridas agudas infectadas e crônicas de etiologia vascular e por pressão (SECKAM; COOPER, 2013). Jullet al. (2015) recomendam o produto em feridas superficiais e de espessura parcial tipo queimaduras e feridas pós-cirúrgicas infectadas, sob evidência científica, mas concluem que ainda falta maior qualidade metodológica nos ensaios clínicos, assim comoa avaliação de possíveis complicações,para recomendá-lo no tratamento de outras feridas.

Em estudos clínicos e experimentais parao uso do mel em feridas utilizando animaisdiabéticos como modelo experimental, os benefíciosclínicos já descritos têm sido comprovados. Diversas propriedades do mel, especialmente a açãoantioxidante, melhoram o processo cicatricial, diminuindo o tempo de cicatrização e resolvendo colonizações crônicas; efeitos sistêmicos do açúcar contido nomel não têm sido relatados em humanos ou em animais (EDDY;GIDEONSEN, 2005; DAMIRet al, 2007; MAKHDOOMet al, 2009).

A tendência futura da pesquisa em apiterapiaconcentra-se em associar a atividade biológica já atestada com a origem botânica do mel, podendo sermonofloral, multifloral e também variar segundo o território geográfico (MOLAN, 2012). Embora existam no mercado vários produtos disponíveis como o mel de Manuka (MediHoney®, Estados Unidos;Activon®,Nottinghamshire;Medigold®,

Estados Unidos), há uma clara necessidade de estudar os potenciais benefícios de méis brasileiros como produtosmedicinaia de maior acesso para as pessoas com diabetes mellitus.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Considerando as informações apresentadas anteriormente sobre: 1) a cicatrização deficiente em diabéticos, 2) as propriedades antioxidante, antimicrobiana, imuno-moduladora e cicatrizante do mel e 3) o fato de que o mel pode ser economicamente acessível para a população, o objetivo principal do presente estudo é avaliar os efeitos da utilização do mel de Manuka (uma referência internacional) e um mel brasileiro no tratamento de feridas cutâneas em camundongos diabéticos, visando a aceleração da cicatrização.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a composição físico-química das amostras de mel brasileiro provenientes de diferentes regiões e compará-las com o mel de Manuka e mel artificial.

- Avaliar a atividade biológica das amostras de mel selecionadas, em modelo experimental de ferida cutânea de espessura total em camundongos diabéticos.

Espera-se testar futuramente este fitoterápico em humanos e implantar uma terapia de baixo custo, acessível e de fácil aplicação pelo próprio paciente para o tratamento de feridas crônicas, reduzindo assim o custo gerado por este problema ao sistema público de saúde e aumentando a qualidade de vida do indivíduo diabético.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Neste estudo foram utilizados os seguintes reagentes e materiais: citrato de Sódio, Poli-L-Lysina®, Frutose, Glicose, Sacarose, Turanose, Maltose, Trealose, Gentiobiose, Erlose, Melezitose, Folin-Ciocalteu, Ácido Gálico, Cloreto de Alumínio, Hidróxido de Sódio, Quercetina, Amido, Nitrato de Sódio, Trolox (6-hidrox-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico), Fluoresceína, Dihidrocloreto, DPPH (2,2, -difenil-1-picril-hidrazil), TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazine, Sigma Aldrich), Acetonitrila e Cloreto Férrico provenientes da Sigma Aldrich (Alemanha). Outros reagentes foram Xilazina/Ketamina(Ceva,Brasil), mel de Manuka (Manuka Honey®, Estados Unidos), Isoflurano (Biochimico®, Brasil), Formaldeído,Xilol, Ácido clorídrico (Synth®, Brasil), Ácido acético (Merck, Alemanha), ácido pícrico (Dinâmina®, Brasil), Etanol (Jalles Machado, Brasil), Parafina (Histotec®,Merk, Alemanha), hematoxilina e eosina (Shandon, Estados Unidos), Carrez I (15%), Carrez II (30%) e Coluna para CLAE C_{18} (Phenomenex, Estados Unidos), Membranas, Filtro de Seringa 0,22 e 0,45 µm (Millipore, Alemanha), Coluna para CLAF (Zorbax® Agilent, Estados Unidos). Foram utilizados os seguintes equipamentos:Câmera Digital (Sony Cyber-shot 7.2 MP®, Estados Unidos), GlucosímetroAccu-Chek® (Roche Diagnostics-Brasil), Micrótomo (Zeiss, Alemanha), Câmera Digital (CF160 Epi-FluorescenceOptics. NIKON, Japão), Colorímetro modelo C221 (Hanna Instruments, Austrália), Refractômetro Digital Hand-Held DR201-95 (kruss, Alemanha) eespectrofotômetro Synergy H1 Multi-Mode Reader (BiotekInstruments Inc., Estados Unidos).

3.2 Animais

O protocolo de pesquisa utilizado está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal preconizadospela Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da USP No. 44, folha 18 do livro 03.

Foram utilizados camundongos (*Mus Musculus,* ordem Rondentia Mammalia, família Muridae) machos da linhagem Swiss, com 60 dias de idade, provenientes do Biotério de Criação do Departamento de Farmacologiado ICB-USP. Para o protocolo

experimental os animais foram cuidados pelos pesquisadores do projeto e os funcionários especialistas no biotério de experimentaçãodo Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB-USP. Previamente às intervenções experimentais, os camundongos foram acondicionados em gaiolas grandes (50 x 22 cm) para cada 5 animaisdurante 7-15 dias. Durante tempo integral os animais receberam dieta e água *ad libitum* (livre demanda) e foram mantidos sob condição padrão de luminosidade (ciclo de 12 h claro/escuro) e em temperatura aproximada de 22ºC.

Fazendo uso das estratégias paradiminuição do uso de animais em pesquisa básica,preconizada pela comissão de ética em experimentação animal, foram utilizados 84 camundongos divididos em 3 grupos segundo o produto de tratamento, aleatoriamente colocados em subgrupos de animais diabéticos, controles, não tratados e tratados, cuja distribuição é mostrada naTabela 1.Durante o protocolo experimental, foi feita higienização (troca de maravalha) 2 vezes por semana aos animais controle e 4 vezes aos animais diabéticos.

Grupo	Tratamento Manuka	Tratamento Eucalipto	TratamentoMel artificial
Controle não tratado	6	6	6
Diabético não tratado	8	8	8
Controle Tratado	6	6	6
Diabético Tratado	8	8	8
Total N=84	**28**	**28**	**28**

Tabela 1-Distribuição dos animais segundo modelo experimental

Cada grupo teve animais controles e diabéticos não tratados que serviram como controle das diferentes variáveis que afetam o processo cicatricial fisiológico, fato necessário uma vez que cada grupo foi conformado e tratado em momentos diferentes.

3.3 Indução do Diabetes Mellitus (DM)

O DM foi induzido por meio de injeção intravenosa (na veia caudal) de Aloxana(Sigma Aldrich) na concentração de 70 mg/Kg de peso corporal, diluída em

tampão citrato de sódio 0,1 M, pH 4,5 (GOLDNER, 1945). Animais do grupo controle receberam apenas o veículo. Todos os animais foram submetidos a jejum de 16-19h previamente à indução do DM. A glicemia foi aferida (em jejum de 4-6 h) após 72 h da indução e no momento do sacrifício, utilizando o aparelho Accu-Chek® (Roche Diagnostic). Apenas os animais com glicemia superior a 300 mg/dL foram considerados diabéticos. Os animais permaneceram diabéticos pelo período de 30 dias previamente à confecção das feridas; ao final de esse período foram mensurados o peso corporal e a glicemia.

3.4 Confecção da ferida

Os animais foram anestesiados utilizando-se a associação de Xilazina e Ketamina (Ceva®) na concentração de 40 mg/kg de peso cada, por via intraperitoneal. Foram confeccionadas feridas de espessura total (que acometem epiderme, derme e tecido subcutâneo) na área escapular dos animais, com o auxílio de uma pinça dente de rato e tesoura de ponta fina para remoção da área de 1cm^2 previamente demarcada com carimbo após tricotomia da região, no 31º dia de diabetes. Em seguida os animais foram aquecidos (sob luz, com proteção ocular) para evitar hipotermia e mantidos sob observação da recuperação pós-anestésica. Posteriores à sua recuperação foram colocados em gaiolas individuais (7,5x12cm) e receberam na água uma dose única de analgésico (Paracetamol 75mg/Kg) durante 4 horas.

3.5 Tratamentos tópicos

O tipo de tratamento tópico foi definido após a caracterização e escolha dos méis que seriam aplicados. O protocolo de aplicação foi específico, levando em consideração as características dos méis e as necessidades do estudo conformedescrito no texto a seguir.

3.5.1 Escolha dos produtos para tratamento tópico

O produto utilizado para o tratamento tópico foi **mel de abelhas** da espécie *Apis Mellífera* de origem européia e utilizada na produção de mel no Brasil.A seleção dos méis para tratamentos foi feita segundo informações disponíveis na literatura e a realização de experimentos prévios de caracterização. Como referência em

apiterapia optou-se pelo **mel de Manuka,**da origem botânica *Leptospermumscoparium* (Manuka Honey®), por ser descrito como produto de grau medicinal com evidência científica e recomendado internacionalmente para cicatrização de feridas agudas (JULL et al., 2015).

Como um controle de osmolaridade optou-se pelo**mel artificial** citado por Bazoni (2011) e Khosraviet al. (2008), por conter os principais açúcares presentes no mel na concentração de 80% m/v de açúcar (frutose, glicose, sacarose e maltose), excluindo-se os componentes adicionais como ácidos fenólicos e flavonóides (responsáveis pela possível atividade antioxidante). Com o objetivo de ter uma maior aproximação das características dos açúcares presentes no mel artificial e no mel experimental (Eucalipto), foi realizada uma análise paraidentificação e quantificação dos tipos de açúcares presentes neste mel e usada amesma concentração na preparação do mel artificial, garantindo desta maneira uma osmolaridade similar em ambos os produtos.

O mel brasileiro escolhido para fazer o tratamento foi o **mel de Eucalipto** da origem botânica *Eucalyptus- Myrtaceae*. Esta escolha foi baseada em uma análise das características físico-químicas e de antioxidação de 11 amostras provenientes da região de São Paulo (comercializadas pelo apiário do instituto de Biociências da USP) e do Rio Grande do Sul (doadas pelo Laboratório de Apicultura da Universidade Federal do Rio Grande do Sul), seguindo as metodologias explicadas na seção3.7 de este texto.

3.5.2 Protocolo de Aplicação

Visando a minimização de fontes de estresse para os animais de experimentação, foi feito tratamento tópico diário dos animais nomesmo horário (matutino), segundo distribuição dos grupos (mel de Manuka, de Eucalipto e artificial). Não foi realizada limpeza inicial da ferida, foi aplicada quantidade suficiente para cobrir a área da ferida e as bordas (aproximadamente 100 mg) e sem colocação de cobertura secundária, nem fixador do curativo. A quantidade de produto foi gradativamente reduzida ao longo do processo de cicatrização, devido à diminuição da área da ferida em cada animal, até o dia 14.

3.6 Análise do processo de cicatrização

Dentro da análise do processo cicatricial, foram aferidas as seguintes variáveis: fechamento total da ferida e análise histológica.

3.6.1 Cinética do fechamento das feridas

A região da ferida foi fotografada logo após o procedimento cirúrgico e no 3º, 5º, 7º, 9º, 11º, 13º, 15° dias pós-lesão, com câmera digital Sony (Cyber-shot 7.2 MP®) a uma distância fixa de 20 cm de altura. A área das feridas foi medida utilizando-se o programa Image J (NIH). Para capturar as imagens sem estressar o animal foi aplicado o protocolo de sedação com Isofluorano (BioChemica) embebido em um algodão, acondicionado em uma caixa de acrílico adaptada a este fim.

3.6.2 Análises Histológicas

Sob anestesia (xilazina/ketamina 40 mg/kg) foi removido tecido da área da lesão, juntamente com pele íntegra das bordas da ferida, no 3º e 15° dias pós-lesão; logo após esta remoção os animais foram sacrificados com dose excessiva de anestésico. As amostras foram posicionadas em fragmentos de cortiça por meio de alfinetes, fixadas em solução BOUIN (formaldeído 25%, ácido acético 5% e ácido pícrico 70%) por 8 h à temperatura ambiente, desidratadas em ordem crescente de etanol (70%, 95% e 100%), diafanizadas em Xilol (I e II) e finalmente processadas para inclusão em parafina (Histotec®). Cortes de 5µm foram obtidos em micrótomo (Zeiss) e posicionados em lâminas de vidro pré-cobertas com poli-lisina (Sigma Aldrich). As amostras foram coradas com hematoxilina e eosina para avaliação dos aspectos morfológicos da ferida no processo cicatricial. As imagens das análises foram captadas com câmera digital (CF160 Epi-FluorescenceOptics, Nikon) acoplada a um microscópio óptico.

3.7 Análises físico-químicas das amostras de mel

Foram analisadas 11 amostras de mel provenientes de apiários dos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul (Tabela 2), conforme a normatividade do *CodexAlimentarius Standard for Honey*, a Regulamentação Mercosul nº 89/99e as metodologias preconizadas por Almeida-Muradian e Bera (2008). As análises foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, sob orientação da Profa. Dra. Ligia Bicudo de AlmeidaMuradian.

As amostras foram provenientes de apiários em São Paulo e Rio Grande do Sul, através da Universidade de São Paulo (Laboratório de Abelhas, Instituto de Biociências) e da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Laboratório de Apicultura-LABAPIS). O mel de Manuka (Manuka Honey®) foi adquirido comercialmente.

No.	Nome	Tipo	Origem
1	Laranjeiras	Monofloral	São Paulo-Brasil
2	Eucalipto.0	Monofloral	São Paulo-Brasil
3	Floral	Multifloral	São Paulo-Brasil
4	Manuka	Monofloral	Nova Zelândia
5	Aroreira.2	Monofloral	Rio Grande do Sul-Brasil
6	Eucalipto.8	Monofloral	Rio Grande do Sul-Brasil
7	Eucalipto.10	Monofloral	Rio Grande do Sul-Brasil
8	Eucalipto.18	Monofloral	Rio Grande do Sul-Brasil
9	Eucalipto.20	Monofloral	Rio Grande do Sul-Brasil
10	Silvestre.7	Multifloral	Rio Grande do Sul-Brasil
11	Silvestre.26	Multifloral	Rio Grande do Sul-Brasil

Tabela 2- Relação das amostras de mel analisadas por tipo e região.

A aferição foi feita em triplicata para os seguintes parâmetros:

3.7.1 pH e Acidez Livre

A acidez livre das amostras de mel foi verificada de acordo com AOAC (1990) e legislação brasileira (BRASIL, 2000). O valor do pH foi obtido utilizando-se um pHmetro digital (Hanna Instruments) calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0. Em seguida, a acidez livre foi avaliada a partir de titulação simples com NaOH 0,05 N, interrompendo-se a titulação quando o pHmetro marcava o valor de 8,5. As

análises foram realizadas em triplicata e a acidez livre expressa em $mEq.Kg^{-1}$ de mel.

3.7.2 Concentração de Hidroximetilfurfural (HMF)

Foi feita determinação do composto segundo protocolo de Ajlouni e Sujirapinyokul (2010).Utilizou-se Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE (HPLC pelas siglas em inglês) com coluna C_{18} (de aço inoxidável) de fase reversa (250 mm x 4.6 mm de diâmetro e porosidade de 5µm, Phenomenex), operado a 30°C com uma pré-coluna C_{18}. A fase móvel foi água:metanol em proporção 90:10, (v/v), o fluxo foi isocrático de 0,75 $mL.min^{-1}$, com volume de injeção de 20µl. A curva padrão foi obtida com HMF em concentrações de 1 a 50 $mg.1^{-1}$. Foi usado detector de ultravioleta a 285 nm. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em $mg.Kg^{-1}$ de mel.

O preparo das amostras correspondeu à sua homogeneização inicial em soluções de Carrez I (15%) e II (30%) na proporção de 1:100 cada. Posteriormente foram filtradas em papel filtro de 80 mg/m^2 e os 10 ml iniciais foram descartados. A solução resultante foi novamente filtrada em membrana (Millipore) de 0,22 µm e armazenada a temperatura de -20 ºC até sua análise.

3.7.3 Classificação de Cor

Foi realizada de acordo com a escala Pfund (ALMEIDA-MURADIAN; BERA, 2008), que estabelece uma relação entre faixas de valor e cor correspondente. O analisador mede a transmitância percentual de luz do mel em comparação ao glicerol de grau reagente analítico. O instrumento (Colorímetro modelo C221, Hanna Instruments) exibe diretamente o resultado da medição, expresso em Pfund mm (VIDAL; FREGOSI, 1984).

3.7.4 Teor de umidade

A análise consiste na determinação do índice de refração do mel a 20°C (método de Chataway) indicado por Cano et al.(2001), que é convertido para o conteúdo de umidade através de uma tabela de referência, a qual fornece a concentração como uma função do índice de refração (ALMEIDA-MURADIAN;

BERA, 2008; AAOC, 1998). O instrumento utilizado foi o Refractômetro Digital Hand-Held DR_{201-95} (Kruss, Alemanha).

3.7.5 Concentração de Açúcares

A determinação de açúcares foi realizada segundo Bogdanovet al. (1999) e a *InternationalHoneyComission* (2009), com modificações. Foi preparada uma solução de mel (0,05 $g.mL^{-1}$) com 25 % de metanol. A solução foi filtrada em membrana (Millipore) de 0,45 µm. As amostras foram analisadas em CLAE utilizando-se coluna Zorbax NH_2 de fase normal (250 mm de comprimento; 4,6 mm de diâmetro; e 5 µm de porosidade, AGILENT, Estados Unidos) e pré-coluna Zorbax NH2 (12,5 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetroe 5 µm de porosidade. AGILENT), operado à temperatura de 37°C. A fase móvel foi composta por acetonitrila:água (80:20, v/v), e o fluxo utilizado foi do tipo isocrático a 1,3 $ml.min^{-1}$, com volume de injeção de 10 µL. A curva padrão foi obtida com padrões de Frutose, Glicose, Sacarose, Turanose, Maltose, Trealose, Gentiobiose, Erlose e Melezitose (Sigma Aldrich). A detecção foi realizada por índice de refração. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em $g.100g^{-1}$ de mel.

3.7.6 Fenólicos Totais

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada segundo Zhang et al. (2006). Foi utilizado espectrofotômetro Synergy H1 Multi-Mode Reader (BIOTEK INSTRUMENTS Inc.) com microplaca de poliestireno com 96 poços e fundo transparente. Foram adicionados diretamente em cada poço 20 µL de solução aquosa de mel (0,2 $g.mL^{-1}$), em suas devidas diluições e 100 µL do reagente Folin-Ciocalteu. Após cinco minutos de incubação foram adicionados 80 µL de carbonato de sódio a 7,5 % e a solução foi novamente incubada, por 30 minutos, à temperatura de 37 °C. A curva padrão foi elaborada com ácido gálico (Sigma-Aldrich) em concentrações de 10,5-210 $µg.mL^{-1}$. As leituras foram realizadas a 760 nm e a capacidade redutora do Folin-Ciocalteu foi expressa em mg equivalentes de ácido gálico (EAG).$100g^{-1}$ de mel.

3.7.7 Flavonóides Totais

O teor total de flavonoides foi analisado segundo Xu e Chang (2007), com modificações. Foi utilizado espectrofotômetro Synergy H1 Multi-Mode Reader (BiotekInstruments Inc., VT, USA) com microplaca de poliestireno com 96 poços e fundo transparente. Foram adicionados diretamente em cada poço 180 µL de solução aquosa de mel (0,2 $g.mL^{-1}$) e 15 µL de $NaNO_2$ a 2,5 %. Após seis minutos foram adicionados 15 µL de $AlCl_3$ a 10% e, depois de cinco minutos, foram adicionados 50 µL de NaOH 1M. Aguardou-se 10 minutos, tempo necessário para a formação do complexo flavonóide-alumínio à temperatura ambiente. A curva padrão foi elaborada com quercetina (Sigma-Aldrich) nas concentrações de 0,1 a 50$\mu g.mL^{-1}$. As leituras foram realizadas a 415 nm e os resultados expressos em mg equivalentes de quercetina (EQ).$100g^{-1}$ de mel.

3.7.8 Atividade Antioxidante

Para definição da capacidade antioxidante existem várias metodologias de análise laboratorial. Devido às grandes diferenças entre elas, é recomendável validar o resultado com, no mínimo, duas metodologias (ALAM et al., 2013).Por este motivo, no presente trabalho foram utilizadas três metodologias diferentes para teste das amostras de mel.

3.7.8.1 <u>Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC)</u>

Foi utilizada usando protocolo descrito por Prior et al. (2003), que estima a habilidade de uma solução de resistir ao dano oxidativo, refletindo os efeitos combinados de todos os antioxidantes nela testados. A oxidação da substância fluorescente foi monitorada em espectrofotômetro Synergy H1 Multi-Mode Reader (BiotekInstruments inc.) com microplaca de poliestireno com 96 poços e fundo transparente. Nos poços foram adicionados 25 µL de solução de mel (0,05 $g.mL^{-1}$, com 25 % de metanol), devidamente diluída com tampão fosfato 75 mM (pH 7,1), 25 µL do controle e 25 µL da curva padrão de Trolox (6-hidrox-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico, Sigma-Aldrich) análogo à vitamina E. A esse volume foram adicionados 150 µL de solução de fluoresceína 40 nM (Sigma Aldrich), seguido por incubação a 37 °C por 30 minutos. Na sequência, foram misturados 25 µL da solução do radical peroxila 2,2’-azobis (2-amidinopropano)

dihidrocloreto(AAPH 153 nM) (Sigma-Aldrich), desencadeando a reação. A reação foi monitorada a cada um minuto, duranteuma hora. A curva padrão de Trolox foi realizada nas concentrações de 6,25 a 100 µM. A capacidade antioxidante foi determinada pela curva de redução da intensidade da fluoresceína com a concentração de equivalentes Trolox. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em mmol equivalentes Trolox (ET).Kg^{-1} de mel.

3.7.8.2 Sequestro do radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

A determinação da capacidade antioxidante pelo método DPPH foi realizada de acordo com Bobo-Garcia et al. (2015). Foi utilizado espectrofotômetro Synergy H1 Multi-Mode Reader (BiotekInstruments Inc.) com microplaca de poliestireno com 96 poços e fundo transparente. Foi preparada uma solução metanólica de DPPH (200 µM) a fim de exibir, aproximadamente, 0,9 de absorbância, no comprimento de onda de 517 nm. Na microplaca, foram adicionados 80 µL de controle e cinco diluições diferentes da solução aquosa de mel (0,2 $g.mL^{-1}$) com suas respectivas proporções de metanol 80% e água. Então, 160 µL da solução DPPH foram adicionados, seguindo para incubação por 1 hora e 30 minutos à temperatura ambiente. Após o período de incubação foi efetuada a leitura a 517 nm. O resultado da atividade antioxidante foi expresso como a capacidade de sequestrar/reduzir o radical DPPH, em percentual (EC_{50}), ou seja, a quantidade de compostos antioxidantes necessários para reduzir em 50 % a concentração inicial do DPPH (BRAND-WILLIANS et al., 1995). As análises foram realizadas em triplicata, os resultados foram expressos em $mg.mL^{-1}$ de mel, e o percentual de descoloração foi calculado conforme a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de descoloração} = [1- (Abs_{amostra} – Abs_{branco}/Abs_{controle})] \times 100$$

3.7.8.3 Determinação do poder redutor do ferro – Método FRAP

Foi obtido por meio do método descrito por Benzie e Strain (1996). Foi utilizado espectrofotômetro Synergy H1 Multi-Mode Reader (BiotekInstruments Inc.) com microplaca de poliestireno com 96 poços e fundo transparente. O reagente FRAP foi preparado com tampão acetato de sódio 300 mMpH 3,6, solução de 2,4,6-

tripiridil-s-triazine (TPTZ) (Sigma-Aldrich) 10 mM em ácido clorídrico (Synth) 40 mM e solução de cloreto férrico (Synth, Brasil) 20 mM, na proporção 10:1:1. O reagente foi aquecido em banho-maria a 37 °C até o momento do uso. Na microplaca foram adicionados 20 µL de solução de mel (0,2 $g.mL^{-1}$). Em seguida, foram adicionados, rapidamente, 150 µL de reagente FRAP aquecido em cada poço. Logo, iniciou-se o período de incubação por oito minutos, à mesma temperatura. Após esse período, foi realizada a leitura das absorbâncias a 593 nm. A curva padrão foi preparada com Trolox (6-hidrox-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico, Sigma Aldrich) na concentração de 25 a 800 µM. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em µmol equivalentes Trolox (ET).g^{-1} de mel.

3.8 Análise Estatística

Foi utilizado software estatístico (IBM; SPSS 22.0, 2013). As variáveis quantitativas contínuas foram apresentadas por medidas de posição, média e desvio padrão (±). Inicialmente aplicou-se o teste de *KolmogorovSmirnov* para análise da distribuição normal e teste *Bonferroni* para verificar a homogeneidade das variâncias. Em seguida os resultados foram comparados entre os grupos com o teste t de *Student*(NETERet al., 1996) e o teste ANOVA segundo número de grupos; o pós-teste foi Tukey para variâncias homogêneas e *Games-Howell* para heterogeneidade. O nível de significância foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Primeiramente será apresentada a caracterização das amostras de mel, para justificar a escolha do mel de Eucalipto neste estudo.

4.1 Caracterização físico-química das amostras de mel

Os resultados das análises de qualidade (conteúdo de HMF, cor e umidade), relacionadas ao processamento do mel, mostraram a maioria dos indicadores dentro da normatividade, excetuando-se o mel de Manuka, que teve HMF e umidade acima dos níveis permitidos. Características adicionais como a capacidade antioxidante e a concentração de ácidos fenólicos e flavonóides permitiram reconhecer o mel de Eucalipto como superior quando comparado ao mel de Manuka.

4.1.1 Escolha do mel para tratamento experimental

Para escolha da amostra de mel com melhores características para teste da atividade biológica, foi feita análise de 11 amostras de mel monofloral e multifloral, provenientes de duas regiões do Brasil (São Paulo e Rio Grande do Sul). Como é mostrado na Tabela 3, em comparação com as outras amostras, o mel de Manuka teve a maior concentração de HMF ($p<0,001$), a maior porcentagem de umidade ($p<0,001$) e a cor mais escura (maior pontuação na escala pFund - $p<0,001$). No ensaio de atividade antioxidante por ORAC, o mel de Eucalipto.10 e o mel de Aroeira tiveram os maiores resultados em comparação aos outros méis ($p<0,001$), mas sem diferença entre eles dois (Figura 1).

AMOSTRA	HMF	UMIDADE	COR	ANTIOXIDAÇÃO
Metodologia (Unidade de medida)	*HPLC (mg/kg)*	*Refratometria de Chataway (%)*	*Refratometria Colorimétrica (Unidades pFund)*	*ORAC (mM-Trolox Equivalente/kg)*
Legislação	Até 60 mg/kg	Até 20%	-	-
Laranjeiras	42,07±0,77	17,70±0,11	45±0,7 Âmbar Extra Claro	5,83±0,58
Eucalipto.0	43,41±0,43	19,50±0,23	86±6,35 Âmbar Claro	9,77±0,33
Floral	15,01±0,29	18,10±1,03	89±0,0Âmbar	7,27±0,44
Manuka	64,34±1,43	23,70±0,70	150±0,0 *** Âmbar Escuro	15,90±0,82
Aroreira.2	1,53±0,02	20,80±0,90	92±0,6 Âmbar	17,94±0,53
Eucalipto.8	7,42±0,06	19,20±0,30	74±0,6 Âmbar Claro	8,43±0,21
Eucalipto.10	2,65±0,06	21,40±0,80	81±0,0 Âmbar Claro	18,48±0,34
Eucalipto.18	2,40±0,09	20,20±0,60	79±0,6 Âmbar Claro	15,55±0,33
Eucalipto.20	2,14±0,20	18,40±0,50	80±0,6 Âmbar Claro	15,38±0,44
Silvestre.7	8,43±0,20	20,80±0,30	91±0,6 Âmbar	10,29±0,15
Silvestre.26	7,92±0,06	17,60±0,70	74±0,6 Âmbar Claro	7,92±0,06

Tabela 3-Análise físico-química de indicadores de qualidade e de atividade antioxidante em amostras de mel.

Indicadores de qualidade (HMF, umidade e cor) e capacidade antioxidante foram aferidos para caracterização das 11 amostras de mel, em triplicata. Os valores foram expressos em média e desvio padrão.

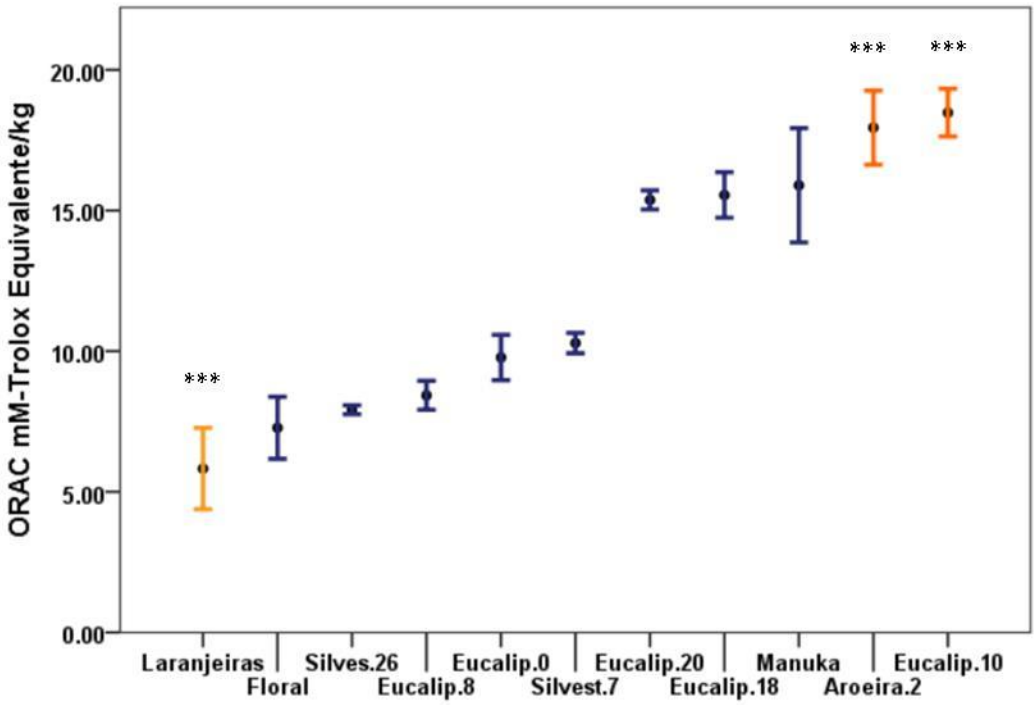
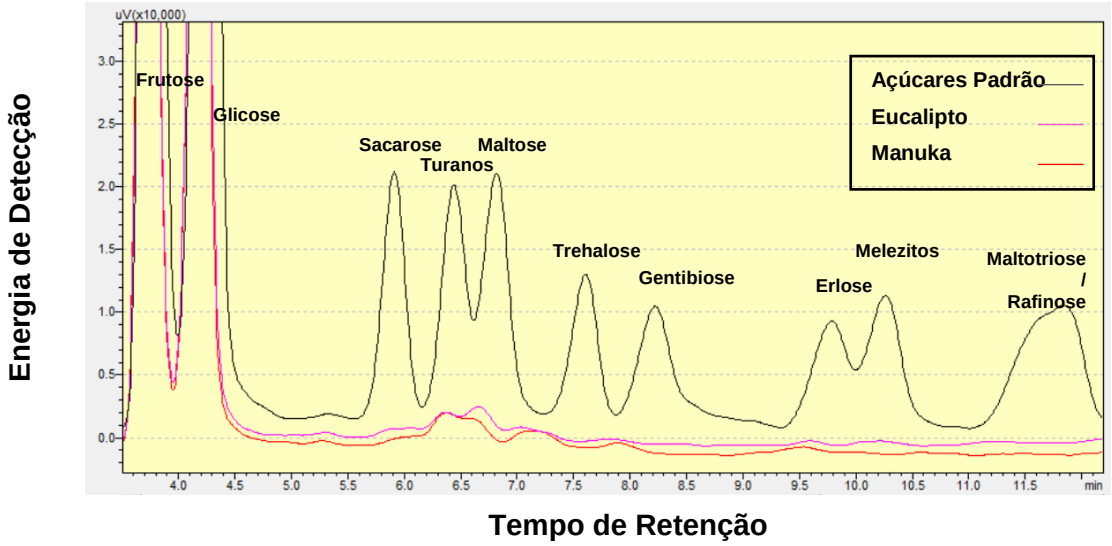


Figura 1 - Capacidade antioxidante de amostras de mel

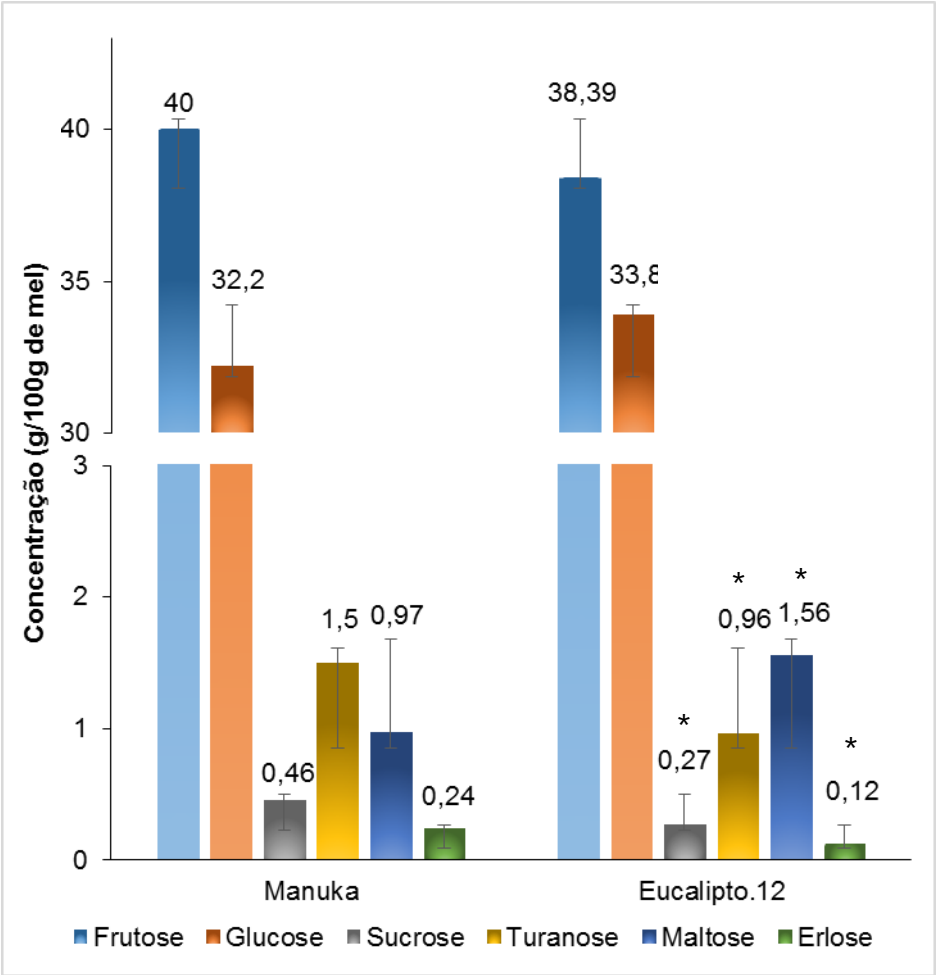
A capacidade antioxidante foi avaliada por método ORAC para as 11 amostras de mel (em triplicata). Os valores foram expressos em média e desvio padrão. Como indicado pela análise de variância (ANOVA) *oneway* e pós teste de Tukey em comparação múltipla por agrupamento, os méis indicados com (***) p<0,001 foram diferentes dos restantes.

Uma vez escolhido o mel de Eucalipto (origem botânica *Eucalyptus)*, para teste da sua atividade biológica na cicatrização, optou-se por considerar como comparativo um mel artificial preparado em laboratório usando o protocolo citado por Bazoni (2011) e Khosraviet al. (2008), conforme mencionado na seção dos métodos. Este mel foi formulado após análise do conteúdo de açúcares do mel de Manuka e de Eucalipto e serve como um controle para a osmolaridade do mel. Na Figura 2observam-se os diferentes açúcares identificados nas amostras de mel de Manuka e de Eucalipto; a frutose e a glicose (monossacarídeos) são os açúcares em maior concentração, sem diferença significativa entre os méis. Sacarose, Turanose (dissacarídeos) e Erlose (trissacarídeo) estão em maior concentração no mel de Manuka, enquanto a Maltose (dissacarídeo) encontra-se em maior concentração no mel de Eucalipto.

A.


uV(x10,000)
Energia de Detecção
Frutose
Glicose
Sacarose
Turanos
Maltose
Trehalose
Gentibiose
Erlose
Melezitos
Maltotriose
/
Rafinose
Açúcares Padrão
Eucalipto
Manuka
min
Tempo de Retenção

B.


Concentração (g/100g de mel)
40
32,2
38,39
33,8
1,5
0,97
0,46
0,24
0,27
0,96
1,56
0,12
Manuka
Eucalipto.12
Frutose
Glucose
Sucrose
Turanose
Maltose
Erlose

C.

Fórmula para 100 g de mel artificial	
Frutose	38,91
Glucose	34,43
Sacarose	0,27
Maltose	1,56
Agua	24,83
Total	100

Figura 2 - Identificação e quantificação de açúcares presentes em amostras de mel de Manuka e de Eucalipto

A.Utilizando-se coluna de cromatografia líquida foram identificados diferentes picos nos cromatogramas de CLAE, indicando a presença de diferentes açúcares nas amostras de mel de Manuka e Eucalipto quando comparados com as soluções padrão.**B.**A concentração de cada tipo de açúcar identificado foi determinada pela comparação do tempo de retenção e a área dos picos dos açúcares do mel com os padrões e expressas em $g.100g^{-1}$ de mel. Resultados expressos como média e desvio padrão. Resultados com diferença estatisticamente significativa de acordo com o teste t não pareado de comparação de médias: * $p<0,05$, tendo como referência o mel de Manuka. **C.** Fórmula do mel artificial correspondente às concentrações de açúcares encontradas no mel de Eucalipto, ajustadas com a conversão da quantidade em gramas de dissacarídeos e trissacarídeos, nos monossacarídeos frutose e glicose equivalentes.

4.1.2 pH e Acidez Livre

Na análise de pH o mel de Manuka obteve o menor valor e o mel artificial o maior, indicando menor concentração de hidrogênios livres neste último. Na acidez livre, o mel de eucalipto teve o maior valor, indicando maior presença de ácidos orgânicos como o ácido glucônico. Houve diferença estatística entre todos os valores ($p<0,05$)em ambos os parâmetros, tendo como referência o mel de Manuka(Figura 3).

Amostra	pH (íons hidrogênio)	Acidez Livre ($mEq.Kg^{-1}$)
Eucalipto	4,06±0,01	36,12±1,21
Manuka	3,97±0,01	30,07±1,00
Mel Artificial	6,7±0,39	2,24±0,35

Figura 3- Análise de pH e Acidez Livre

Usando pHmetro digital calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0, foi mensurado o pH das soluções de mel. Posteriormente, foi analisada a acidez livre titulando a solução com NaOH 0,05 N até chegar no pH de 8,5. Dados expressos em média e desvio padrão.

4.1.3 Hidroximetilfurforal

O mel de Manuka teve o maior resultado de HMF, superando os níveis permitidos pela legislação em países tropicais (60 $mg.kg^{-1}$). O mel de Eucalipto teve valores baixos, enquanto o mel artificial não teve a molécula detectada (Figura 4).

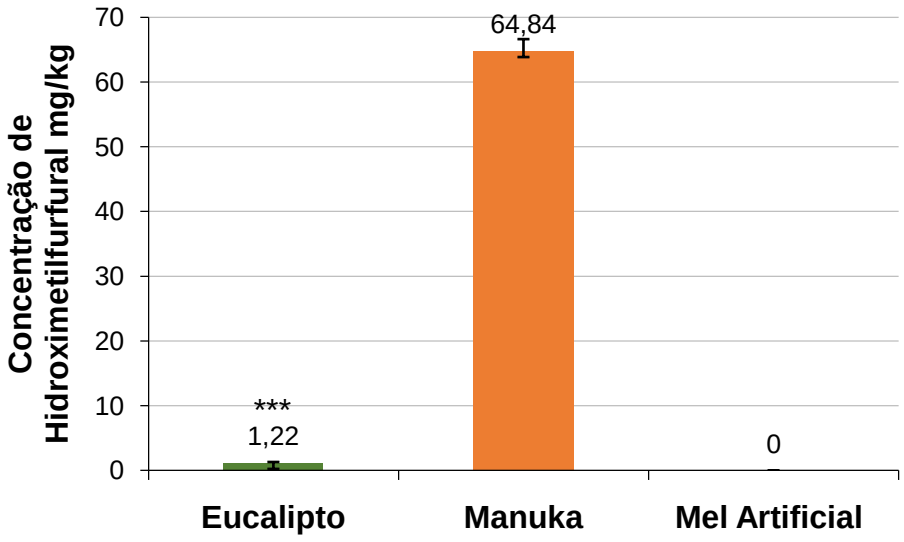


Figura 4 - Concentração de HMF em amostras de mel.

Usando CLAE foi quantificada a molécula de hidroximetilfurfural nas amostras de mel (em triplicata). Dados expressos em média e desvio padrão, resultados com diferença estatística segundo teste ANOVA e pós testeTukey, tendo como referência o mel de Manuka (*** $p<0,001$).

4.1.4 Umidade

O mel de Manuka apresentou valor superior de índice de refração e porcentagem de umidade. O mel artificial teve resultado condizente com a quantidade de água usada na formulação (Figura 5).

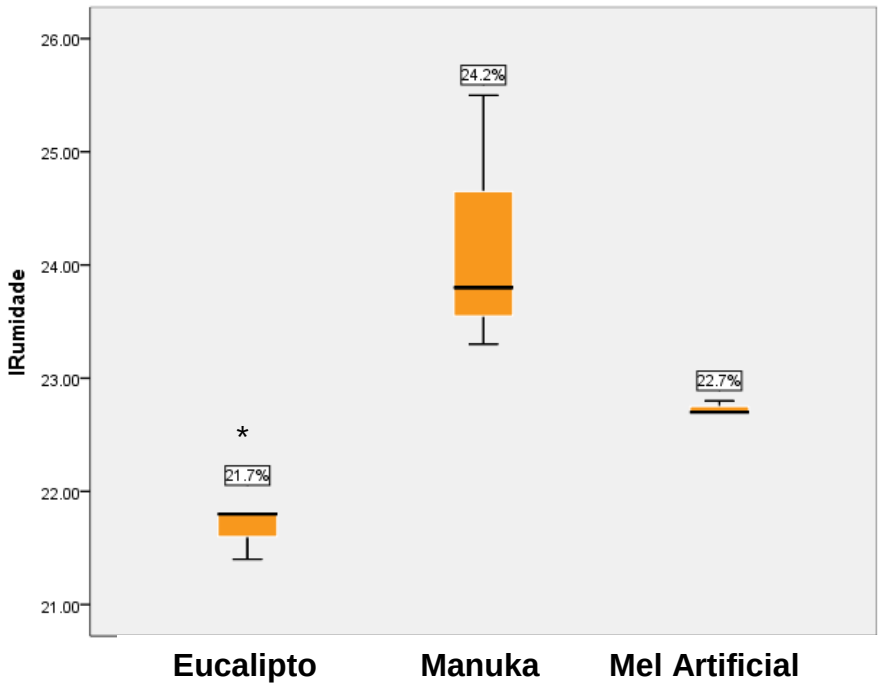


Figura 5 - Teor de Umidade

Utilizando-se o método refratométrico de Chataway foram aferidas as três amostras de mel. O índice de refração resultante foi traduzido em porcentagem segundo a tabela de Chataway. Os dados foram expressos em medianas e quartis. Resultados com diferença estatisticamente significativa segundo teste ANOVA (* $p<0,05$). Pós-teste de Tukey mostrou diferença para o mel de Eucalipto, tendo o mel de Manuka como referência.

4.1.5 Cor

Diferentes pontuações da escala pFund foram aferidas no teste colorimétrico das amostras de mel. O mel de Manuka apresentou o mais alto valor e foi classificado como o mel mais escuro, em comparação com o mel de Eucalipto e o mel artificial, ilustrado naFigura 6.

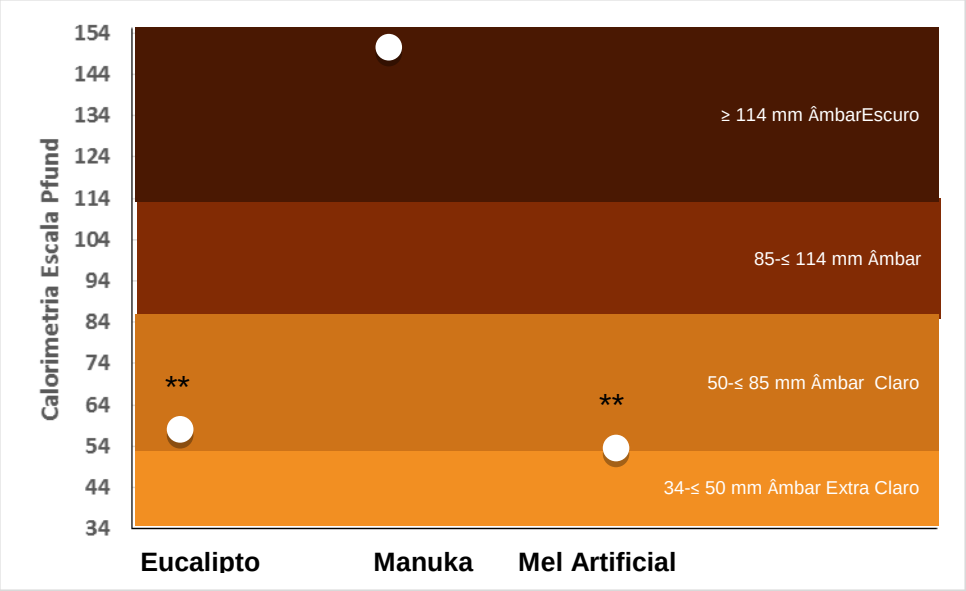


Figura 6 - Classificação das amostras de mel por cor

Utilizando-se colorímetro, comparou-se o índice de refração das amostras de mel ao da glicerina, traduzido ao indicador da escala pFund, que indica a cor do mel. Resultados expressos em média, com diferença estatística segundo o teste ANOVA. Tendo como referência o mel de Manuka, o pós-teste Tukey mostrou diferença significativa nos resultados indicados com ** ($p<0,01$).

4.1.6 Atividade antioxidante das amostras de mel por ORAC

O mel de Eucalipto teve capacidade antioxidante superior (18,48±0,34), em 14% ao mel de Manuka (15,90±0,82) com diferença estatística por ANOVA e pós-teste Tukey(p<0,05%). Ambos os tipos de mel são 90% superiores ao controle negativo, conforme observadonaFigura 7. Neste ensaio, o tempo de queda do sinal de fluorescência está diretamente correlacionado com a capacidade de proteger a oxidação do composto fluorescente.

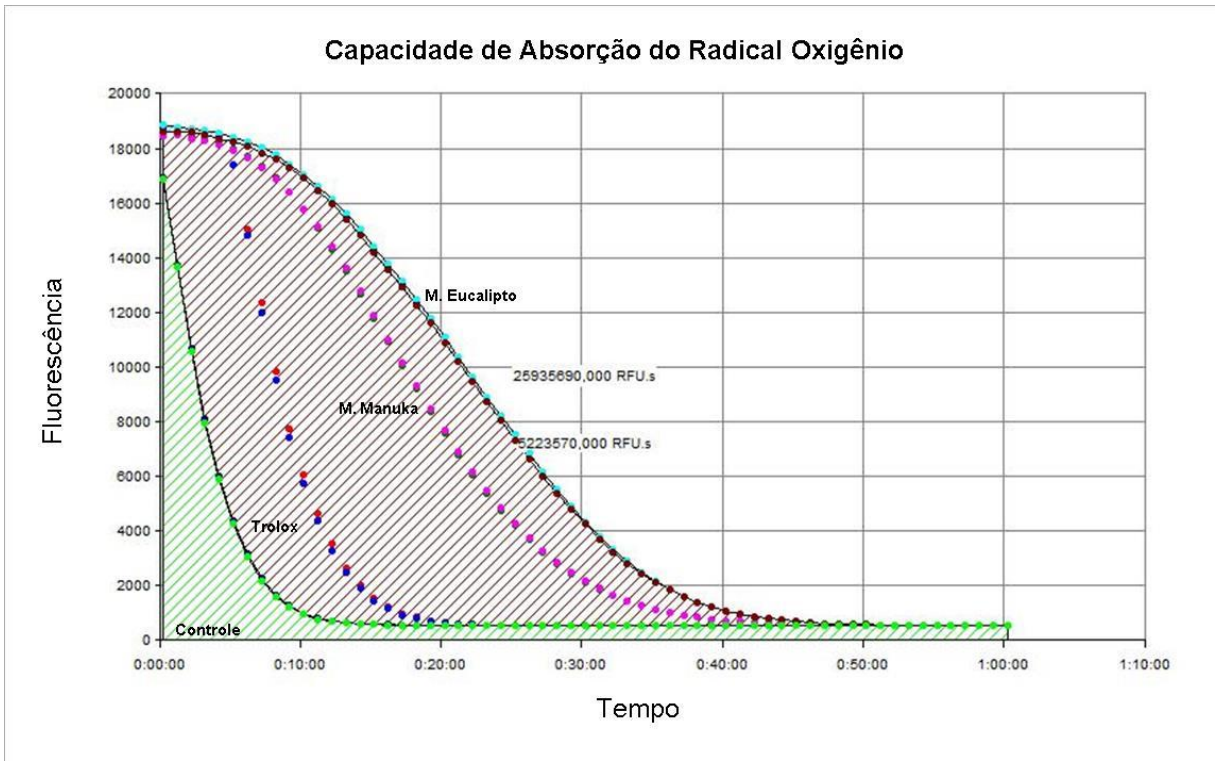


Figura 7-Capacidade de absorção do radical oxigênio ORAC

Por meio do método espectrofotométrico foram avaliados os méis de Manuka e Eucalipto em comparação com solução padrão de Trolox (análogo da vitamina E) e solução controle. A capacidade antioxidante é proporcional ao tempo de retenção da fluorescência.

4.1.7 Atividade antioxidante das amostras de mel por FRAP

Em ensaio pela metodologia FRAP,o mel de Eucalipto mostrou maior redução do reagente férrico em comparação ao mel de Manuka. O mel artificial não apresentou atividade antioxidante, como ilustrado na Figura 8. Uma curva padrão de Trolox foi utilizada no ensaio.

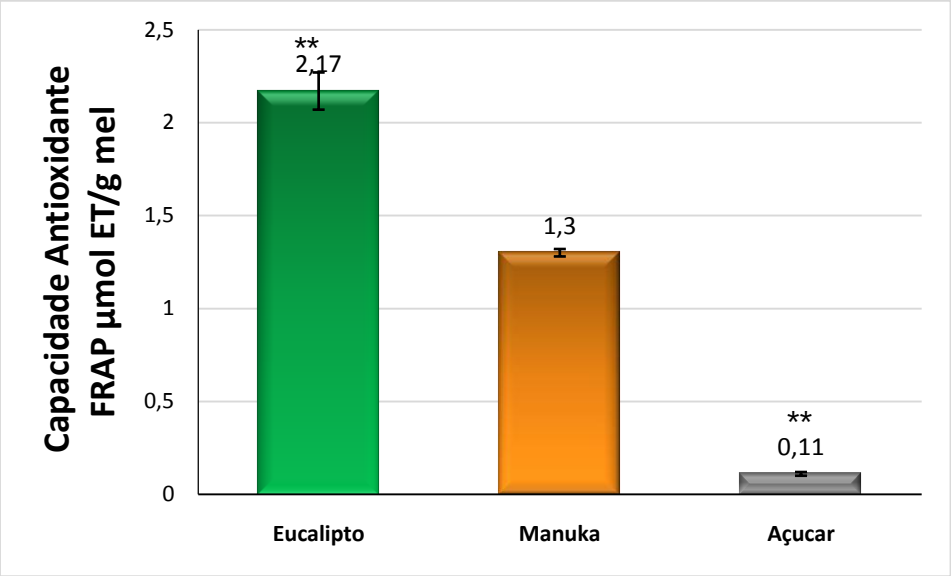


Figura 8-Determinação do poder redutor de Ferro-FRAP

Utilizando-se o método refratométrico e a reação do reagente TPTZ (ácido clorídrico e cloreto férrico) foi avaliada a capacidade antioxidante das amostras pela redução do ferro. Resultados expressos em média e desvio padrão, mostrando significância estatística pelo teste de ANOVA. Tendo como referência o mel de Manuka o pós-teste de Tukey mostrou diferença no mel de eucalipto e no mel artificial.

4.1.8 Atividade antioxidante das amostras de mel por DPPH

Pela utilização do método DPPH, o mel de Manuka apresentou atividade antioxidante maior que o mel de Eucalipto; o mel artificial não apresentou esta atividade (Figura 9).

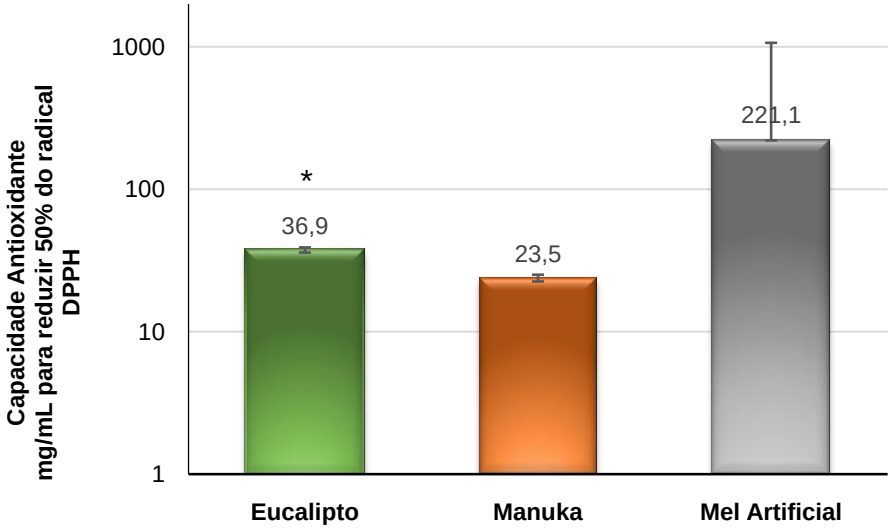


Figura 9 - Sequestro do radical estável DPPH

Utilizando-se fluorímetro e a metodologia do radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), que muda de cor uma vez reduzido, foi testada a capacidade antioxidante das amostras de mel, avaliada pela redução de 50% da concentração desta molécula. Resultados expressos em média e desvio padrão, com diferença estatística segundo teste de ANOVA. Tendo o mel de Manuka como referência o pós-teste de Tukey mostrou diferença nos resultados do mel de eucalipto * $p<0,05$.

4.1.9 Teor de Fenólicos totais

A maior quantidade de fenólicos foi detectada no mel de Manuka, seguido pelo mel de eucalipto (com 65% menos de fenólicos) e o mel artificial, sem nível detectável (Figura 10). Amostras foram analisadas tomando como referência o ácido Gálico (fenólico).

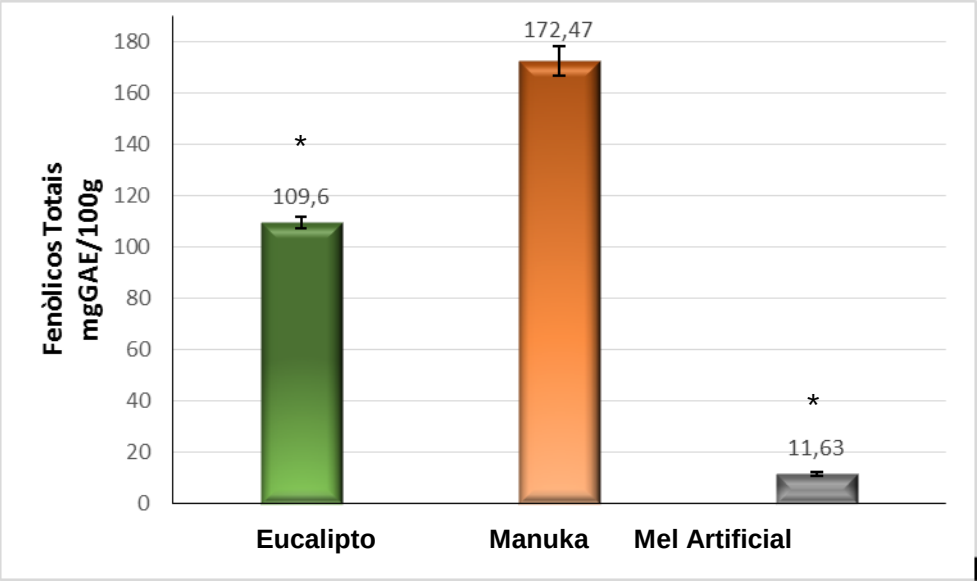


Figura 10 - Capacidade redutora do Folin-Ciocalteu. Fenólicos totais

Utilizando-se espectofotômetro e reação entre o Folin-Ciocalteu e o carbonato de sódio, foi analisada a capacidade de redução do Folin pelas amostras. Resultados expressos em média e desvio padrão, com diferença estatisticamente significativa pelo teste ANOVA. Tendo como padrão o mel de Manuka, o pós-teste Tukey mostrou diferença no mel de Eucalipto e no artificial * $p < 0,05$.

4.1.10 Teor de Flavonóides totais

A maior concentração de flavonóides foi encontrada no mel de Manuka, com resultado muito superior ao mel de Eucalipto e ao mel artificial, no qual não foi possível a detecção do composto. Como padrão de análise foi utilizada a quercetina e a validação foi feita por meio de controle dos reagentes(Figura 11).

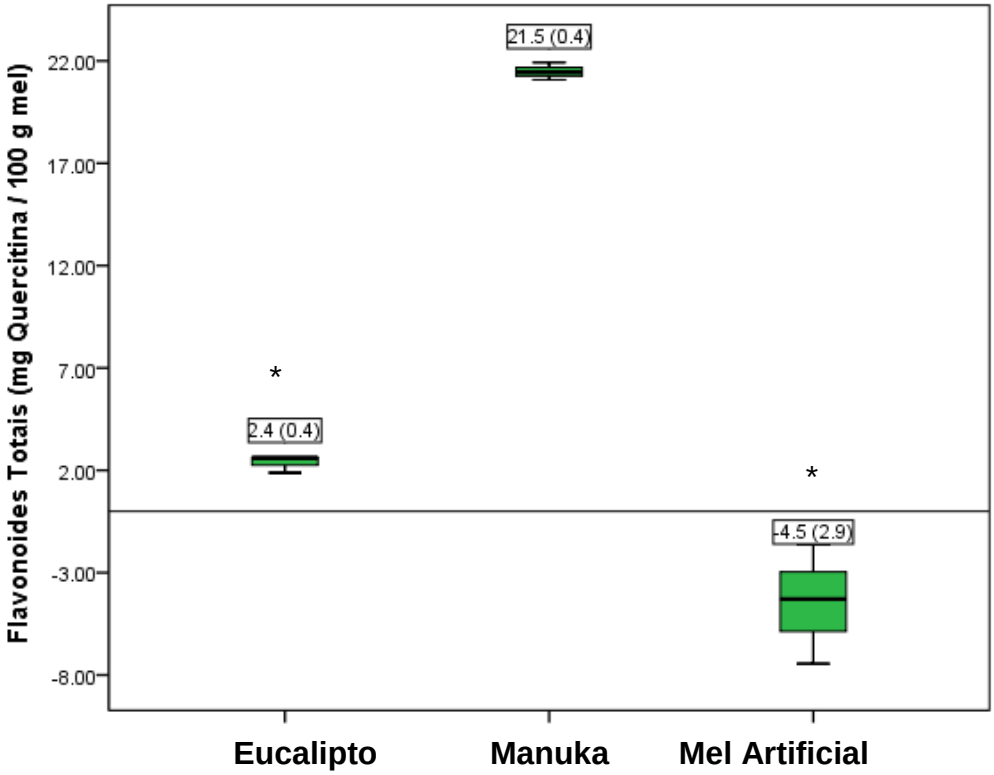


Figura 11 - Concentração de flavonóides totais

Foi determinada a concentração de flavonóides usando espectofotômetro e a reação dentre cloreto de alumínio e hidróxido de sódio junto a amostra. Resultados expressos em medianas e quartis, com diferença estatisticamente significativa segundo ANOVA. Tendo como referência o mel de Manuka, o pós-teste Tukey mostrou diferença no mel de Eucalipto e o artificial * $p<0,05$.

4.2 Caracterização dos animais de experimentação

Posterior à indução do diabetes, observaram-se algumas mudanças no fenótipo e no comportamento nos animais diabéticos em comparação aos controles: aumento da glicemia em jejum, do volume urinário (poliúria), da ingestão de água e diminuição no ganho de peso conforme mostrado naTabela 4. Foram observadas mudanças na pele dos animais diabéticos, nos quais foi mais fina e menos resistente à manipulação (p. ex: na tricotomia); estas características foram também evidenciadas na morfologia histológica como mostra aFigura 12 onde aparecem microfotografias de pele pré-lesão de ambos os grupos de animais (controles e diabéticos); é possível observar a estrutura da pele desde a camada mais superficial até a mais profunda, começando pela epiderme, seguindo pela derme (contendo anexos e matriz extracelular densa com fibroblastos) e terminando no tecido subcutâneo (contendo adipócitos). Na comparação dos grupos, observa-se então na pele dos animais diabéticos, derme com matriz menos corada e ausência do tecido adiposo. Não foi observada diferença na quantidade aparente de anexos e células.

Parâmetro	Controles	Diabéticos
Peso pré-indução	35,4±3.4 g	34,4±2,8 g
Peso após 30 dias de diabetes	39,7±3,0 g	30,8±2,1 g***
∆ Peso:prévs pós indução	4,3±2,3 g	-3,7±3,1 g***
Glicemia pré-indução	138,3±11,8 mg/dL	152,3±12,7 mg/dL
Glicemia após 30 dias-indução	144,3±11,9 mg/dL	> 600 mg/dL***
∆ Glicemia:prévs pós indução	6±2,8 mg/dL	447,7±12,70 mg/dL***

Tabela 4- Caracterizaçãodos animais de experimentação

Comparação de indicadores de caracterização dos animais diabéticos e controles. Resultados expressos em médias e desvio padrão. Tendo como referência os animais controles, os resultados mostraram diferença estatisticamente significativa de acordo com o teste T de comparação de médias (***p<0.001) indicando valores diferentes nos animais diabéticos N= pelo menos 6 animais por grupo.

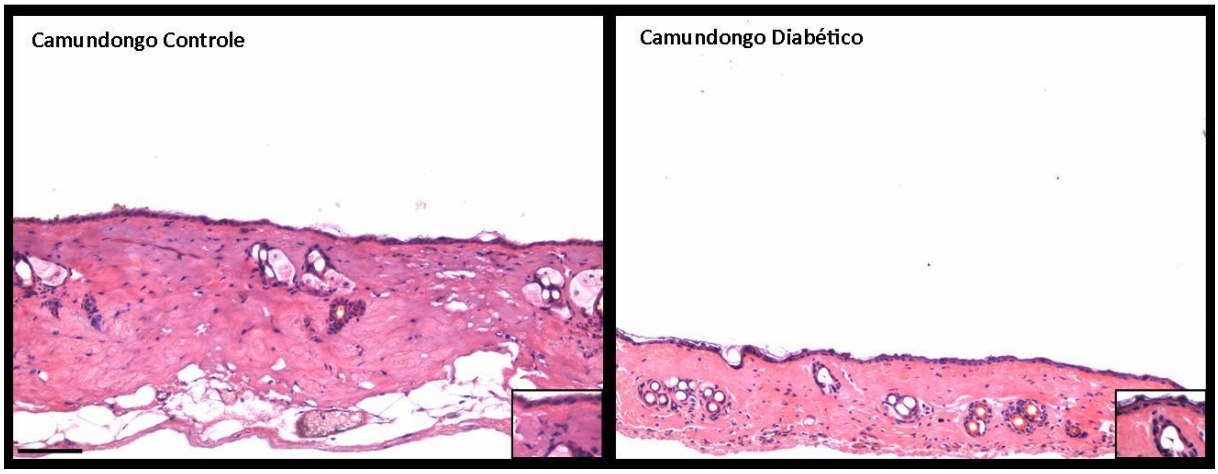


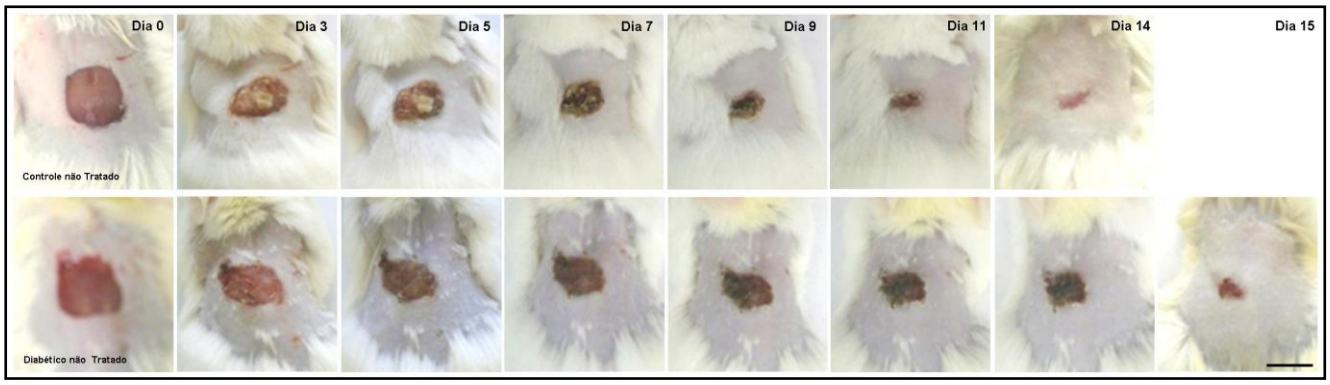
Figura 12 - Análise histológica da pele pré-lesão de camundongos controles e diabéticos

Fotomicrografias de pele pre-lesão de camundongos diabéticos e controles. Tecidos foram corados com Hematoxilina e Eosina. Imagens representativas de pelo menos 5 animais por grupo. EP=Epiderme, DE=Derme, AX=Anexos, AD=Adiposo. Barra 100 µm. Caixas menores mostram detalhes em maior aumento.

4.3 Cicatrização de animais diabéticos e controles não tratados

Após a confecção das feridas cutâneas de espessura total nos animais diabéticos e controles sob anestesia, foi feito acompanhamento do processo de cicatrização, sem intervenções adicionais. Observou-se que a pele dos animais diabéticos foi frágil à manipulação. Os animais diabéticos cicatrizaram no dia 18, enquanto os animais controle cicatrizaram no dia 14(Figura 13).

A.



B.

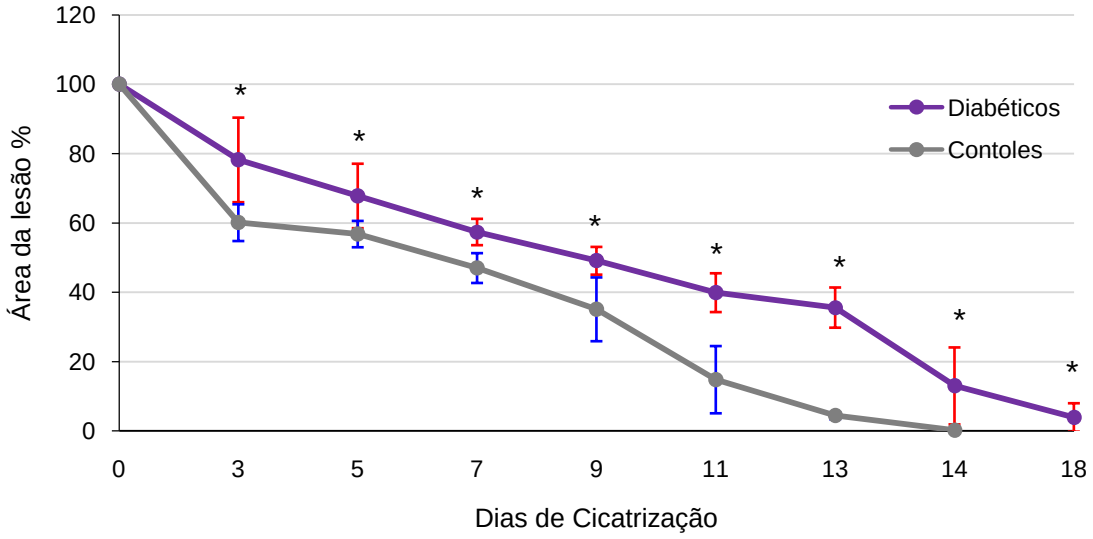


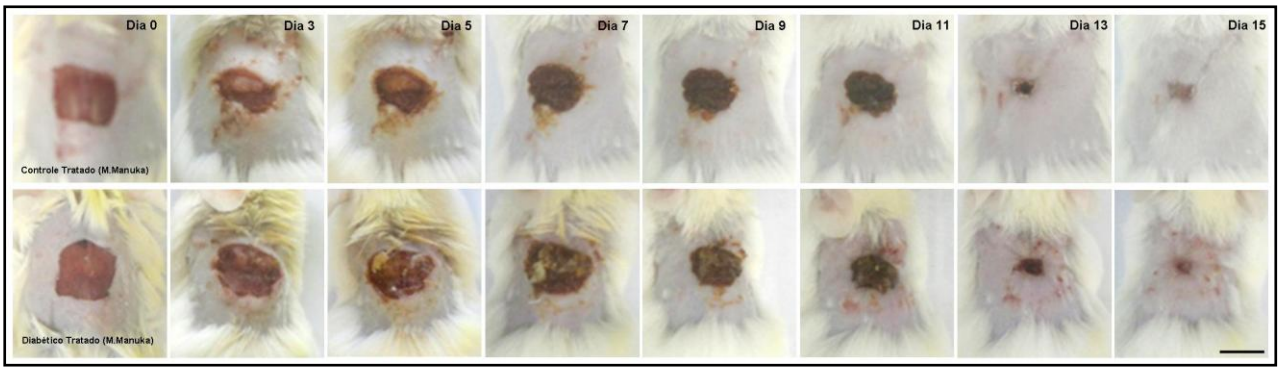
Figura 13 - Cinética da cicatrização de animais diabéticos e controles não tratados

A. Registro fotográfico e aspecto da cicatrização de animais não tratados Barra=1 cm. **B.** Comparação da cinética da cicatrização entre animais controles e diabéticos não tratados, por meio da mensuração da área da lesão usando a ferramenta ImageJ. * Resultados com diferença estatisticamente significativa de acordo com o teste t de comparação de médias ($p<0.05$) indicando maior área nos animais diabéticos no dia 14 e atraso no processo cicatricial com respeito aos controles. Barra=1 cm. N= pelo menos 5 animais por grupo.

4.4 Atividade biológica do mel de Manuka na cicatrização de feridas

O tratamento tópico das feridas foi feito com aplicação aberta do produto (sem uso de cobertura secundária), diariamente, no mesmo horário, até o dia 14 de tratamento. Neste tratamento o grupo de animais tratados recebeu mel de Manuka (Manuka Honey®), com o qual os animais diabéticos adiantaram sua cicatrização ao dia 15 (diabéticos não tratados cicatrizaram no dia 18).Os animais controles, tanto os tratados quanto os não tratados, cicatrizaram no dia 14. Foi observado um aumento na área da lesão nos dias 5º, 7º e 9º em ambos os grupos tratados em comparação aos grupos não tratados, correspondente à fase tardia de inflamação; os detalhes são mostrados naFigura 14.

A.



B.

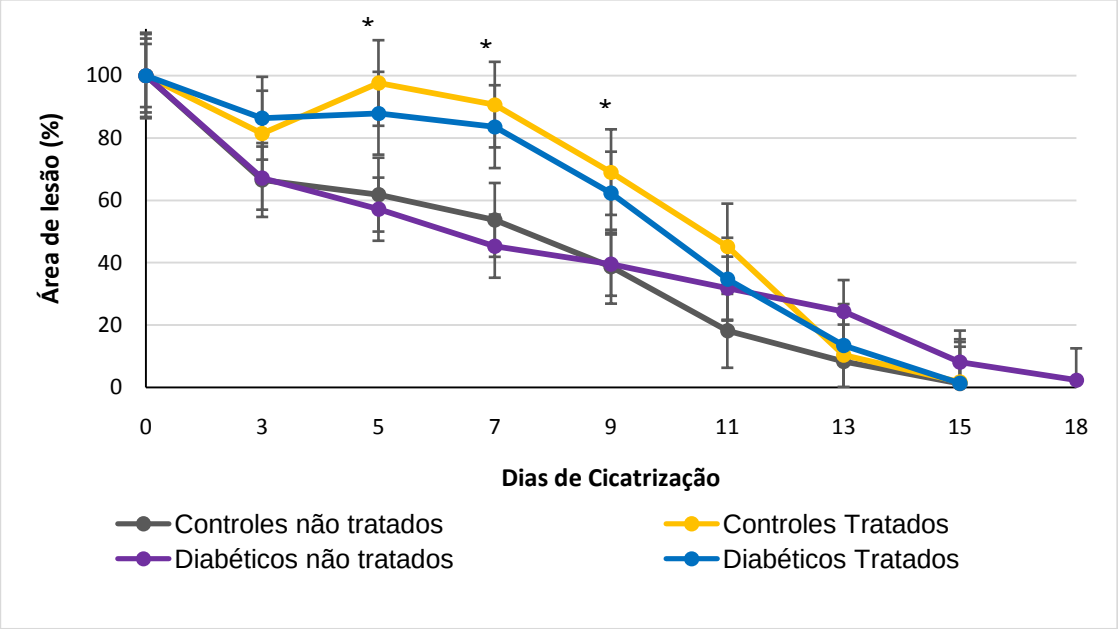


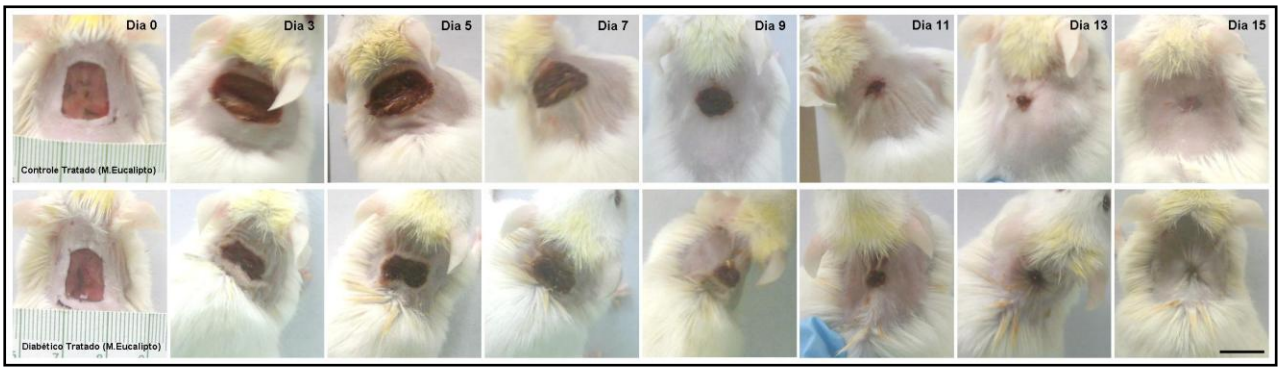
Figura 14 - Cinética da cicatrização de animais tratados com mel de Manuka

A. Registro fotográfico e aspecto da cicatrização de animais tratados. Barra = 1 cm. **B.** Comparação do processo de cicatrização entre todos os grupos de animais. Foi usada a ferramenta *Image J* para medir as áreas das lesões. Resultados expressos em médias e desvio padrão. Usando os animais não tratados como referência, os resultados tiveram diferença estatisticamente significativa de acordo com o teste ANOVA (*$p < 0.05$), indicando áreas maiores nos animais tratados de cada grupo nos dias 5°, 7°, 9°, com respeito aos não tratados. Barra= 1 cm. N= pelo menos 5 animais por grupo.

4.5 Atividade biológica do mel de Eucalipto na cicatrização de feridas

Foi utilizado para o tratamento tópico o mel de Eucalipto previamente caracterizado e com propriedades antioxidantes aferidas. Os animais diabéticos cicatrizaram no dia 15 assim como os controles, diferentemente dos animais diabéticos não tratados, que apresentaram atraso na cicatrização. De maneira geral, os animais diabéticos apresentaram menor área de lesão durante a fase inflamatória (provavelmente associada a um edema menor). O tratamento com mel atenuou esta diferença em relação aos animais controles (**Erro! Argumento de opção desconhecido.**).

A.



B.

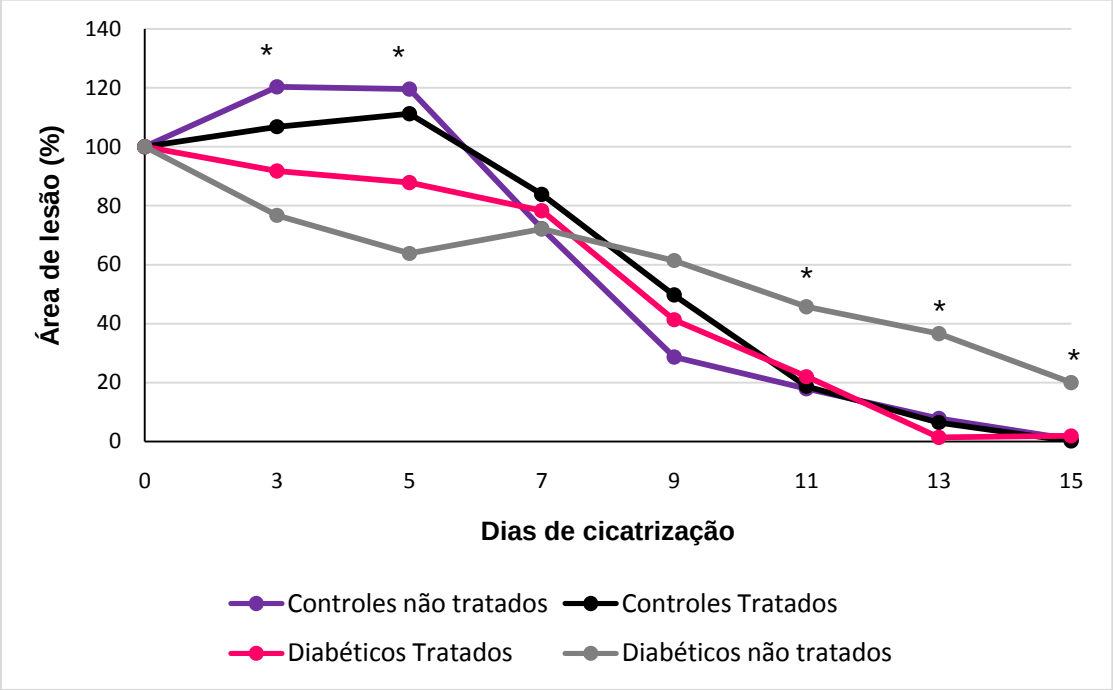


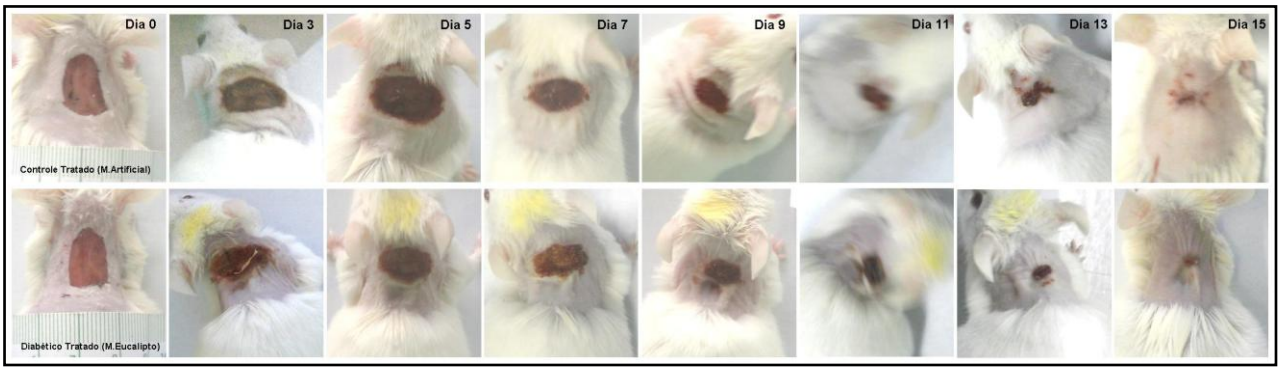
Figura 15 - Cinética da cicatrização de animais tratados com mel de Eucalipto

A. Registro fotográfico e aspecto da cicatrização de animais tratados. Barra=1cm. **B.** Comparação do processo de cicatrização entre todos os grupos de animais. Foi usada a ferramenta *Image J* para medir as áreas das lesões. Resultados expressos em médias e desvio padrão, analisados com teste ANOVA que mostrou diferença significativa. O pós-teste Tukey mostrou diferença indicando áreas maiores nos animais tratados de cada grupo nos dias 3°, 5° em comparação aos não tratados e nos dias 11º, 13º e 15º nos diabéticos não tratados em comparação aos outros grupos (*p<0,05). Barra=1 cm. N= pelo menos 5 animais por grupo.

4.6 Atividade biológica do mel artificial na cicatrização de feridas

Seguindo o mesmo protocolo dos grupos experimentais, foi feita aplicação tópica diária de mel artificial, preparado por meio da mistura dos principais açúcares presentes no mel de Eucalipto. Os resultados, ilustrados naFigura 16,mostraram valores similares de área para os animais tratados e não tratados.Não houve aceleração do processo de cicatrização nos animais diabéticos tratados, que no 15º dia ainda apresentavam aproximadamente 20% da ferida aberta.

A.



B.

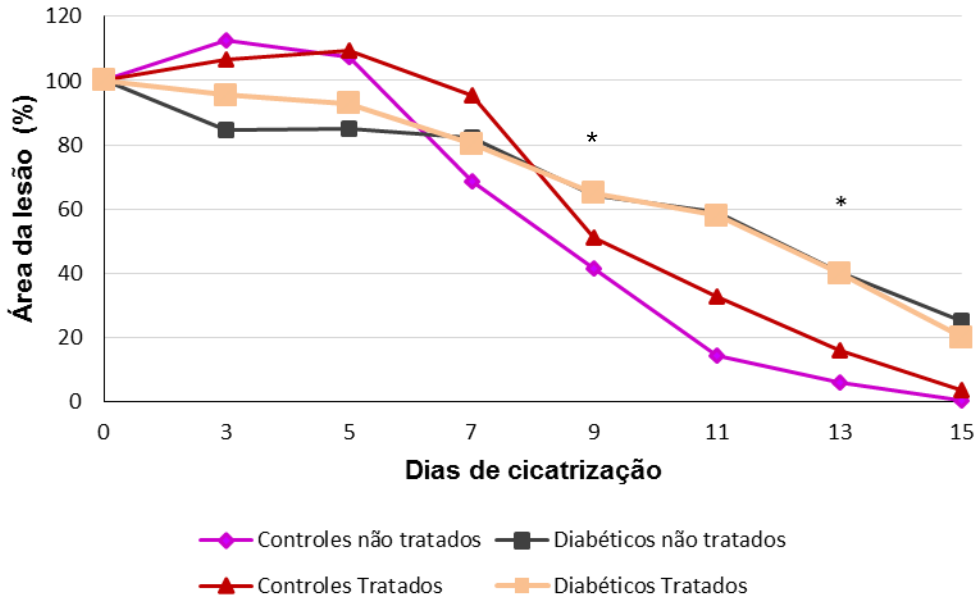


Figura 16 - Cinética da cicatrização de animais tratados com mel artificial

A. Registro fotográfico e aspecto da cicatrização de animais tratados. Barra = 1cm. **B.** Comparação do processo de cicatrização entre todos os grupos de animais. Foi usada a ferramenta *ImageJ* para medir as áreas das lesões. Resultados expressos em média e desvio padrão, analisados pelo teste ANOVA que mostrou diferença estatisticamente significativa entre os resultados. O pós-teste Tukey mostrou diferença no dia 9º e 13º da cicatrização, entre os animais controles e diabéticos (* $p < 0.05$). N= pelo menos 2 animais por grupo.

4.7 Comparação da cinética da cicatrização do mel de Manuka, Eucalipto e Mel Artificial

Os três tratamentos foram aplicados a grupos de animais diferentes, em momentos diferentes. Cada grupo teve animais controles e diabéticos não tratados, considerando-se a possível influência de diferentes variáveis do ambiente no processo cicatricial. Para o mel de Eucalipto e de Manuka os resultados foram similares no dia final de reepitelização (dia 15), porém o efeito dos méis sobre a inflamação do tecido, gerando aumento nas áreas foi diferente, sendo que o grupo tratado com mel de Manuka teve aumento persistente da área da lesão por mais dias (5°,7°,9°) em comparação com o mel de Eucalipto,que promoveu aumento mais precoce e rápido (3° e 5°). O tratamento com mel artificial não acelerou o processo cicatricial dos animais diabéticos (Figura 17).

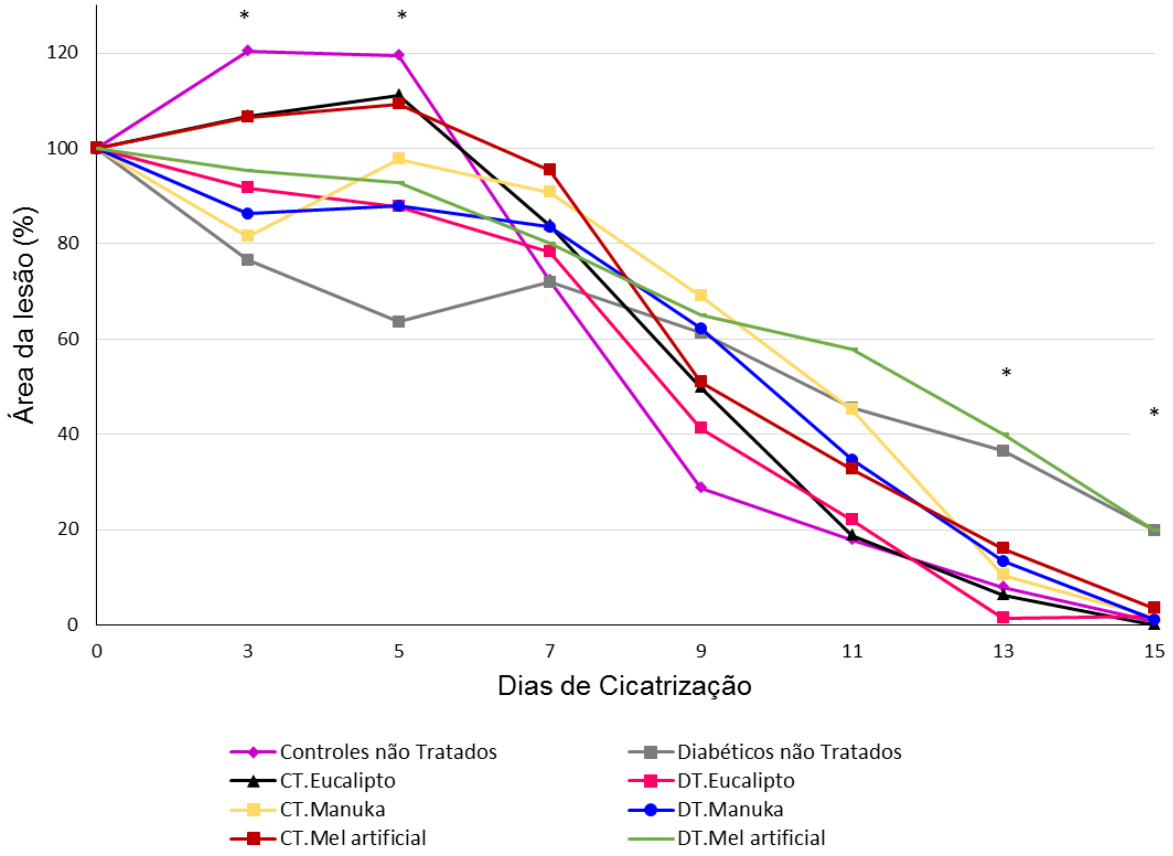


Figura 17 - Comparação da cinética da cicatrização entre os diferentes tratamentos

Usando a ferramenta ImageJ foi quantificada a área das lesões documentadas por meio de fotografias. O gráfico mostra a comparação do processo de cicatrização entre os grupos de animais não tratados e tratados com mel de Eucalipto, Manuka e mel artificial. Resultados expressos em média e desvio padrão. Teste de ANOVA com pós-teste de Tukey mostrou diferença estatisticamente significativa entre os animais não tratados e os tratados no dia 3º e 5º, e entre os animais controles e diabéticos no dia 13º e 15º (*$p < 0.05$). N= pelo menos 2 animais por grupo.

4.8 Morfologia do dia 3º das feridas dos animais controles e diabéticos tratados com mel de *Apis Mellífera* e mel artificial

As características morfológicas do tecido da ferida no 3° dia do processo de cicatrização foram avaliadas utilizando-se microscopia óptica, em amostras de animais controles e diabéticos. Como é mostrado na Figura 18, os animais não tratados apresentaram na superfície da ferida tecido necrótico composto por densa matriz protéica e grande infiltrado inflamatório (menor nos diabéticos), seguido de tecido conjuntivo contendo adipócitos presente nos controles e diminuído nos diabéticos. Já os animais tratados apresentaram aumento no infiltrado inflamatório e na espessura do tecido necrótico da superfície da ferida. Observa-se diferença entre o infiltrado dos animais tratados com mel de Manuka e Eucalipto em comparação com o mel artificial, por ter mais tecido necrótico e maior infiltrado.

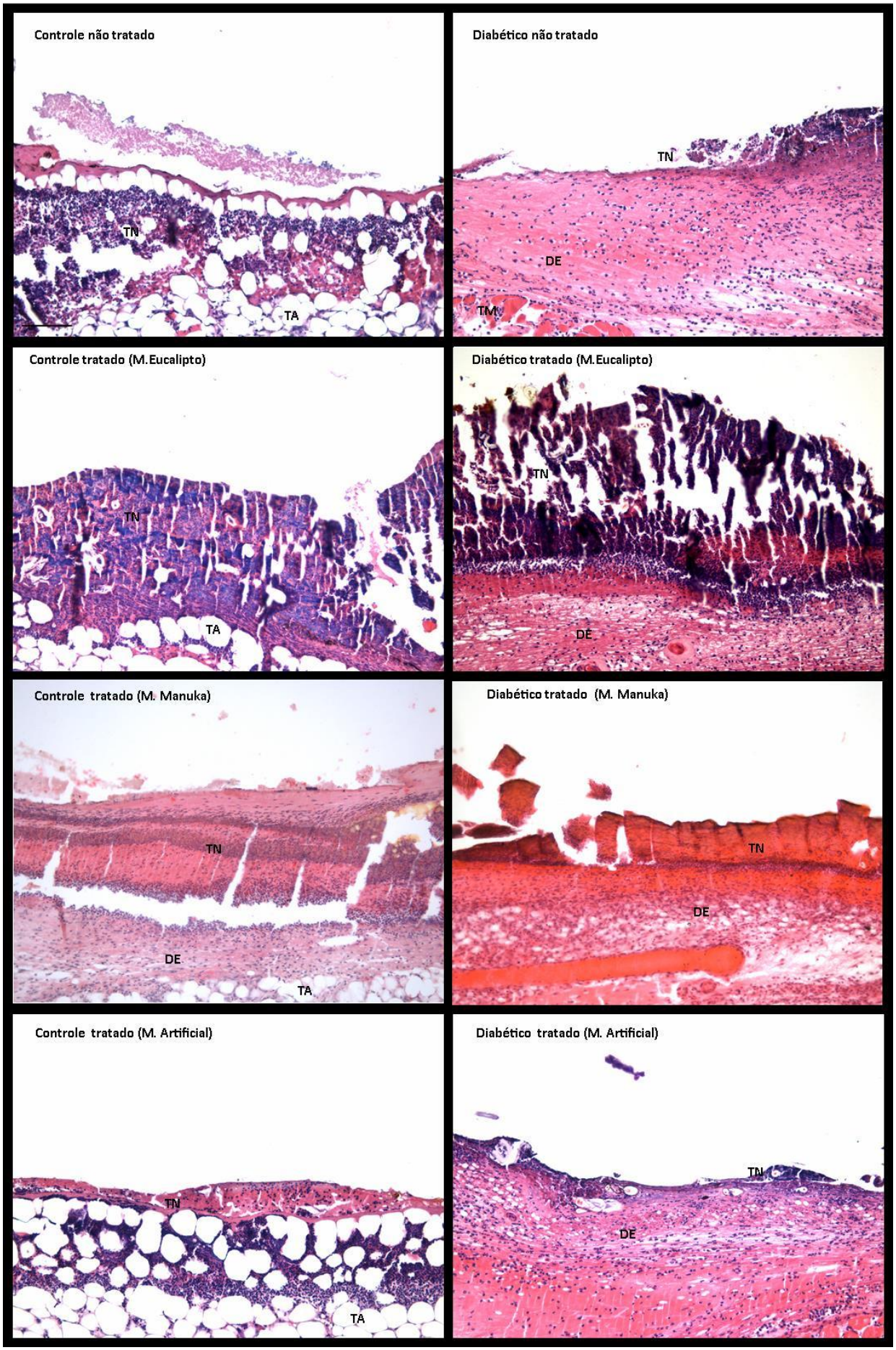

Controle não tratado
TN
TA
Diabético não tratado
TN
DE
TM
Controle tratado (M.Eucalipto)
TN
TA
Diabético tratado (M.Eucalipto)
TN
DE
Controle tratado (M. Manuka)
TN
DE
TA
Diabético tratado (M. Manuka)
TN
DE
Controle tratado (M. Artificial)
TN
TA
Diabético tratado (M. Artificial)
TN
DE

Figura 18-Análisehistológica das feridas dos animais controles e diabéticos no 3° dia de cicatrização

Fotomicrografias representativas da ferida de animais controles e diabéticos, no dia 3° de cicatrização. Os cortes foram corados com Hematoxilina-Eosina para avaliar os aspectos gerais da ferida e a presença de células inflamatórias. Imagens representativas de pelo menos 5 animais por grupo. TN= Tecido necrótico; AD=Adiposo; DE=Derme; TM=Tecido muscular; Barra=100 µm.

4.9 Morfologia do dia 15º das feridas dos animais controles e diabéticos tratados com mel de Eucalipto, mel de Manuka e mel artificial.

As características morfológicas da ferida no 15° dia do processo de cicatrização em animais controles e diabéticos. Como é mostrado naFigura 19, tanto os animais controle não tratados, quanto os tratados com mel de Manuka, de Eucalipto e Artificial apresentaram reepitelização completa. Os animais diabéticos não tratados mostraram tecido necrótico sobre a ferida e infiltrado inflamatório crônico, evidenciando o atraso no processo cicatricial. Estefato foi revertido nos animais tratados com mel de Manuka e eucalipto, já que os diabéticos tratados apresentaram reepitelização. Observa-se infiltrado inflamatório agudo nos animais tratados com mel de Manuka

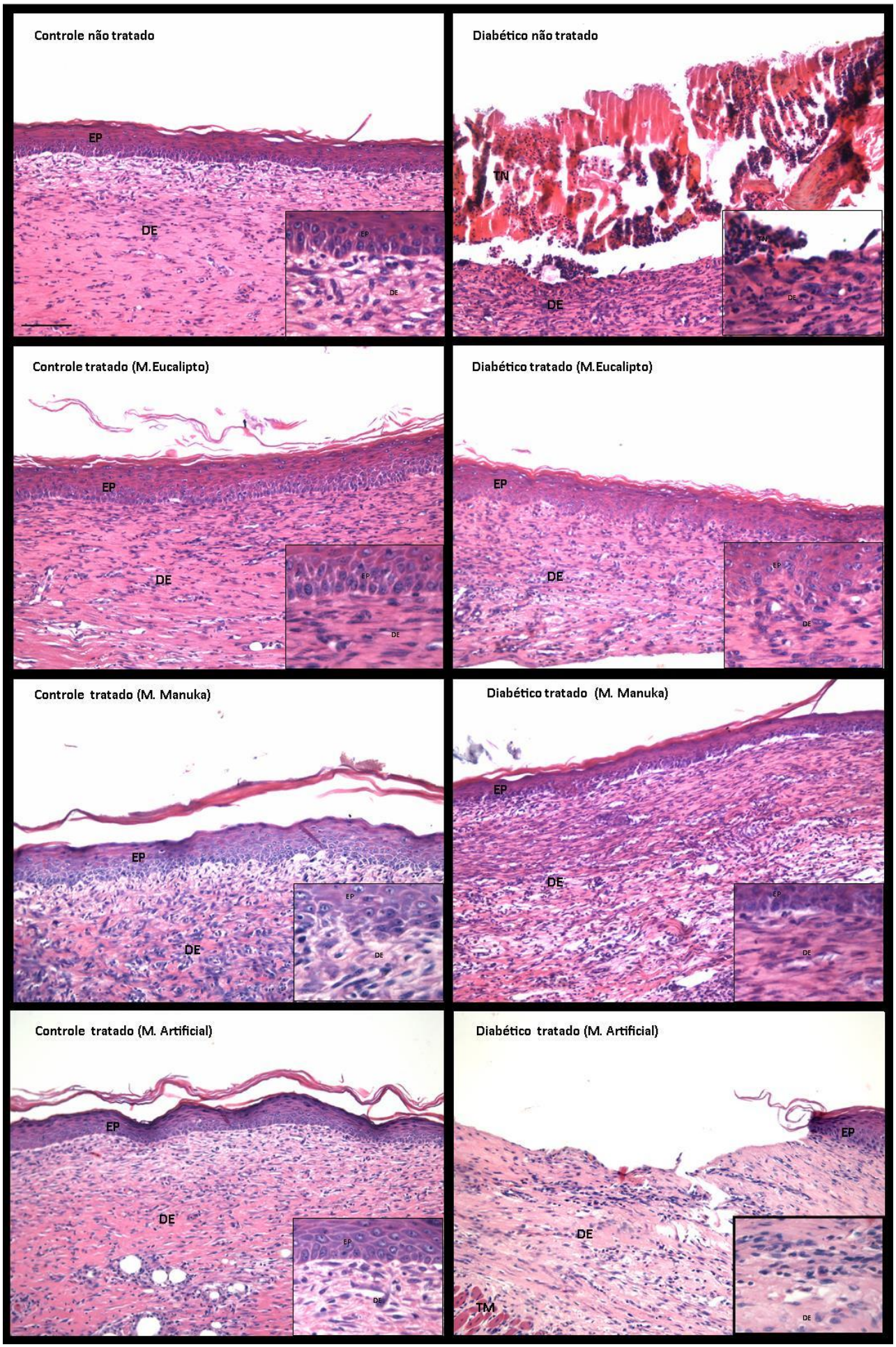

Controle não tratado
EP
DE
Diabético não tratado
TN
DE
Controle tratado (M.Eucalipto)
EP
DE
Diabético tratado (M.Eucalipto)
EP
DE
Controle tratado (M. Manuka)
EP
DE
Diabético tratado (M. Manuka)
EP
DE
Controle tratado (M. Artificial)
EP
DE
Diabético tratado (M. Artificial)
EP
DE
TM

Figura 19 - Análise Histológica das feridas dos animais controles e diabéticos no 15° dia de cicatrização

Fotomicrografias de tecido cicatricial de camundongos diabéticos e controles no 15º dia após a confecção de ferida. Tecidos foram corados com Hematoxilina e Eosina. Imagens representativas de pelo menos 5 animais por grupo. TN=Tecido necrótico EP=Epiderme; DE=Derme; TM= Tecido muscular; Barra 100 µm. Caixas menores mostram detalhes em maior aumento.

5 DISCUSSÃO

5.1 O Mel Brasileiro de Eucalipto tem características com potencial bioativo

Vários estudos têm descrito as propriedades dos méis brasileiros, destacando as diferenças existentes na composição e caracterização das amostras devido às fontes vegetais, umidade e condições climáticas (SILVA et al., 2006). Marchini et al. (2005) analisaram 121 amostras de mel de *Apis Mellíferas* coletadas em 84 municípios do Estado de São Paulo, com o objetivo de agrupá-las segundo suas características físico-químicas; os autores concluíram que: "..a origem floral interfere decisivamente nas características dos méis", separando-as entre méis silvestres (multifloral) e de eucalipto (monofloral), reconhecendo como variáveis diferenciadoras adicionais, a umidade e a condutividade elétrica.

Sendo assim, todo estudo que vise a caracterização de méis deve levar em consideração a origem botânica e os indicadores básicos de qualidade como umidade, HMF, acidez livre e cor. Neste estudo o mel de Manuka, uma referência internacional para apiterapia, apresentou os maiores valores de umidade e HMF entre as amostras analisadas. A umidade tem sido associada à origem botânica, uma vez que é fortemente influenciada pela temperatura e a umidade relativa do ambiente, quando é superior a 60% (OLAITAN et al., 2007; SILVA et al.,2016; SOUZA et al., 2016); é também um indicador do risco potencial de contaminação por fungos e leveduras e posterior fermentação do mel. As abelhas operculam o mel (fechamento do favo de cera) quando a umidade está entre 17 e 18%, indicando sua maturação (EVANGELISTA; RODRIGUES, 2005 apud PIRES, 2011). Por esta razão, valores de umidade maiores que 20% podem ser ocasionados pela coleta prematura do produto.

Marchini et al. (2011) apresentaram média de umidade em méis de eucalipto de 21,20%, similar à amostra de eucalipto com maior umidade deste estudo (21,7 %). Ritcheret al. (2011), em análise de 19 amostras de mel do RS, encontraram porcentagens de umidade entre 15,4 a 20,9%, semelhantes aos valores encontrados neste estudo para méis da mesma procedência (média de 19.8%), reconhecendo-se então o Eucalipto como talvez a origem botânica que confere maior umidade ao mel, entre outras do Brasil.

No entanto, o mel de Manuka da origem botânica *Leptospermumscoparium,* utilizado neste estudo, superou os níveis de umidade referidos na maioria das publicações (23,7%), o que possivelmente reflete seu processamento, condições de acondicionamento, armazenamento e transporte, já que é originário da Nova Zelândia. Este mel possui elevada higrocospicidade (devido ao alto teor de açúcares), o que pode provocar aumento da umidade por captação externa durante a manipulação (GOIS et al., 2013). Corroborando esta hipótese, Moniruzzamanet al. (2013), trabalhando na Malasia (clima tropical), apresentaram valor de umidade para o mel de Manuka de 11.59%, muito menor que o observado neste estudo, sendo que a metodologia aplicada foi semelhante. Curiosamente, não existem relatos na literatura sobre fácil fermentação de amostras deste mel; pelo contrário, trata-se de mel com considerável capacidade antimicrobiana (VISAVADIAet al., 2008).

O HMF é um indicador de superaquecimento e longo ou inadequado armazenamento, porque nestas condições o alto teor de açúcares facilmente forma a molécula de HMF, dentre outras similares (KHALIL et al., 2010). Pode também estar associado à temperatura tropical dos locais de armazenamento; Moura (2006), em experimento sobre o efeito da temperatura na estocagem de mel, afirmou que o teor de HMF dos méis mantidos à temperatura ambiente no Estado do Piauí foram 20,6% maiores que os dos méis refrigerados (28,33 ± 1,45 vs 22,48 ± 0,89, respectivamente). Com resultados similares, Stephenset al. (2010) analisaram comparativamente o conteúdo de HMF em três grupos de méis de Manuka: frescos (5-6,5 $mg.kg^{-1}$) , com 5 anos de armazenamento (61 e 98 $mg.kg^{-1}$) e superaquecidos a 80º C durante 9 horas (68 $mg.kg^{-1}$); evidenciando claramente o efeito do tempo de armazenamento e da temperatura. Neste estudo, o mel de Manuka apresentou HMF de 64,84 $mg.kg^{-1}$, valor superior àquele relatado por Moniruzzaman et al. (2013) (40 $mg.kg^{-1}$), onde correlacionaram o HMF com elevado conteúdo de sacarose e similar aos mostrados por Stephens et al. (2010) concluindo que nossas amostras de mel podem ter sido armazenadas por longo período antes do seu uso.

Quanto ao mel de Eucalipto, Nascimento (2016), em análise de 52 amostras de mel do RS, das quais 28 foram de Eucalipto, encontrou valores de HMF na faixa de 0,47 e 22,72 $mg.kg^{-1}$, na qual o resultado do presente estudo fica identificado

(1,22 $mg.kg^{-1}$). Marchini et al, (2005) apresentaram média de 17,4 $mg.kg^{-1}$ para méis de eucalipto e de 19,30 $mg.kg^{-1}$ para méis silvestres de São Paulo, enquanto Ritcher et al., (2011) apresentaram níveis superiores (21,2 $mg.kg^{-1}$) aos encontrados por nós em méis do RS. Estes estudos evidenciam a grande possibilidade de variação do conteúdo de HMF, dependendo do processo de produção e do tipo de mel.

O pH e a acidez livre são propriedades associadas à capacidade e cicatrizante do mel e devem-se principalmente à presença de ácido glucônico, produzido pela enzima glicose oxidase sobre a glicose presente; a acidez livre é um indicativo da transformação dos açúcares em ácidos orgânicos (HABIB et al., 2014; KIRS et al., 2011). Não existem valores mínimos ou máximos para o pH na legislação, mas é um consenso que o pH ácido é importante para a preservação do mel e, segundo Boussaid et al.(2014), influencia a estabilidade e o tempo de prateleira do produto.

Nascimento (2016) encontrou média de pH em amostras de eucalipto do RS, de 4,23±0,16 e acidez livre de 36,5±8,51 $mEq.Kg^{-1}$, similares à amostra no nosso estudo (4,06±0,01 e 36,12±1,21 $mEq.Kg^{-1}$). Marchini et al. (2004) também encontraram resultados similares em méis brasileiros, nos quais o pH se encontrara entre 3,26 e 4,31 $mEq.Kg^{-1}$. Sobre achados na literatura a respeito do mel de Manuka, Snow e Harris (2004) reportaram valores de pH entre 3-4 em ensaios de validação da atividade não peróxido,sendo que nossos resultados encontram-se na mesma faixa; no entanto, Moniruzzaman et al. (2013) reportaram valor de 4,10 para o pH, influenciado talvez pelas variáveis ambientais e de armazenamento.

Sobre efeitos clínicos do pH do mel, Lusby e Wilkinson (2002) afirmaram que o pH ácido cria e mantém ótimas condições para o funcionamento dos fibroblastos, que se beneficiam desta propriedade durante a cicatrização. Gethinet al. (2008), em estudo prospectivo não randomizado de 17 pessoas (20 feridas), destacaram a importância do controle do pH na avaliação e tratamento de feridas crônicas, tornando-o indicador de mal prognóstico da cicatrização (feridas crônicas com pH>8 não tiveram diminuição da área durante o tempo de estudo). Naquele estudo, o mel de Manuka (Comvita, Slough UK) foi aplicado durante 2 semanas, sendo o pH da superfície das lesões e a área das mesmas avaliados antes e após esta aplicação;

os principais resultados foram a diminuição estatisticamente significativa do pH, associada à redução de 8,1% da área da lesão quando houve redução de 0,1 unidade de pH na superfície, afirmando-se a utilidade do tratamento com mel de pH ácido.

Com respeito aos açúcares presentes no mel, sabe-se que aqueles presentes em maior quantidade no mel são os monossacarídeos frutose e glicose, que constituem um substrato para a enzima Glicose Oxidase, adicionada pelas abelhas e responsável pela formação de peróxido de hidrogênio, principal fator da atividade antimicrobiana. Outros açúcares polissacarídeos como Sacarose, Turanose e Maltose, e trissacarídeos como a Erlose, estão presentes também em concentrações menores. Dependendo das condições, tempo de armazenamento e amadurecimento, estes trissacarídeos podem se transformar em monossacarídeos; sua preservação, no entanto, está associada ao alto valor nutricional do mel (OUCHEMOUKHA et al., 2010). Segundo Yassin (2013), os monossacarídeos encontrados no mel não são facilmente identificáveis no néctar, sendo produzidos por transformações bioquímicas influenciadas pelas enzimas depositadas pelas abelhas e ação dos ácidos presentes no mel durante o armazenamento.

O conteúdo de açúcares no mel é associado à hiperosmolaridade, viscosidade e higrocospicidade, propriedades que, no tratamento de feridas, são responsáveis pela atividade antimicrobiana e pela diminuição do edema local, conforme mencionado por Mohammad (2014) e Abeshu (2016). Estes autores afirmam que a concentração de açúcares do mel é responsável por diminuir a disponibilidade de água intracelular dos microrganismos, inibindo seu crescimento; além disso, exerce efeitos físicos no tecido, conforme já mencionado. Em conclusão, açúcares de baixo (monossacarídeos) e alto peso molecular (dissacarídeos e trissacarídeos) definem a osmolaridade, propriedade importante para a bioatividade do mel.

No presente estudo, o conteúdo de dissacarídeos e trissacarídeos para o mel de Manuka e de Eucalipto foi de 4,2% e 3,9%, respectivamente, enquanto o conteúdo de monossacarídeos correspondeu a aproximadamente 96%, conforme já relatado na literatura (OLAITAN et al., 2007). Estes valores, no entanto, foram

superiores aos relatados por Moniruzzamanet al. (2013), que encontraram 60,93% para o mel de Manuka.

5.2 O mel de Eucalipto tem capacidade antioxidante relevante

Resultados deste estudo mostraram que o mel de Eucalipto tem atividade antioxidante superior ao mel de Manuka, segundo resultados obtidos em duas das três metodologias empregadas. Na literatura do Brasil e do mundo existem poucos estudos descrevendo as propriedades antioxidantes dos diferentes tipos de méis. A utilização de metodologiasdiversas, com diversos padrões, dificulta esta comparação; no entanto, reconhece-se a importância do uso destas metodologias para validar esta informação, devido à diversidade bioquímica dos compostos responsáveis por esta propriedade (ALAM et al., 2013).

Utilizando a metodologia ORAC (capacidade de absorção dos radicais de oxigênio),Gorjanovicet al. (2013) encontraram valores entre 3,7 e 12,9 $\mu molET.g^{-1}$ de mel em sete amostras de méis comerciais e artesanais da Sérvia; no presente estudo, os valores encontrados foram maiores, sendo que o mel de eucalipto apresentou o maior valor(18,48±0,34), seguido pelo mel de Manuka(15,90±0,82). Estes resultados foram similares aos obtidos por Nascimento (2016), que encontrou valores de 1,28 a 18,48 $mmolET.Kg^{-1}$ de melpara os méis de Eucalipto e Aroeira, sendo que os melhores valores estiveram nos méis de Eucalipto e Aroeira.

Utilizando a técnica DPPH (sequestro do radical estável), o presente estudo mostrou que o mel de Eucalipto apresentou valores elevados (36,9 $mg.mL^{-1}$), superados pelo mel de Manuka (23,5 $mg.mL^{-1}$). Pereira (2010) relatou valores de 38,5 $\mu g.mL^{-1}$ em análise de diferentes extratos alcoólicos de mel de Assa Peixe de São Lourenço/MG, enquanto Estevinho (2008) exibiu valor de 68 $mg.mL^{-1}$ para méis de Portugal. O estudo de Nascimento (2016) apresentou uma faixa variada de valores (25,45 a 294,26 $mg.mL^{-1}$) destacando-se o mel de aroeira e de Eucalipto com os melhores resultados.

Utilizando a técnica FRAP (poder redutor do Ferro), Canet al. (2015) encontraram valores entre 0,64 a 4,30 $\mu molET.g^{-1}$ de mel, similares aos encontrados por Gorjanovic et al. (2013), que variaram de 0,04 a 4,98 $\mu molET.g^{-1}$ de mel. Neste estudo, o mel de eucalipto teve os maiores valores (2,7 $\mu mol\ ET.g^{-1}$) em comparação

ao mel de Manuka e ao mel artificial (1,3 e 0,11 µmol ET.g^{-1}respectivamente). Estes resultados foram similares aos relatados por Nascimento (2016), que obteve os maiores valores para os méis de Eucalipto e Aroeira (0,22 a 2,11µmolET.g^{-1}). Estes resultados demonstram que os valores obtidos no presente estudo são equivalentes aos publicados na literatura e que o mel tem capacidade antioxidante.

Vários estudos mostram a correlação entre a capacidade antioxidante e a presença de compostos como os ácidos fenólicos e os flavonóides, descrevendo-os comoresponsáveis por este efeito (DE LA TORRE et al., 2014; VALLIANOU et al., 2014). Em avaliação do conteúdo de fenólicos totais (CFT) por meio da capacidade redutora do Folin-Ciocalteu, Almeida et al. (2016) avaliaram 15 amostras de méis provenientes da região Nordeste do Brasil e encontraram valores entre 27,0 e 92,7 mgEAG.100g^{-1}. Bueno-Costa et al. (2016) avaliaram 24 amostras de méis de eucalipto e silvestre do estado do RSe encontraram valores do CFT que variaram de 11,37 a 54,01mgEAG.100g^{-1}. No presente estudo, foram encontrados níveis elevados em comparação aos relatos da literatura; o mel de Manuka teve o maior CFT (172,47 mgGAE/100g), seguido pelo mel de Eucalipto (109,6 mgGAE/100g). Moniruzzamanet al. (2013), no entanto, reportaram valores inferiores para o mel de Manuka (42,96 mgGAE/100g). Por fim, validando a relação entre os ácidos fenólicos e a capacidade antioxidante, De La Torreet al. (2014), em estudo de validação da metodologia FRAP para o mel de Manuka, mostraram uma forte correlação (R2 = 0.982) entre estas duas variáveis.

Com relação ao teor de flavonóides, o mel de Manuka apresentou a maior concentração (21,5±0,4 mgQuer/100g) e o mel de Eucalipto a menor concentração (2,4±0,4 mgQuer/100g). Boussaidet al. (2014) descreveram valores de 9,58 a 22,45 mgQ.kg^{-1}, apresentando maior conteúdo para os méis de menta e o menor conteúdo para os méis de eucalipto. Segundo Nascimento (2016), a capacidade antioxidante do mel de eucalipto está associada a outros compostos fenólicos e não aos flavonóides, uma vez que este indicador teve valores inferiores aos do mel de Aroeira, porém a atividade antioxidante do mel de eucalipto foi superior no seu estudo. Diferentemente do presente estudo, Chan (2013) relatou valores de flavonóides totais de 1,16 mg.100g^{-1} em 31 amostras de mel de Manuka, sendo a

pinobanksina, a pinocembrina e a luteolina correspondentes a 61% dos flavonóides totais presentes.

Segundo Bertoncelet al. (2007) e Vallianou et al. (2014), as amostras mais escuras de mel têm maior atividade antioxidante. No presente estudo, o mel de Eucalipto e de Manuka, amostras com atividade antioxidante relevante, tiveram cor âmbar claro e âmbar escura. A cor do mel, portanto, não foi relacionada à atividade antioxidante.

Conforme esperado, a capacidade antioxidante do mel está relacionada a componentes diferentes dos glicídeos, uma vez que os resultados utilizando as três metodologias de análise de atividade antioxidante para o mel artificial foram desconsideráveis. Os ácidos fenólicos como o ácido gálico e os flavonóides como a quercetina, utilizados aqui como padrões, podem ser os responsáveis por essa atividade, mas não os únicos, considerando os resultados da quantificação destas moléculas no mel de Eucalipto em comparação ao mel de Manuka e sua superioridade na capacidade antioxidante. Weston et al. (1999) destacaram estes componentes como parte da atividade “não peróxido” do mel, mas não como os únicos responsáveis pela atividade antioxidante.

5.3 O Mel de Manuka e de Eucalipto favorecem a cicatrização cutânea em camundongos diabéticos

Existem vários relatos da literatura sobre apiterapia na cicatrização; considera-se que as atividades antimicrobiana, antioxidante, imunomoduladora e de estímulo da proliferação celular sejam relevantes neste tratamento (JULL et al., 2015; MOLAN, 2012; SONG e SALCIDO, 2011;STEWART et al., 2014). No entanto, existem poucos estudos avaliando a efetividade da apiterapia na cicatrização cutânea em diabéticos em modelo animal.

Nos resultados apresentados em capítulos anteriores deste estudo, foram evidentes os benefícios do tratamento com mel de Manuka e mel de Eucalipto no processo cicatricial em animais diabéticos, tanto no tempo total de fechamento (15 dias para diabéticos tratados vs 18 dias para diabéticos não tratados), quanto na

modulação do processo inflamatório nos primeiros 3 dias de tratamento. Este efeito parece estar associado aos componentes ativos, diferentes aos açúcares, uma vez que o efeito não foi similar nos animais tratados com mel artificial.

Demiret al. (2007), utilizando como modelo experimental camundongos Swiss diabéticos por 30 dias (induzidos com estreptozotocina), mostraram que a aplicação tópica de mel floral da Turquia (árvores de Thymus e Astragalus) acelerou a cicatrização, comparando-se a feridas hidratadas com solução isotônica nos mesmos animais. Os resultados mostraram áreas de lesão menores nas feridas tratadas com mel nos dias 3º, 6º e 9º; não houve diferença na espessura do tecido de granulação. Apesar das diferenças metodológicas, estes resultados são compatíveis com os resultados do tratamento com mel de Eucalipto e de Manuka obtidos no presente estudo, porém o efeito sobre a áreas das feridas nos nossos tratamentos foram contrários, aumentando as áreas e exercendo um efeito pró-inflamatório na fase inicial da cicatrização, que a longo prazo beneficiou o processo.

Choiet al. (2012) determinaram a efetividade de hidrogel(carboximetilcelulose) contendo mel de castanha (origem botânica Castanea Sativa-Seul, Coréia) submetido à esterilização por radiação em feridas de espessura total em camundongos diabéticos db/db (modificados geneticamente). Os resultados mostraram aceleração na cicatrização total (para 15 dias), aumento no tecido de granulação e na expressão de Ki-67 (indicador de proliferação celular), em comparação com animais tratados com hidrogel sem mel e animais sem tratamento. Também foi evidenciada a regulação jusante da proteína HO-1(Heme oxygenase1, produzida no estresse oxidativo e considerada como fator protetor tecidual), que esteve aumentada nos dias 1º e 3º de cicatrização nos animais tratados com hidrogel contendo mel.

Com relação aos mecanismos envolvidos, Timmet al. (2008) observaram *in vitro* que o mel de Manuka estimula a liberação de interleucina-6 (IL-6), uma citocina pró-inflamatória, por células Mono-Mac 6 (monócitos humanos de Leucemia Mielóide) e a liberação de ROS em células HL-60 diferenciadas com ácido retinóico(células pró-mielocíticas de leucemia humana). Estes efeitos pró-

inflamatórios foram relacionados à presença de endotoxinas no mel de Manuka, ou de moléculas desconhecidas com a mesma atividade.

Os estudos relatados sugerem que o mel é um produto promissor para o tratamento de feridas em diabéticos, devido talvez ao efeito na modulação da inflamação tecidual, à estimulação da proliferação celular e ao efeito sobre o estresse oxidativo presente no tecido. Faltam evidências, no entanto, para esclarecer os mecanismos de ação e o papel dos diversos componentes do mel nestas funções.

Alguns estudos já exploraram os efeitos do mel em feridas crônicas de membros inferiores de pessoas com Diabetes Mellitus, com resultados similares aos encontrados nas pesquisas utilizando animais. Kamaratoset al. (2014) analisaram o efeito do mel de Manuka impregnado em curativos na cicatrização das úlceras neuropáticas de pé diabético tipo Wagner I e II em 63 pessoas com a doença. Foi um estudo prospectivo, randomizado e cego,onde foram comparados o tratamento com mel de Manuka (n = 32) e o protocolo convencional (gaze embebida em solução salina, n = 31), posterior a desbridamento na primeira consulta. As intervenções e avaliações das lesões foram feitas por diferentes profissionais treinados, durante 16 semanas. Os resultados mostraram que as feridas tratadas com este tipo de mel tiveram rápida eliminação da carga bacteriana,evitando a internação do paciente e a utilização de antibióticos. Adicionalmente, o tempo médio de cicatrização do grupo tratado com mel foi 31±4 dias vs 43±3 dias no grupo com tratamento convencional ($p<0,05$). Devido à dificuldade ética de avaliação do tecido em humanos, este estudo, entre outros, não oferece informação sobre o efeito local do mel no processo de cicatrização.

Moghazyet al. (2010) fizeram estudo observacional prospectivo em 30 pacientes diabéticos (93,3 % tipo II) com feridas de pé (70% neuropáticas e 80% vasculares), tratados em Ismailia (Egito) durante 3 meses; o mel utilizado foi providenciado pela Universidade de *Alexandria*, mas no artigo não foram descritos detalhes da origem botânica. Cada paciente foi seu próprio controle, uma vez que o histórico de cicatrização era de pelo menos 3 meses de evolução antes do estudo. Todos os pacientes tiveram análise de cultura microbiana e foram submetidos

adesbridamento e limpeza previamente às aplicações do mel; posteriormente, o acompanhamento foi semanal e a avaliação completa mensal. Os resultados evidenciaram o fechamento total da lesão em 93.3% dos pacientes, sendo que só 6,6% se tornaram candidatos para uma amputação depois do tratamento. No segundo mês de tratamento nenhum paciente tinha sinais de inflamação diferentes à primeira avaliação, na qual todos apresentaram sinais. Finalmente, com respeito aos microrganismos colonizadores das feridas, na primeira avaliação 40% tiveram *S. Aureus*, 20% *S. Epidermidis*, 16,7% *E. Coli*, 10% *Proteus*, 6,7% *Klebsiella* e 3,3% *P. Auregenosa*; já após o tratamento só se manteve a contaminação por *S. Epidermidis* (93,3%) e por *P. aerugenosa* (6,7%), demonstrando uma eficácia específica na contaminação bacteriana das feridas. Com respeito a custo-efetividade, apesar do artigo não mostrar nenhuma metodologia de quantificação de custo real, os autores destacam o fato do mel ter baixo custo no Egito e estar disponível em todos os lugares, além da técnica simples de aplicação que pode ser usada pelo próprio paciente ou seus familiares, diminuindo o custo de translados ao serviço de saúde e o tempo de cuidados de um profissional da saúde. A diminuição no uso de antibióticos também foi considerada como um fator a favor da efetividade de custo.

Apesar de todas estas evidências, é necessário ainda um maior esclarecimento sobre os mecanismos envolvidos nos efeitos do mel sobre a cicatrização de feridas em indivíduos diabéticos, explorando situações fisiológicas como o estresse oxidativo, a alteração na migração de populações celulares como os fibroblastos e as células do sistema imunológico e o processo inflamatório. A associação destes efeitos com diferentes componentes químicos do mel, reconhecendo o potencial que cada tipo de mel segundo sua origem botânica, seria muito interessante para o tratamento. Adicionalmente, a utilização de compostos que sirvam como controles, como por exemplo o mel artificial, auxilia na identificação de possíveis efeitos de diferentes compostos presentes no mel, como é o caso dos ácidos fenólicos, flavonóides, vitaminas, enzimas, etc. Os resultados aqui expressos mostraram que o efeito do mel artificial, sem os componentes supracitados, sobre os animais diabéticos foi diferente, não promovendo a aceleração da cicatrização. Resultados de Kossiet al.(1999) mostraram efeito similar, apesar das diferenças metodológicas. Naquele estudo feridas em ratos foram irrigadas com solução contendo diferentes açúcares (D-glicose, D-Frutose, D-Galactose e D-Manose)

através de esponja circular; a glicose e frutose não promoveram a formação do tecido de granulação, a manose inibiu a formação deste tecido e a galactose gerou o melhor resultado (porém sem significância estatística). Concluiu-se que a utilização dos açúcares mencionados não foi benéfica para a cicatrização, provavelmente pela consistência e concentração.

O efeito osmótico mostrou-se favorável em outros estudos com utilização de açúcares no tratamento de feridas, para o controle microbiano e controle do edema e exsudato (KILIC, 2001; LISLE, 2002; VELANDER et al., 2008), variáveis que não foram avaliadas neste estudo.

Considerando os efeitos do tratamento com mel em animais normoglicêmicos, o presente estudo não mostrou diferença no tempo total de reepitelização entre os animais tratados e não tratados, porém, foi evidenciada mudança nas áreas das feridas dos dias 3º a 9º, sugerindo modulação da fase inflamatória, com possível efeito anti-inflamatório em animais tratados com mel de Eucalipto e pró-inflamatório em aqueles tratados com mel de Manuka.

Nakajima et al. (2012) obtiveram resultados similares ao pesquisar o efeito de três tipos de mel japonês(*Acacia*, *Buckwheat* e *ChinesemilkVetch*), em comparação com curativo hidrocolóide (carboximetilcelulose),na cicatrização de feridas em 72 camundongosBalb/cCrSlc machos sadios, com idade de 8 semanas. Os autores relatam que o hidrocolóide teve um efeito pró-inflamatório na primeira fase da cicatrização ($p<0,001$), sendo que as áreas das lesões diminuíram na fase proliferativa até obter um fechamento completo 14º dia. O tratamento com mel diminuiu a área da lesão na fase inflamatória (sugerindo menor edema), mas no 14º dia alguns animais permaneceram com regiões da ferida sem novo epitélio. O atraso na cicatrização dos grupos tratados com mel foi explicado devido ao baixo número de macrófagos presentes na ferida na primeira fase da cicatrização, que produzem fatores pró-cicatrizantes importantes para as fases restantes. Os autores observaram também aumento no número de vasos sanguíneos no 7º, 11º e 14º dias ($p<0,0001$) nos grupos tratados com mel, mas não foram evidenciadas diferenças claras no efeito entre os três diferentes tipos de mel. Os autores concluíram que o

uso do mel japonês tem benefícios limitados; é anti-inflamatório e inibe a reepitelização, mas promove a vascularização.

Ghaderiet al. (2004) fizeram estudo experimental com 12 animais NMRI (*Naval Medical ResearchInstitute*) com feridas de espessura total, onde aleatoriamente 6 receberam mel de Urmia (do Irã -oriente médio) e 6 receberam placebo (gaze estéril). Os autores observaram que os animais tratados com mel não tiveram infecção ou exsudação, diferentemente dos animais controles que tiveram exsudação por meio da crostra na superfície. Cerca de 98% das células do sistema imunológico encontradas nos tecidos do grupo controle foram polimorfonucleares, enquanto que no grupo tratado foram linfócitos, concluindo que os animais tratados com mel tiveram menor inflamação aguda.

O mesmo grupo de pesquisa, em anos posteriores (GHADERI et. al., 2010), comparou o efeito do uso de mel natural (sem definição da origem botânica) vs. óleo de origem animal (ovelha) e vs. controle (gaze estéril), em estudo com 36 camundongos NMRI machos nos quais foram confeccionadas feridas de espessura total. Três profissionais diferentes fizeram análise histopatológica do tecido correspondente aos dias 4º, 7º e 10º, de maneira cega. Os resultados mostraram que no grupo tratado com mel, no 4º dia houve maior diminuição da inflamação e do edema, no 7º dia houve maior formação de tecido de granulação, maior densidade de fibroblastos, maior queratinização na superfície da lesão e maior espessura das fibras de colágeno e no 10º dia houve ausência de inflamação e maior espessura da membrana basal da epiderme. O tempo total de cicatrização para o grupo tratado com mel foi 10 dias, para o óleo 13 dias e para o controle 14 dias. No que tange ao efeito anti-inflamatório, os resultados foram similares aos nossos para o tratamento com mel de Eucalipto. A falta de informação sobre a origem botânica e as características do mel utilizado, no entanto, impede uma análise mais detalhada das semelhanças e diferenças entre este estudo e o nosso.

Explorando estudos envolvendo outros modelos de ferida, KOO et al. (2010) avaliaram os efeitos do tratamento tópico diário com mel de *Tualang* (Malasia) na cicatrização de feridas por queimadura em ratas normoglicêmicas, em comparação à hidrofibra e hidrofibra contendo prata. Os resultados mostraram que o mel foi o

tratamento mais efetivo na contração da ferida no 6° e 15°.dias. Por outro lado, Jalaliet al. (2007) realizaram estudo semelhante em cães sem raça definida utilizando mel monofloral de *Urma* produzido em Azarbaijan (país do Oriente Médio), sulfadiazina de prata e cloreto de sódio (controle), relatando aceleração da cicatrização, reepitelização mais rápida e melhor organização do colágeno dérmico para o tratamento com mel.

Considerando-se os estudos relatados, conclui-se que existem resultados positivos para o tratamento de feridas com diferentes méis em comparação com produtos usados no tratamento convencional, com poucas exceções. Estes benefícios foram observados em feridas de etiologia variada, em indivíduos normoglicêmicos e hiperglicêmicos. Nosso estudo apresenta resultados benéficos para dois tipos de mel, em especial o mel de Eucalipto, com elevada atividade antioxidante.

6 CONCLUSÃO

Com base na análise físico-química dos méis, conclui-se que o mel de Manuka e de Eucalipto têm atividade antioxidante elevada. Esta atividade não pode ser atribuída apenas à concentração de ácidos fenólicos e flavonóides, uma vez que os níveis foram maiores no mel de Manuka, enquanto a atividade antioxidante foi superior no mel de Eucalipto.

Com base nos ensaios de atividade biológica conclui-se que o mel de Manuka e de Eucalipto têm propriedades cicatrizantes, destacando-se sua influência positiva em feridas de animais diabéticos. Possivelmente este efeito está relacionado à potencial modulação da reação inflamatória na ferida, durante o processo cicatricial.

REFERÊNCIAS*

ADIMASU ABESHU, M. Medicinal Uses of Honey. **Biology and Medicine**, v. 8, n. 2, 2015.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION.Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.**Diabetes Care**, v. 33, n. Suppl 1, p. S62–S69, jan. 2010.

AKTUNC, E. et al. N-Acetyl Cysteine Promotes Angiogenesis and Clearance of Free Oxygen Radicals, Thus Improving Wound Healing in an Alloxan-Induced Diabetic Mouse Model of Incisional Wound. **Clinicaland Experimental Dermatology**, v. 35, n. 8, p. 902–909, dez. 2010.

ALMEIDA, A. M. M. de. et al. Antioxidant Capacity, Physicochemical and Floral Characterization of Honeys from the Northeast of Brazil. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, 2016.

ALMEIDA, M. E. S. de. **Hiperglicemia e interação fibroblasto-matriz extracelular - influências na adesão e migração em substratos bidimensional e tridimensional.** 2011. Dissertação(Mestrado em Bilogia Celular e Tecidual)-Instituto de Ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B. de; BERA, A. **Manual de controle de qualidade do mel**. São Paulo: APACAME, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL COUNCIL–AOAC. **Official methods of analysis**. 20thed. 2016.

BAZONI, M. de O. **Atividade antimicrobiana dos meis produzidos por apismellifera e abelhas sem ferrão nativas do brasil**. 2012. Tese (Doutorado em genética) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

BERTONCELJ, J. et al. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 822–828, 2007.

BOLANOS DE LA TORRE, A. A. S. et al. A universally calibrated microplate ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay for foods and applications to Manuka honey. **Food Chemistry**, v. 174, p. 119–123, 1 maio 2015.

BROWNLEE, M. Biochemistry and Molecular Cell Biology of Diabetic Complications.**Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813–820, 13 dez. 2001.

CHAN, C. W.; et al. Analysis of the Flavonoid Component of Bioactive New Zealand Mānuka (Leptospermum Scoparium) Honey and the Isolation, Characterization and Synthesis of an Unusual Pyrrole.**Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1772–1781, 1 dez. 2013.

---

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHOI, D. S. et al. Hydrogel Incorporated with Chestnut Honey Accelerates Wound Healing and Promotes Early HO-1 Protein Expression in Diabetic (Db/db) Mice.**Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 9, n. 1, p. 36–42, 16 fev. 2012.

DA SILVA, P. M.; GAUCHE, C.; GONZAGA, L. V.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. **Food Chemistry**, v. 196, p. 309–323, 1 abr. 2016.

DEMİR, A. et al. The effect of topical honey dressing on wound healing in diabetic mice.**Gazi Medical Journal**, v. 18, p. 110–113, 2007.

EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; SILVA, E. M. S. da; BESERRA, E. M. F.; RODRIGUES, M. L. Physical-Chemical analysis of honey bee *Apis mellifera* and *Meliponas cutellaris* on two regions at Paraiba State, Brazil. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1166–1171, out. 2005.

FLORIM, J. da C. **Emprego de nanopartículas lipídicas sólidas contendo extrato de semente de uvas para aceleração da cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos.**Dissertação(Mestrado em Bilogia Celular e Tecidual)-Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

G VALLIANOU, N. Honey and its Anti-Inflammatory, Anti-Bacterial and Anti-Oxidant Properties.**General Medicine: Open Access**, v. 2, n. 2, 2014.

GETHIN, G. T.; COWMAN, S.; CONROY, R. M. The Impact of Manuka Honey Dressings on the Surface pH of Chronic Wounds. **International Wound Journal**, v. 5, n. 2, p. 185–194, jun. 2008.

GHADERI, R.; AFSHAR, M.; AKHBARIE, H.; GOLALIPOUR, M. J. Comparison of the Efficacy of Honey and Animal Oil in Accelerating Healing of Full Thickness Wound of mice skin. **International Journal of Morphology**, v. 28, n. 1, p. 193–198, mar. 2010.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative Stress and Diabetic Complications.**Circulation Research**, v. 107, n. 9, p. 1058–1070, 29 out. 2010.

GOIS, G. C. et al. Composição do mel de Apis mellifera: Requisitos de qualidade. **ActaVeterinariaBrasilica**, v. 7, n. 2, p. 137–147, 23 ago. 2013.

GOLDNER, M. G. Alloxan Diabetes–Its Production and Mechanism. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 21, n. 1, p. 44–55, jan. 1945.

GORJANOVIĆ, S. Ž. et al. Comparative analysis of antioxidant activity of honey of different floral sources using recently developed polarographic and various spectrophotometric assays. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 30, n. 1, p. 13–18, maio 2013.

GURTNER, G. C.; WERNER, S.; BARRANDON, Y.; LONGAKER, M. T. Wound Repair and Regeneration. **Nature**, v. 453, n. 7193, p. 314–321, 15 maio 2008.

HABIB, H. M. et al. Physicochemical and biochemical properties of honeys from arid regions. **Food Chemistry**, v. 153, p. 35–43, 15 jun. 2014.

MOLAN, P. **Home Page: a directory to the information on honey on this website**. Disponível em: <http://www.academia.edu/4845796/Home_Page_a_directory_to_the_information_on_honey_on_this_website>. Acessoem: 2 out. 2016.

HORWITZ, R.; WEBB, D. Cell Migration.**Current Biology**, v. 13, n. 19, p. R756–R759, 30 set. 2003.

IBM SPSS. Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp., 2013. 1 CD-ROM

IDF diabetes atlas - Home. Disponível em: <http://www.diabetesatlas.org/>. Acessoem: 2 out. 2016.

INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE DIABETIC FOOT. **Development of the Guidance documents.** 2015a.Disponível em: <http://iwgdf.org/guidelines/development-of-the-iwgdf-guidance-documents-2015/>. Acesso em: 20 set. 2016.

_____. Guidance on wound healing. 2015b**.** Disponível em: <http://iwgdf.org/guidelines/guidance-on-wound-healing-2015-2/>. Acessoem: 2 out. 2016.

JAKSA, P. J.; MAHONEY, J. L. Quality of Life in Patients with Diabetic Foot Ulcers: Validation of the Cardiff Wound Impact Schedule in a Canadian Population. **International Wound Journal**, v. 7, n. 6, p. 502–507, dez. 2010.

JALALI, F. S. S. et al. Experimental Evaluation of Repair Process of Burn-Wounds Treated with Natural Honey. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, 2007.

JULL, A. B.; RODGERS, A.; WALKER, N. Honey as a Topical Treatment for Wounds.**The Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, p. CD005083, 2008.

KAMARATOS, A. V. et al. Manuka Honey-Impregnated Dressings in the Treatment of Neuropathic Diabetic Foot Ulcers. **International Wound Journal**, v. 11, n. 3, p. 259–263, jun. 2014.

KHALIL, M. I.; SULAIMAN, S. A.; GAN, S. H. High 5-Hydroxymethylfurfural Concentrations Are Found in Malaysian Honey Samples Stored for More than One Year. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 48, n. 8–9, p. 2388–2392, set. 2010.

KHOO, Y.-T.et al. Wound Contraction Effects and Antibacterial Properties of Tualang Honey on Full-Thickness Burn Wounds in Rats in Comparison to Hydrofibre. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 10, p. 48, 2010.

KIRS, E.; PALL, R.; MARTVERK, K.; LAOS, K. Physicochemical and melissopalynological characterization of Estonian summer honeys.**Procedia Food Science**, 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11). v. 1, p. 616–624, 1 jan. 2011.

KÖSSI, J. et al. Effects of Hexose Sugars: Glucose, Fructose, Galactose and Mannose on Wound Healing in the Rat. **European Surgical Research**, v. 31, n. 1, p. 74–82, 1999.

LAMERS, M. L. et al. High Glucose-Mediated Oxidative Stress Impairs Cell Migration. **PloS One**, v. 6, n. 8, p. e22865, 2011.

LERMAN, O. Z. et al. Cellular Dysfunction in the Diabetic Fibroblast: Impairment in Migration, Vascular Endothelial Growth Factor Production, and Response to Hypoxia. **The American Journal of Pathology**, v. 162, n. 1, p. 303–312, jan. 2003.

LI, D. et al. MicroRNA-31 Promotes Skin Wound Healing by Enhancing Keratinocyte Proliferation and Migration. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 6, p. 1676–1685, jun. 2015.

LUCAS-ABELLÁN, C. et al. Comparative study of different methods to measure antioxidant activity of resveratrol in the presence of cyclodextrins.**Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 6, p. 1255–1260, jun. 2011.

MARCHINI, L. C.; MORETI, A. C. de C. C.; OTSUK, I. P. Cluster analysis, with basis in physico-chemical composition, of samples of honey produced by Apis mellifera L. in São Paulo State. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 25, n. 1, p. 8–17, mar. 2005.

MARTIN, A.; KOMADA, M. R.; SANE, D. C. Abnormal Angiogenesis in Diabetes Mellitus.**Medicinal Research Reviews**, v. 23, n. 2, p. 117–145, mar. 2003.

MOGHAZY, A. M. et al. The Clinical and Cost Effectiveness of Bee Honey Dressing in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers.**Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 89, n. 3, p. 276–281, set. 2010.

MOLAN, P. **The nature and composition of honey**.In:MOLAN, P. **Home Page: a directory to the information on honey on this website**.2016. Disponível em: <http://www.academia.edu/4845796/Home_Page_a_directory_to_the_information_on_honey_on_this_website>. Acessoem: 2 out. 2016.

_____. The Antibacterial Activity of Honey: 1. The Nature of the Antibacterial Activity. **Bee World**, v. 73, n. 1, p. 5–28, 2006a.

_____. The Evidence Supporting the Use of Honey as a Wound Dressing.**The International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 5, n. 1, p. 40–54, mar. 2006b.

_____.Debridement of Wounds with Honey. **Journal of Wound Technology**, v. 5, p. 12–17, 2009.

MOLAN, P. C.; BETTS, J. A. Clinical Usage of Honey as a Wound Dressing: An Update. **Journal of Wound Care**, v. 13, n. 9, p. 353–356, out. 2004.

MOLAN, P. C.; RUSSELL, K. M. Non-Peroxide Antibacterial Activity in Some new Zealand Honeys.**Journal of Apicultural Research**, v. 27, n. 1, p. 62–67, 1 jan. 1988.

MONIRUZZAMAN, M.; SULAIMAN, S. A.; KHALIL, M. I.; GAN, S. H. Evaluation of Physicochemical and Antioxidant Properties of Sourwood and Other Malaysian Honeys: A Comparison with Manuka Honey. **Chemistry Central Journal**, v. 7, p. 138, 2013.

MOURA, S. **Qualidade do mel de abelhas apis mellífera em função do ambiente de armazenamento**. 2006. Dissertação (Mestrado em Produção de Animais de Interesse Econômico) - Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2006.

NAKAJIMA, Y. et al. Effects of Three Types of Japanese Honey on Full-Thickness Wound in Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. e504537, 20 jan. 2013.

NASCIMENTO, K. S. d. **Compostos fenólicos, capacidade antioxidante e propriedades físico-químicas de méis de apis mellífera do estado do rio grande do sul**. 2016. Dissertação (Mestrado) Univesidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

NETER, J. **Applied linear statistical models**.4. ed. Irwin: Business and Economics, 1996, 1408 p.

PESSOA, A. F. M. **A administração sistêmica e tópica de vitaminas antioxidantes acelera a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos.** 2014. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

PEREIRA, M. **Perfil cromatográfico das substâncias fenólicas presentes em extratos de mel de assa peixe e avaliação de seu poder antioxidante**. 2010. 77f. Monografia de conclusão de curso(graduação em química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2010.

PÉREZ-MATUTE, P.; ZULET, M. A.; MARTÍNEZ, J. A. Reactive Species and Diabetes: Counteracting Oxidative Stress to Improve Health. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, n. 6, p. 771–779, dez. 2009.

PIRES, R. M. C. **Qualidade do mel de abelhas apis mellifera linnaeus, produzida no piauí**. 2011.94f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

PRIOR, R. L. et al. Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples.**Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 3273–3279, 1 maio 2003.

RICHTER, W. et al. Avaliação da qualidade físico-química do mel produzido na cidade de pelotas/rs.**Alimentos e Nutrição**, **Araraquara**, v. 22, n. 4, p. 547-553, out. 2011.

RIDLEY, A. J. et al. Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. **Science,** v. 302, n. 5651, p. 1704–1709, 5 dez. 2003.

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, Araraquara**, v. 17, n. 1, p. 113–120, 20 out. 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **DIRETRIZES-SBD-2015-2016.** Disponível em: <http://www.diabetes.org.br/sbdonline/images/docs/DIRETRIZES-SBD-2015-2016.pdf>. Acesso em: 20 set. 2016.

SONG, J. J.; SALCIDO, R. Use of Honey in Wound Care: An Update. **Advances in Skin & Wound Care**, v. 24, n. 1, p. 40–44, jan. 2011.

SOUSA, J. M. B. de. et al. Sugar profile, physicochemical and sensory aspects of monofloral honeys produced by different stingless bee species in Brazilian semi-arid region. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 645–651, jan. 2016.

STEWART, J. A.; MCGRANE, O. L.; WEDMORE, I. S. Wound Care in the Wilderness: Is There Evidence for Honey? **Wilderness & Environmental Medicine**, v. 25, n. 1, p. 103–110, 1 mar. 2014.

TIMM, M.; BARTELT, S.; HANSEN, E. W. Immunomodulatory Effects of Honey Cannot Be Distinguished from Endotoxin. **Cytokine**, v. 42, n. 1, p. 113–120, abr. 2008.

VIDAL, R. F. E. **Mel: características, análises físico-químicas, adulterações e transformações**. [s.l.] Barretos: Instituto Tecnológico Científico Roberto Rios, 1984.

VISAVADIA, B. G.; HONEYSETT, J.; DANFORD M. H.; Manuka honeydressing: Aneffectivetreatment for chronicwoundinfections. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.46, p. 55-56, 2008.

YASSIN, N. A. Honey as therapeutic agent for infectious diseases. **Diagnostic And Therapeutic Study**, v. 2, n. 3, p. 43–50, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION**. Diabetes programme**. Disponível em: <http://www.who.int/diabetes/en/>. Acessoem: 2 out. 2016.