

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

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 cm² (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 ($109,6 \pm 2,3$ vs. $171,6 \pm 5,9$ vs. $22,7 \pm 0,9$ mg.100g⁻¹ para o mel artificial) e maior capacidade antioxidante ($36,5 \pm 2,1$ vs. $22,6 \pm 1,6$ 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 Mellifera* honey in the healing of cutaneous wounds in diabetic mice.** 2016. 94 f. Dissertation (Master thesis in Cell and Tissue Biology) - 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 cm² (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.

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 (5^a principal causa de morte), devido às suas variadas complicações, destacando-se as cardiovasculares e 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 (incluindo 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% (SING et 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-se alterada em todas as fases: a fase inflamatória inicia-se lentamente, com menor presença de neutrófilos e macrófagos (KOMESU et 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 conseqüentemente 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 (glutathione, 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 ROS e 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 na qualidade 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, além da dor nos casos de infecção (JAKSA, 2010).

O tratamento das feridas em pacientes diabéticos é complexo, uma vez que abrange a resolução integral dos diferentes aspectos que convergem para o aparecimento das lesões (BOULTON et 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 a ferida 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 DM e representando uma carga que os sistemas de saúde dos países em desenvolvimento não podem financiar completamente (BOULTON et al., 2005).

O guia internacional sobre o uso de intervenções para melhorar a 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 adequada recomenda-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 de MMPs, 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 com baixos recursos socioeconômicos. Um exemplo é o uso do açúcar, documentado desde a antiguidade, no tratamento de feridas de diversas etiologias, devido ao seu 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 contradizem uma crença geral sobre a potencial ação hiperglicêmica do açúcar tópico na lesão, que poderia dificultar a cicatrização e agravar a doença (VELANDER et 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 desbridamento do tecido necrótico (HERSZAGE et al., 1980; VIAU et al., 1986; KILIC, 2001; LISLE, 2002); nenhum destes estudos 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, expandindo uma 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 *Leptospermum scoparium* (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 Manuka traz 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 microbidas superiores (BAZONI, 2012). Não foi possível, naquele estudo, no entanto, determinar se o mel multifloral teria propriedades diferentes dos monoflorais analisando a atividade antimicrobiana exclusivamente. O mel multifloral está disponível em regiões tropicais de grande diversidade floral como o Brasil e tem, portanto, um importante potencial fitoterapêutico. Ainda é 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 *Codex Alimentarius 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, tem trissacarídeos (erlose) e oligoelementos fitoquímicos que enriquecem sua composição, como flavonóides e traços de proteínas e minerais, sendo responsáveis por propriedades bioquímicas adicionais (MOLAN, 2012). Mphande et 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 cm²/semana) em comparação ao açúcar (2,2 cm²/semana). Finalmente, a presença de dor na troca do curativo estava ausente em 86% dos pacientes tratados com mel durante 3 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 hiperosmolaridade conferida pela elevada concentração de açúcares (80%), que desidrata os microrganismos; 2) o pH ácido (3,2-4,5), com ação bacteriostática, devido ao ácido glucônico presente em baixas concentrações; este ácido é formado pela ação da 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) baixa 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, com efeito antimicrobiano residual; a enzima lisozima e os flavonóides presentes no mel têm sido considerados responsáveis por este efeito 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 o tratamento (MERCCKOLL, et al., 2009; MADDOCKSet al., 2012).

- *Capacidade desodorizante*: o odor das feridas é conferido pelo 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 e linfa), com a conseqüente 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 debridamento autolítico 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 antioxidantes que diminuam os danos celulares 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 higroscopicidade do 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 citocinas pelos macrófagos, tornando a resposta inflamatória mais eficiente contra a colonização dos microrganismos, além de aumentar a quantidade de fatores de crescimento que promovem vasculogênese e proliferação celular (TONKS et al., 2001).

-Estímulo da proliferação e granulação: a higroscopicidade e hiperosmolaridade provoca 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 moléculas provenientes 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). Jull et 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 como a avaliação de possíveis complicações, para recomendá-lo no tratamento de outras feridas.

Em estudos clínicos e experimentais para o uso do mel em feridas utilizando animais diabéticos como modelo experimental, os benefícios clínicos já descritos têm sido comprovados. Diversas propriedades do mel, especialmente a ação antioxidante, melhoram o processo cicatricial, diminuindo o tempo de cicatrização e resolvendo colonizações crônicas; efeitos sistêmicos do açúcar contido no mel não têm sido relatados em humanos ou em animais (EDDY; GIDEONSEN, 2005; DAMIR et al, 2007; MAKHDOOM et al, 2009).

A tendência futura da pesquisa em apiterapia concentra-se em associar a atividade biológica já atestada com a origem botânica do mel, podendo ser monofloral, 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 produtos medicinais de maior acesso para as pessoas com diabetes mellitus.

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. **Clinical and 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 Biologia 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**. 20th ed. 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 Paraíba 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 Biologia 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. **Acta Veterinaria Brasilica**, 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>. Acesso em: 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/>>. Acesso em: 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/>>. Acesso em: 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>. Acesso em: 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 mellifera 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 mellifera 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/>>. Acesso em: 2 out. 2016.