



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO  
TECNOLÓGICA  
INSTITUTO DE BIODIVERSIDADE E FLORESTAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

**ANA CLAUDIA SOUZA ABREU**

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS ATRAVÉS DE MÉIS DE  
ABELHA SEM FERRÃO (*Melipona compressipes manaosensis*) NO REPARO  
TECIDUAL DE FERIDAS CUTÂNEAS INFECTADAS EM RATOS WISTAR (*Rattus  
novergicus albinus*)**

**SANTARÉM - PA  
2024**

**ANA CLAUDIA SOUZA ABREU**

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS ATRAVÉS DE MÉIS DE  
ABELHA SEM FERRÃO (*Melipona compressipes manaosensis*) NO REPARO  
TECIDUAL DE FERIDAS CUTÂNEAS INFECTADAS EM RATOS WISTAR (*Rattus  
novergicus albinus*)**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Biociências da Universidade Federal do Oeste do Pará como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biociências.

**Orientador:** Prof. Dr. Paulo Sérgio Taube Junior

**Coorientadores:** Profa. Dra. Márcia Mourão Ramos Azevedo, Prof. Dr. Tiago Santos Silveira

**Área de concentração:** Fisiologia Ambiental.

**SANTARÉM - PA  
2024**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA**

---

A162n Abreu, Ana Claudia Souza

Nanopartículas de prata sintetizadas através de méis de abelha sem ferrão (*Melipona compressipes manaosensis*) no reparo tecidual de feridas cutâneas infectadas em ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*). / Ana Claudia Souza Abreu. - Santarém, 2024. 129 p. : il.  
Inclui bibliografias.

Orientador: Paulo Sérgio Taube Junior.

Coorientadores: Márcia Mourão Ramos Azevedo, Tiago Santos Silveira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Instituto de Biodiversidade e Florestas, Programa de Pós-Graduação em Biociências.

1. Síntese verde. 2. Cicatrização de feridas. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Toxicidade. I. Taube Junior, Paulo Sérgio, *orient.* II. Azevedo, Márcia Mourão Ramos, *coorient.* III. Silveira, Tiago Santos, *coorient.* IV. Título.

CDD: 23 ed. 615.19

---

Bibliotecária - Documentalista: Cátia Alvarez – CRB/2 843

**ANA CLAUDIA SOUZA ABREU**

**NANOPARTÍCULAS DE PRATA SINTETIZADAS ATRAVÉS DE MÉIS DE ABELHA SEM FERRÃO (*Melipona compressipes manaosensis*) NO REPARO TECIDUAL DE FERIDAS CUTÂNEAS INFECTADAS EM RATOS WISTAR (*Rattus norvegicus albinus*)**


Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Biociências da Universidade Federal do Oeste do Pará como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biociências.

Área de concentração: Fisiologia Ambiental.


Conceito: Aprovada

Data de aprovação: 17/07/2024


Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente  
 **PAULO SERGIO TAUBE JUNIOR**  
Data: 17/07/2024 19:01:00-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Prof. Dr. Paulo Sérgio Taube Junior – Presidente (Orientador)  
Universidade Federal do Oeste do Pará

Documento assinado digitalmente  
 **GRACIENE DO SOCORRO TAVEIRA FERNANDES**  
Data: 17/07/2024 19:46:48-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


Profa. Dra. Graciene do Socorro Taveira Fernandes  
Universidade Federal do Oeste do Pará

Documento assinado digitalmente  
 **HUGO NAPOLEAO PEREIRA DA SILVA**  
Data: 17/07/2024 22:04:52-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Hugo Napoleão Pereira da Silva  
Universidade Federal do Oeste do Pará, examinador externo ao Programa

Documento assinado digitalmente  
 **ARTHUR ABINADER VASCONCELOS**  
Data: 17/07/2024 19:20:49-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Arthur Abinader Vasconcelos  
Universidade Federal do Oeste do Pará, examinador externo ao Programa

Documento assinado digitalmente  
 **ALAN KELBIS OLIVEIRA LIMA**  
Data: 17/07/2024 19:09:15-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. Alan Kelbis Oliveira Lima  
Examinador externo - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

Dedico essa dissertação a minha família, pelo apoio incondicional e constante incentivo para concluir essa pesquisa

## AGRADECIMENTO

A Deus, por me permitir errar, aprender e crescer com o desenvolvimento desse estudo, pois a sua força não me permitiu desistir.

Agradeço ao meu orientador Paulo Sérgio Taube Júnior Professor da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA. Instituto de Biodiversidade e Florestas – IBEF, pelo profissionalismo, paciência e orientação que deste para eu realizar cada etapa desse estudo dentro do prazo estipulado, além disso, meus agradecimentos pela dedicação, pelos tantos elogios, competência, apoio e todo conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Tiago Santos Silveira, por ter sido meu coorientador, pela preocupação e apoio. Seus conhecimentos e direcionamentos foram fundamentais para a realização da coleta de dados no biotério. Além disso, agradeço também à minha coorientadora, profa. Dra. Márcia Mourão Azevedo, pela calma, pela sabedoria e pelos ensinamentos.

À Emanuele e Olívia, mais que responsáveis pelo biotério, foram verdadeiras anjas da guarda dos meus animais, obrigada por toda orientação prestadas sobre a experimentação animal no biotério da Universidade do Estado do Pará.

Agradeço grandemente o apoio dos meus voluntários dessa pesquisa Lorena, Alan, John Lennon, Dani, Zaira e Gabriel, que cada atividades desenvolvidas por eles foram essenciais para o sucesso dessa pesquisa.

Sou grata também ao Alan Kelbis Lima do Laboratório de Nanobiotecnologia - Universidade de Brasília/UnB, pelas revisões, questionamentos e discussões sempre tão produtivas sobre os resultados dessa pesquisa. Agradeço também ao José Júnior do laboratório de farmacologia da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), pela sua contribuição e disponibilidade em ajudar em uma determinada coleta de dado. Como também agradeço ao Hugo do laboratório de Laboratório Multiusuário de Análises Multifuncionais da UFOPA, suas orientações foram essenciais para o meu aprendizado em relação a confecção de lâminas histológicas.

Agradeço à biomédica Jandria Gabriela Vieira Gusmão, que foi minha colega da turma do mestrado e me ajudou desde o início da pesquisa com as análises em ambiente laboratorial, fico grata principalmente pela sua parceria, diálogos sempre frutíferos e incentivadores, pela educação e boa vontade em me ajudar, mesmo tendo a sua pesquisa também para realizar.

À UFOPA pelo programa de pós-graduação Biociências a nível mestrado, pela oportunidade e suporte e aos seus laboratórios também meus agradecimentos. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de estudo, que foi imprescindível para eu concluir esse mestrado. Além disso, agradeço ao Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pela disponibilidade de verba para comprar equipamentos e materiais para uso laboratorial, que foi essencial para a concretização dessa pesquisa.

Agradeço também a minha irmã Ana Paula e ao meu namorado Herbert pelo apoio durante a execução da pesquisa. Por fim, agradeço a minha família, principalmente ao meu pai Manoel Ernandes Abreu e minha mãe Elziana Souza, que foram a minha principal base, apesar de todas as dificuldades que tiveram para manter os meus estudos na cidade de Santarém-PA.

*No dia em que eu saí de casa  
Minha mãe me disse: Filho, vem cá  
Passou a mão em meus cabelos  
Olhou em meus olhos  
Começou falar*

*Por onde você for, eu sigo com meu pensamento  
Sempre onde estiver  
Em minhas orações, eu vou pedir a Deus  
Que ilumine os passos seus*

(Zezé Di Camargo e Luciano)

## RESUMO

A ferida cutânea quando infectada causa um atraso no processo cicatrização, tornando-se um problema de saúde pública. O mel de abelha sem ferrão (ASF) possui diversas finalidades terapêuticas curativas, principalmente como agente antimicrobiano e cicatrizante, assim como as nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido empregadas. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar o processo de reparo tecidual de feridas cutâneas infectadas com *Staphylococcus aureus* em ensaio *in vivo* por meio da aplicação de AgNPs sintetizada a partir de méis de ASF. Foram utilizadas 35 amostras de méis de ASF provenientes de produtores rurais do estado do Amazonas. Essas amostras passaram por análises físico-químicas, bioquímicas e avaliação de atividade antibacteriana utilizando o ensaio de difusão em poços e Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Das 35 amostras, foram selecionadas duas amostras denominadas JUP1 e JUP2 da espécie de abelha *Melipona compressipes manaosensis* que tiveram as melhores atividades antibacterianas para a realização de síntese de AgNPs. Essas AgNPs foram caracterizadas por meio de espalhamento de luz dinâmico (DLS), Potencial Zeta (PZ), espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Posteriormente, foi realizado o ensaio de toxicidade das AgNPs sintetizadas por meio do teste de toxicidade dérmica *in vivo*. Além disso, foi feito o teste de toxicidade de irritação ocular *in vitro*. Após a realização dos testes de biossegurança, foi dado início ao ensaio de cicatrização *in vivo* com 60 ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus* que tiveram feridas cutâneas infectadas com *Staphylococcus aureus* que foram avaliadas por 7 e 14 dias e após isso foram feitas as análises macroscópicas e microscópicas das feridas de acordo com a data de eutanásia dos animais. Os resultados da análise físico-química e bioquímica dos méis apresentaram variações entre as amostras uma vez que a origem botânica, condições de armazenamento, localidade geográfica e outros, influenciam na qualidade dos méis. A síntese de AgNPs das amostras JUP1 e JUP2 foram constatadas por meio da mudança de coloração nas suspensões coloidais nas concentrações de 3 e 5 mM em 80 °C e confirmada a partir das bandas de absorção nos espectros de UV/Vis que foram de 400 e 800 nm, além disso, foram observadas similaridades entre os diâmetros, cargas superficiais e formas geométricas das AgNPs. Enquanto no espectro de FTIR dos grupamentos químicos, sugere-se a presença de compostos fenólicos presentes nos méis e que foram capazes de reduzir e estabilizar os íons Ag<sup>+</sup>. O teste de toxicidade dérmica aguda não apresentou nenhum sinal de eritema/escaras ou de edema nos animais tratados com as AgNPs JUP1 e JUP2 durante os 14 dias de observação, assim como no

teste de toxicidade ocular *in vitro* não foram constatados sinais de irritação. Na análise microbiológica *in vivo* houve uma variabilidade na contagem da *S. aureus* entre os grupos. As feridas tratadas com as AgNPs JUP1 e JUP2 não apresentaram evolução do perímetro quando comparadas com àquelas do grupo controle negativo (NaCl 0,9%) e do mel da amostra JUP1, entretanto tiveram as maiores contrações da ferida em relação ao grupo controle positivo (sulfato de neomicina) e o mel da amostra JUP2 no 3<sup>a</sup> e 7<sup>o</sup> dia. Na análise de fibroblastos, densidade vascular e fibras colágenas, as amostras de AgNPs, em maioria, apresentaram resultados similares aos descritos para o grupo controle negativo, porém na visualização do alinhamento das fibras colágenas houve um maior paralelismo das fibras dos colágenos dos grupos tratados com soluções de AgNPs, com os méis e controle positivo. Desse modo, esse estudo colabora para a reparação tecidual de feridas infectadas com o uso terapêutico das AgNPs, apesar de a cicatrização ser um mecanismo complexo.

**Palavras-chaves:** Síntese verde. Cicatrização de feridas. Atividade antimicrobiana. Toxicidade.

## ABSTRACT

When infected, skin wounds delay the healing process, becoming a public health problem. Stingless bee honey (SWB) has several therapeutic and curative purposes, mainly as an antimicrobial and healing agent, and silver nanoparticles (AgNPs) have been used. The objective of this research was to evaluate the tissue repair process of skin wounds infected with *Staphylococcus aureus* in an *in vivo* assay through the application of AgNPs synthesized from SWB honeys. Thirty-five samples of SWB honeys from rural producers in the state of Amazonas were used. These samples underwent physicochemical and biochemical analyses and evaluation of antibacterial activity using the well diffusion assay and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) against strains of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. Of the 35 samples, two samples named JUP1 and JUP2 from the bee species *Melipona compressipes manaosensis* that had the best antibacterial activities were selected for the synthesis of AgNPs. These AgNPs were characterized by dynamic light scattering (DLS), Zeta Potential (ZP), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Transmission Electron Microscopy (TEM). Subsequently, the toxicity test of the synthesized AgNPs was performed by means of the *in vivo* dermal toxicity test. In addition, the *in vitro* ocular irritation toxicity test was performed. After performing the biosafety tests, the *in vivo* healing test was started with 60 rats of the species *Rattus norvegicus albinus* that had skin wounds infected with *Staphylococcus aureus* that were evaluated for 7 and 14 days. After that, macroscopic and microscopic analyses of the wounds were performed according to the date of euthanasia of the animals. The results of the physicochemical and biochemical analysis of the honeys showed variations among the samples since the botanical origin, storage conditions, geographic location and others influence the quality of the honeys. The synthesis of AgNPs of the samples JUP1 and JUP2 was verified by the color change in the colloidal suspensions at concentrations of 3 and 5 mM at 80 °C and confirmed from the absorption bands in the UV/Vis spectra that were 400 and 800 nm. In addition, similarities were observed between the diameters, surface charges and geometric shapes of the AgNPs. While in the FTIR spectrum of the chemical groups, the presence of phenolic compounds present in the honeys and that were capable of reducing and stabilizing the Ag<sup>+</sup> ions is suggested. The acute dermal toxicity test did not show any signs of erythema/scabs or edema in the animals treated with AgNPs JUP1 and JUP2 during the 14 days of observation, and no signs of irritation were observed in the *in vitro* ocular toxicity test. In the *in vivo* microbiological analysis, there was variability in the *S. aureus* count between the groups.

The wounds treated with AgNPs JUP1 and JUP2 did not show any evolution in perimeter when compared to those of the negative control group (NaCl 0.9%) and honey from sample JUP1, however, they had the greatest wound contractions in relation to the positive control group (neomycin sulfate) and honey from sample JUP2 on the 3rd and 7th day. In the analysis of fibroblasts, vascular density and collagen fibers, the majority of AgNP samples presented results similar to those described for the negative control group, but when visualizing the alignment of collagen fibers, there was greater parallelism of the collagen fibers of the groups treated with AgNP solutions, honey and positive control. Thus, this study contributes to the tissue repair of infected wounds with the therapeutic use of AgNPs, although healing is a complex mechanism.

**Keywords:** Green synthesis. Wound healing. Antimicrobial activity. Toxicity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> - Amostras dos méis de abelha sem ferrão .....  | 41 |
| <b>Figura 2</b> - Placa de microdiluição contendo o inóculo e mel .....   | 48 |
| <b>Figura 3</b> - Tosquia da área dorsal do animal .....  | 51 |
| <b>Figura 4</b> - Colocação da AgNPs JUP1 na pele da área tricotomizada da região dorsal do animal .....  | 52 |
| <b>Figura 5</b> - Acomodação das ratas em gaiolas individuais .....   | 52 |
| <b>Figura 6</b> - Substância em contato com a pele protegida com gases e fita não irritativa .....  | 53 |
| <b>Figura 7</b> - Limpeza da pele do animal com solução salina com auxílio de gases esterilizadas .....   | 53 |
| <b>Figura 8</b> - Lesão cutânea realizada após anestesia no animal do grupo GNJUP2-14 .....   | 58 |
| <b>Figura 9</b> - Infecção da ferida com <i>S. aureus</i> após ato operatório no animal do grupo GCP-7 .....  | 59 |
| <b>Figura 10</b> - Tratamento diário da ferida com o mel do GMJUP2 .....  | 59 |
| <b>Figura 11</b> - Coleta de <i>swab</i> após o ato operatório e após foi armazenado em tubo de solução salina estéril .....  | 60 |
| <b>Figura 12</b> - Captura da área total da ferida de um animal do grupo GNJUP2-14 com auxílio do calibrador digital .....  | 61 |
| <b>Figura 13</b> - Aspecto visual da síntese de AgNPs utilizando os méis JU1 e JUP2 nas concentrações de 3 mM .....   | 77 |
| <b>Figura 14</b> - Espectros de absorção de UV-Vis das AgNPs em diferentes concentrações .....  | 78 |
| <b>Figura 15</b> - Espectros de FTIR de AgNPs sintetizadas a partir dos méis de abelha sem ferrão JUP1 e JUP2 nas concentrações de 3 mM e 5 mM .....  | 83 |
| <b>Figura 16</b> - Eletromicrografias das AgNPs-JUP1 na concentração de 3 mM .....  | 84 |
| <b>Figura 17</b> - Eletromicrografias das AgNPs-JUP1 na concentração de 5 mM .....  | 85 |
| <b>Figura 18</b> - Eletromicrografias das AgNPs-JUP2 na concentração de 3 mM .....  | 85 |
| <b>Figura 19</b> - Eletromicrografias das AgNPs-JUP2 na concentração de 5 mM .....  | 85 |
| <b>Figura 20</b> - Sequência de fotografias ilustrando o efeito da administração de 300µL de NaOH 0,1N (controle positivo), NaCl a 0,9% (controle negativo), AgNO <sub>3</sub> , AgNPs JUP1 e AgNPs JUP2 ao longo de um período de 5 min, sobre a CAM ..... | 86 |
| <b>Figura 21</b> - Pele íntegra do animal do grupo AgNPJUP1 após 24 h de observação .....   | 87 |
| <b>Figura 22</b> - Evolução da contração da ferida nos dias: 0, 3, 7 e 14 dias .....  | 94 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 23</b> - Microfotografias representativas do 7º e 14º dias das feridas infectadas (400x).<br>Coloração com hematoxilina e eosina ..... | 96 |
| <b>Figura 24</b> - Microfotografias representativas das fibras de colágeno das feridas infectadas do<br>7º e 14º dia (200x) .....                | 99 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> - Tipos de mel, espécies local e período de coleta dos méis .....   | 41 |
| <b>Tabela 2</b> - Grau de reação da pele .....  | 54 |
| <b>Tabela 3</b> - Esquema de pontuação para testes de irritação com o método de teste .....   | 55 |
| <b>Tabela 4</b> - Categoria de irritação de acordo com a faixa de pontuação do HET-CAM .....  | 56 |
| <b>Tabela 5</b> - Detalhamento dos subgrupos de animais definidos .....   | 57 |
| <b>Tabela 6</b> - Valores representados das 35 amostras das análises físico-químicas dos méis de abelha sem ferrão .....  | 65 |
| <b>Tabela 7</b> - Valores obtidos das 35 amostras das análises bioquímicas dos méis de abelha sem ferrão .....  | 70 |
| <b>Tabela 8</b> – Diâmetros dos halos de inibição (mm) produzidos pelas 35 amostras testadas com méis de abelha sem ferrão e 3 antibióticos contra as bactérias <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> no ensaio de difusão em ágar ..... | 73 |
| <b>Tabela 9</b> - Concentração inibitória mínima (CIM) das 35 amostras de méis de abelha sem ferrão contra o crescimento de <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> .....  | 74 |
| <b>Tabela 10</b> - Características coloidais das AgNPs sintetizadas a partir dos méis das amostras JUP1 e JUP2 .....  | 81 |
| <b>Tabela 11</b> - Pontuação de irritação e classificação do produto conforme ao índice de irritação no teste de membrana cório-alantóide do ovo de galinha .....   | 87 |
| <b>Tabela 12</b> - Resultado da toxicidade dérmica com teste de uma única aplicação com observação diária por 14 dias (n=3) .....   | 88 |
| <b>Tabela 13</b> -Peso (g) dos animais expostos dermicamente às AgNPs em comparação ao grupo controle NaCl 0,9% .....   | 89 |
| <b>Tabela 14</b> - Contagem por unidade de <i>S. aureus</i> das feridas dos animais tratados com AgNPs de JUP 1, AgNPs de JUP 2, mel de JUP 1, mel de JUP 2, Soro fisiológico 0,9% e pomada sulfato de neomicina .....  | 90 |
| <b>Tabela 15</b> - Área de cicatrização das feridas nos dias que foram realizadas as medições .....   | 94 |
| <b>Tabela 16</b> - Contagem de fibroblastos no 7º e 14º dia de experimento em lesões cutâneas infectadas .....  | 96 |
| <b>Tabela17</b> - Tabela: Contagem da densidade vascular no 7º e 14º dia de experimento em lesões cutâneas infectadas .....   | 96 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 18</b> - Contagem da área de colágeno tipo I e tipo III no 7º e 14º dia de experimento nas lesões cutâneas infectadas ..... | 99 |
|---|----|

## SUMÁRIO

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 1       | INTRODUÇÃO .....   | 21 |
| 2       | OBJETIVOS.....   | 21 |
| 2.1     | Geral .....  | 23 |
| 2.2     | Específicos.....   | 23 |
| 3       | REVISÃO DE LITERATURA .....  | 24 |
| 3.1     | O mel de abelha sem ferrão .....   | 24 |
| 3.2     | Análise físico-química e bioquímica do mel de abelha sem ferrão .....      | 25 |
| 3.2.1   | Legislação do mel de abelha sem ferrão nos estados do Amazonas e Pará..... | 25 |
| 3.2.2   | Açúcares redutores.....  | 26 |
| 3.2.3   | Sacarose aparente.....   | 26 |
| 3.2.4   | Umidade.....   | 27 |
| 3.2.5   | Cinzas.....  | 27 |
| 3.2.6   | pH.....  | 28 |
| 3.2.7   | Acidez livre.....  | 28 |
| 3.3     | Atividade antimicrobiana do mel .....                                      | 28 |
| 3.4     | Atividade antioxidante do mel.....   | 30 |
| 3.5     | Nanopartícula de prata.....  | 30 |
| 3.6     | Síntese verde de nanopartícula de prata .....                              | 32 |
| 3.7     | Síntese de nanopartículas de prata através do mel de abelha .....          | 34 |
| 3.8     | Métodos de caracterização de nanopartículas de prata.....                  | 34 |
| 3.9     | Atividade antimicrobiana de nanopartícula de prata .....                   | 36 |
| 3.10    | Processo de reparo tecidual .....  | 37 |
| 3.10.1  | Nanopartículas de prata na cicatrização de feridas.....                    | 40 |
| 4       | MATERIAL E MÉTODOS .....   | 40 |
| 4.1     | Local.....   | 40 |
| 4.2     | Procedimentos da pesquisa.....   | 40 |
| 4.2.1   | Obtenção dos méis de abelha sem ferrão.....                                | 41 |
| 4.2.2   | Análise físico-química e bioquímica dos méis de abelha sem ferrão .....    | 43 |
| 4.2.2.1 | Análise de pH.....   | 43 |
| 4.2.2.2 | Teor de acidez livre.....  | 43 |
| 4.2.2.3 | Teor de cinzas .....   | 44 |
| 4.2.2.4 | Teor de umidade .....  | 44 |
| 4.2.2.5 | Teor de sólidos solúveis (°BRIX) .....                                     | 44 |
| 4.2.2.6 | Teor de açúcares redutores.....  | 45 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 4.2.2.7  | Compostos fenólicos totais .....   | 45 |
| 4.2.2.8  | Atividade antioxidante (DPPH) .....  | 45 |
| 4.2.2.9  | Poder antioxidante redutor de ferro (FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power) .   | 46 |
| 4.2.2.10 | Determinação da atividade antioxidante (ABTS) .....  | 46 |
| 4.2.3    | Avaliação antimicrobiana dos méis de abelha sem ferrão <i>in vitro</i> .....   | 46 |
| 4.2.3.1  | Análise antimicrobiana em ensaio de difusão em poços .....   | 46 |
| 4.2.3.2  | Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....   | 48 |
| 4.2.4    | Síntese nanopartículas de prata através dos méis .....   | 49 |
| 4.2.5    | Caracterização das nanopartículas de prata .....   | 49 |
| 4.2.5.1  | Espectroscopia de UV/Vis.....  | 49 |
| 4.2.5.2  | Propriedades coloidais (Espalhamento dinâmico de luz – DLS, potencial Zeta de superfície) e estabilidade das AgNPs ao longo do tempo ..... | 49 |
| 4.2.5.3  | Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....  | 50 |
| 4.2.5.4  | Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....   | 50 |
| 4.2.6    | Ensaio de toxicidade.....  | 50 |
| 4.2.6.1  | Toxicidade dérmica aguda .....   | 50 |
| 4.2.6.2  | Ensaio de irritação/corrosão ocular aguda <i>in vitro</i> .....  | 54 |
| 4.2.7    | Ensaio de cicatrização.....  | 56 |
| 4.2.7.1  | Grupos de animais para o ensaio da cicatrização.....   | 56 |
| 4.2.7.2  | Anestesia e ato operatório dos animais .....   | 58 |
| 4.2.7.3  | Pós-operatório .....   | 59 |
| 4.2.7.4  | Coleta dos swabs da ferida e avaliação microbiológica.....   | 60 |
| 4.2.7.5  | Avaliação macroscópica .....   | 60 |
| 4.2.7.6  | Eutanásia dos animais .....  | 62 |
| 4.2.7.7  | Avaliação microscópica .....   | 62 |
| 4.2.7.8  | Análise por Hematoxilina e Eosina (HE).....  | 62 |
| 4.2.7.9  | Análise por Picro-Sirius Red .....   | 64 |
| 4.3      | Análises de dados .....  | 64 |
| 4.4      | Princípios éticos da pesquisa .....  | 65 |
| 5        | RESULTADOS E DISCUSSÕES .....  | 65 |
| 5.1      | Análise físico-química e bioquímica dos méis .....   | 65 |
| 5.2      | Análise microbiológica os méis através dos halos de inibição e Concentração Inibitória Mínima.....   | 71 |
| 5.3      | Síntese de nanopartículas de prata.....  | 75 |
| 5.4      | Caracterização de nanopartículas de prata.....   | 77 |
| 5.4.1    | Avaliação por UV/VIS .....   | 77 |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 5.4.2 | Avaliação da estabilidade coloidal das AgNPs por DLS e potencial Zeta de Superfície.....               | 79  |
| 5.4.3 | Avaliação das nanopartículas de prata através de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)..... | 81  |
| 5.4.4 | Análise morfológica das AgNPs.....   | 83  |
| 5.5   | Ensaio de Toxicidade.....  | 85  |
| 5.5.1 | Toxicidade ocular aguda.....   | 86  |
| 5.5.2 | Toxicidade dérmica aguda.....  | 87  |
| 5.6   | Avaliação microbiológica <i>in vivo</i> .....  | 89  |
| 5.7   | Avaliação macroscópica da cicatrização.....  | 92  |
| 5.8   | Avaliação microscópica da cicatrização.....  | 94  |
| 5.8.1 | Avaliação de fibroblastos e densidade vascular.....  | 94  |
| 5.8.2 | Avaliação das fibras de colágeno tipo I e tipo III.....  | 98  |
| 7     | CONCLUSÃO.....   | 101 |
|       | REFERÊNCIAS.....   | 103 |
|       | ANEXO.....   | 130 |

## 1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e possui diversas funções, atuando como barreira física e química contra a apropriação de microrganismos invasores e proporciona a prevenção da desidratação corporal, agressões de irritantes, além de atuar na termorregulação e imunovigilância e sensibilidade. No entanto, quando ocorrem lesões, cirurgias, queimaduras e doenças crônicas, há um dano na barreira fisiológica da pele, diminuindo sua função de proteção e, conseqüentemente, patógenos podem invadir facilmente e ocupar a área da ferida, podendo levar em um processo de infecção grave (BUDAI-SZÚCS *et al.*, 2021; RUGGERI *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2019).

Dessa forma, o processo de cicatrização de uma ferida cutânea pode ser prejudicado por fatores externos e internos, como necrose tecidual, contágio por microrganismos, aprisionamento de material estranho, além das comorbidades subjacentes do indivíduo. Todas essas condições podem prolongar cada fase do processo de cicatrização, como a inflamação, proliferação e remodelação, causando danos estruturais e funcionais no tecido (LIANG *et al.*, 2019; NEGUT *et al.*, 2018).

Segundo Bombin *et al.* (2020), existe um retardo de cicatrização por microrganismos, visto que as bactérias são os principais impedimentos do reparo tecidual, podendo levar a uma morbidade significativa ao indivíduo. Conseqüentemente, isso ocasiona um gasto elevado para tratar com antibióticos as feridas desencadeadas. Além disso, observa-se que, com a repercussão da elevação dos custos financeiros, há um maior tempo da internação hospitalar e a preferência no tratamento de feridas com materiais já consolidados no mercado. Dessa forma, o desenvolvimento de novas tecnologias destinadas a melhorar o processo da cicatrização é desafiador (FRYKBERG; BANKS, 2015).

Segundo Negut *et al.* (2018) o problema mais frequentemente encontrado no fechamento de uma ferida é a colonização por um agente infeccioso. Os patógenos podem infectar a ferida, destes, o mais frequentemente detectado é a bactéria *Staphylococcus aureus* que adere na ferida e se multiplica, causando danos. Além disso, são detectados também microrganismos como *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* em lesões teciduais (MIHAI *et al.*, 2014; SHU *et al.*, 2023).

De acordo Yousuf *et al.* (2016) os indivíduos têm usado o mel como alimento e medicamento desde a antiguidade até os tempos atuais tendo em vista seus diversos benefícios para a saúde. A composição do mel é variável, isto é, diferentes fatores afetam diretamente sua

composição e qualidade, como a espécie de abelha, origem botânica, condições do ambiente, entre outros (VALLIANOU, 2014).

O mel de abelha sem ferrão (ASF) promove diversos efeitos para a saúde, sendo usado em remédios tradicionais para tratar contusões, catarata, inflamações, infecções, varizes, doenças renais, cicatrização de feridas e outros (NOOR *et al.*, 2014; VIT *et al.*, 2015). Segundo Nordin *et al.* (2018) o mel de ASF apresenta diferentes concentrações de açúcar, teor de umidade e acidez, entre outras propriedades físico-químicas. Além disso é abundante em flavonoides e compostos fenólicos, no qual promovem diversas finalidades biológicas e, principalmente atuam como antioxidantes naturais, com grande potencial para atividade antimicrobiana, anticancerígena, anti-inflamatória, cicatrizante, entre outras (SERAGLIO *et al.*, 2019, WAHEED *et al.*, 2019).

Há pouco tempo a nanotecnologia surgiu como uma área de interesse para a ciência, com reconhecido valor e desenvolvimento dinâmico no mundo. As nanopartículas possuem dimensões em nanoescala com tamanho variando de 1 a 100 nm. Entre as nanopartículas metálicas, as nanopartículas de prata (AgNPs) têm recebido cada vez mais visibilidade por apresentarem propriedades físicas, químicas e biológicas excepcionais (HUSSAIN *et al.*, 2021). Segundo Franci *et al.* (2015) as AgNPs são bem prestigiadas devido suas propriedades antimicrobianas, causadas por um pequeno tamanho e grande área de superfície. Além disso, as AgNPs também são amplamente utilizadas como anti-inflamatórias, antissépticas, anticancerígenas, cicatrizante e antivirais (GHAREEB *et al.*, 2022; HE *et al.*, 2018).

Segundo Subramaniam *et al.* (2022) as aplicações de nanomateriais dependem dos seus métodos de síntese, sendo que as AgNPs são geralmente sintetizadas por abordagens físicas ou químicas. Porém, tais métodos envolvem a manutenção de altas temperaturas e pressões, com a utilização de reagentes potencialmente tóxicos e, conseqüentemente, promovem altos custos de execução. Sendo assim, a síntese verde é um foco atualmente das pesquisas, pois essa síntese de AgNPs é um procedimento simples, de etapa única, rápida, barata e ecológica (CHATTHA *et al.*, 2022).

De acordo com Bahari *et al.* (2022) já existem alguns estudos relatando a associação do mel de abelha com as AgNPs para fins curativos de feridas e a partir disso se faz necessário aprofundar os conhecimentos científicos pré-clínicos para usos futuros em ensaios clínicos. Nesse sentido, esse estudo teve como finalidade avaliar o efeito de AgNPs sintetizadas por meio do mel de abelha sem ferrão no reparo tecidual, *in vivo*, de feridas em ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- Avaliar o processo de reparo tecidual de feridas cutâneas infectadas com *Staphylococcus aureus* em ensaio *in vivo* em ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) através da aplicação de nanopartículas de prata sintetizada a partir de méis de abelha sem ferrão.

### 2.2 Específicos

- Analisar as características físico-químicas e bioquímicas de amostras de méis de abelhas sem ferrão da região Amazônica;
- Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos méis de abelha sem ferrão por meio de ensaios difusão em poços e de concentração inibitória mínima (CIM);
- Sintetizar AgNPs por rota de síntese verde utilizando méis de abelha sem ferrão como agentes redutores e estabilizantes;
- Caracterizar as AgNPs utilizando técnicas de espectroscopia no ultravioleta visível (UV/vis), espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) espalhamento de luz dinâmico (DLS), potencial Zeta de superfície e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET);
- Analisar a toxicidade das AgNPs por meio do teste toxicidade dérmica e ocular;
- Avaliar a atividade antibacteriana das AgNPs em feridas infectadas com *Staphylococcus aureus* e comparar com os outros grupos da pesquisa;
- Realizar análise morfométrica com relação ao perímetro e área da ferida dos grupos da pesquisa por fotogrametria;
- Quantificar a densidade vascular cutânea e a contagem direta de fibroblastos no processo de reparo tecidual dos grupos da pesquisa;
- Analisar o nível de alinhamento das fibras colágenas na reparação tecidual e quantificar, por área, as fibras de colágeno dos grupos da pesquisa.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 O mel de abelha sem ferrão

Segundo Biluca (2014) as abelhas nativas são conhecidas também como Abelhas Sem Ferrão (ASF), pertencem à família Apidae e possuem 3 tribos com hábitos completamente distintos: *Meliponini*, *Trigonini* e *Lestrimelittini*, no qual são representadas por vários gêneros e diversas espécies. As ASF possuem um ferrão naturalmente atrofiado, ou seja, são incapazes de ferocar e não exigem o uso de equipamentos especiais em seus manejos, dessa forma, são assim chamadas devido não possuir ferrão, diferentemente das abelhas *Apis mellifera* (BRAGHINI *et al.*, 2021; VILLAS-BÔAS, 2018).

De acordo com Pedro (2014), estima-se que no Brasil tenha cerca de 244 espécies de ASF. Sendo as espécies *Tetragonisca angustula*, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona (Michmelia) paraenses*, *Melipona fasciculata*, *Melipona rufiventris* e *Scaptotrigona sp.* as mais encontradas na meliponicultura (JAFFÉ *et al.*, 2015). Segundo Villas-Bôas (2012) as ASF são encontradas em todas as regiões do Brasil, com maior ocorrência nas regiões norte e nordeste. Nestas regiões, predomina a criação de abelhas da tribo *Meliponini* por comunidades rurais e povos tradicionais.

As abelhas estão entre os insetos atraídos pelas flores, geralmente por aromas agradáveis. Elas coletam o néctar floral por meio de enzimas de sua vesícula nectífera ou de excreções de insetos sugadores de plantas. Ao ser transportado para a colônia das abelhas, o néctar é depositado até um nível de desidratação que por mecanismos específicos, o mel é formado (PEREIRA, 2015). A composição do mel das ASF varia de acordo com a espécie de abelha que o produz, da fonte nutricional, fonte botânica (origem mono ou multifloral), das condições geográficas, condições ambientais, climáticas e das condições do manejo e armazenamento do mel (COSTA *et al.*, 2018; KIVRAK *et al.*, 2017).

De acordo com Holanda *et al.* (2012), devido à grande variedade de flora e biomas do Brasil, além da grande variedade de espécies de ASF, o mel produzido por esse tipo de inseto possui um enorme potencial para produção e valorização. A produção do mel de ASF é basicamente regionalizada e sendo assim o volume disponível é menor e o seu valor no mercado é muitas vezes maior do que o mel produzido pelas abelhas *Apis mellifera* criadas pela maioria de apicultores brasileiros e presentes em todo o território nacional (CAMARGO *et al.*, 2017).

Segundo Nordin *et al.* (2018) as abelhas sem ferrão preferem clima quente e são mais dispostas ao sol do que às condições frias. As características distintivas da abelha sem ferrão para as *Apis mellifera* consiste na coleta do néctar de plantas baixas, voos de curta duração em

busca de alimento e desenvolvimento de colmeias na posição horizontal para armazenar néctar e pólen. Adicionalmente, Biffi (2021) ressalta que as ASF produzem um mel com características diferenciadas dos méis de abelhas *Apis mellifera*, de sabor suave, levemente ácido e teores de carboidratos. Dessa forma, o mel de ASF é uma fonte natural rica em compostos importante para a saúde humana, principalmente devido à presença de compostos fenólicos, flavonoides, ácidos orgânicos, aminoácidos e compostos derivados de carotenoides (SILVA *et al.*, 2013; SUHAG, 2016).

### **3.2 Análise físico-química e bioquímica do mel de abelha sem ferrão**

#### **3.2.1 Legislação do mel de abelha sem ferrão nos estados do Amazonas e Pará**

Os parâmetros físico-químicos estabelecidos pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade - RTIQ estabelecido pela IN/MAPA Nº 11/2000 fazem referência apenas ao mel de abelhas africanizadas (*Apis mellifera*). No momento atual, existem algumas legislações estaduais para o mel de ASF, como por exemplo, o estado do Amazonas dispõe de RTIQ para o mel das espécies de abelhas sem ferrão estabelecido pela portaria da Agência de Defesa Agropecuária e Florestal do Estado do Amazonas (ADAF) Nº 253/2016 publicada no Diário Oficial em 1º de novembro de 2016, demandando assim de mais regulamentações no que diz respeito à caracterização físico-química e à autenticidade do mel de ASF em todo o território nacional (FERNANDES *et al.*, 2022).

As atividades produtivas dos méis de ASF se consolidaram no estado do Amazonas devido ao esforço de instituições de ensino, pesquisa e extensão, além de organizações de meliponicultores na sistematização de informações técnicas sobre manejo e desenvolvimento de metodologias para a criação racional dessas abelhas, bem como também, nas ações para adequação da Meliponicultura na legislação ambiental (FERNANDES *et al.*, 2022). Como produto natural amplamente utilizado para fins nutricionais e medicinais, assim como outros alimentos, o mel está sujeito a diversas contaminações e adulterações. Deste modo, o uso sem o devido conhecimento de sua origem, pode acarretar riscos significativos à saúde (AL-WAILI *et al.*, 2012).

O estado do Pará está localizado na região norte do Brasil, sendo uma das regiões mais promissoras para a produção de diferentes tipos de mel, incluindo o mel de ASF. Estas abelhas nativas estão fortemente adaptadas a esta região por causa dos diferentes solos, localização geográfica, boas condições climáticas e grande diversidade de plantas com predomínio de flores (SILVA *et al.*, 2013). A Portaria Nº7554/2021 da Agência de Defesa Agropecuária do Estado

do Pará (ADEPARÁ) publicada em 22 de novembro de 2021 atribuiu o regulamento técnico de identidade e qualidade do mel de ASF (Hymenoptera, Apidae, Meliponini) no estado do Pará, sendo enfatizado que as ASF (Meliponini) e seus méis são elementos importantes e característicos da cultura paraense, sendo identificada uma diversidade de espécies de abelhas nativas no estado do Pará e a importância destas para o ecossistema e também para a economia local. É descrito nessa portaria o estabelecimento de requisitos para as características físico-químicas do mel de ASF quanto à maturidade, pureza e deterioração, além disso, são citadas orientações quanto à higiene, rotulação e conservação dos méis para o consumo humano (PARÁ, 2021).

A disponibilidade limitada do mel de ASF e seus altos preços propiciam diversas fraudes, favorecendo assim adulterações, como por exemplo, a substituição por um mel de baixo valor, adição de outros açúcares, aditivos químicos ou rotulagem errada de sua origem para obter um preço de venda mais alto (MOORE *et al.*, 2012; PUSCAS *et al.*, 2013). As propriedades físico-químicas do mel estão sendo cada vez mais estudadas em todo o mundo nos últimos anos visto que essas características são importantes no processo de certificação, pois a qualidade do mel é influenciada principalmente por suas origens geográficas, climáticas, florais, entomológicas, além do processamento e manipulação do mel de abelha sem ferrão (SCHIEVANO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2017; TORNUK *et al.*, 2013).

O mel de ASF contém em sua composição uma solução concentrada de açúcares com maior predomínio de frutose e glicose. Além de conter outros componentes como hidratos de carbono, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais, substâncias aromáticas, pigmentos, grãos de pólen e outros (AMAZONAS, 2016; PARÁ, 2021). As características físico-químicas do mel de ASF são referentes à maturidade (açúcares redutores, sacarose aparente e umidade), pureza (sólidos insolúveis em água, minerais ou cinzas e pólen) e deterioração (pH, acidez livre, atividade diastásica e hidroximetilfurfural) (AMAZONAS, 2016; PARÁ, 2021).

As características físico-químicas do mel de ASF são referentes a maturidade (açúcares redutores, sacarose aparente e umidade), pureza (sólidos insolúveis em água, minerais ou cinzas e pólen) e deterioração (pH, acidez livre, atividade diastásica e hidroximetilfurfural) (PARÁ, 2021; AMAZONAS, 2016).

### 3.2.2 Açúcares redutores

Os açúcares redutores são formados pelos monossacarídeos glicose e frutose que representam cerca de 75% dos açúcares encontrados no mel. Em sua composição existem ainda de 10 a 15% de dissacarídeos como sacarose, maltose, turanose, isomaltose, maltulose, trealose,

nigerose e kojibiose, além de pequenas porcentagens de outros açúcares como maltotriose e melezitose. Estes açúcares presentes no mel são responsáveis por propriedades como valor energético, viscosidade, higroscopicidade e granulação (DA SILVA *et al.*, 2016; KAMAL e KLEIN, 2011).

Escuredo *et al.* (2014) descrevem que a composição dos açúcares redutores é variável, dependendo de sua origem botânica e origem geográfica, além de proporcionar a glicose uma cristalização, isso porque frações maiores de glicose em relação à frutose podem representar uma cristalização mais rápida devido a menor solubilidade da glicose em água em relação à frutose, sendo que a frutose por ter alta higroscopicidade favorece a doçura do mel. Segundo Amazonas (2016) o limite mínimo permitido é de 50% para o mel de ASF.

### 3.2.3 Sacarose aparente

Em relação aos dissacarídeos encontrados no mel, a sacarose aparente sobressai, e quando verificada em altas concentrações, na maioria das vezes é indicativo de um mel “verde” ou adulterado por adição de açúcares derivados de cana-de-açúcar refinado de beterraba, além de colheita precoce do mel, com introdução desses açúcares, por exemplo (BARBOSA *et al.*, 2014; ESCUREDO *et al.*, 2014; SILVANO *et al.*, 2014; TORNUK *et al.*, 2013).

### 3.2.4 Umidade

Segundo Escuredo *et al.*, (2013) apresenta características como conservação cor, sabor, gravidade específica e solubilidade. O teor de umidade pode ser influenciado por características das origens botânicas e regiões geográficas onde é cultivado, como a alta umidade relativa e pode ter a interferência das estações do ano, sendo comum ocorrer o processo de fermentação em condições chuvosas. Além disso, pode ocorrer o aumento da porcentagem da umidade durante o manejo da colheita e armazenamento incorreto dos méis, visto que o mel é higroscópico, ou seja, com alta capacidade de absorver água (KARABAGIAS *et al.*, 2014).

De acordo com Amazonas (2016), os valores de umidade para os méis de ASF são de 23% a 35%. Sendo que tais valores facilitam os processos microbiológicos como a fermentação indesejável dos açúcares pelas leveduras (KUROISHI *et al.*, 2012).

### 3.2.5 Cinzas

Segundo Karabagias *et al.* (2014) o teor de cinzas expressa os resíduos de minerais presente nos méis, sendo influenciado pela cor e sabor, quanto mais minerais detectados nas

amostras, visível pela coloração escurecida e pelo sabor forte dos méis. De acordo com Amazonas (2016), o limite máximo permitido é de 0,6% para o mel de ASF em relação a sua análise físico-química.

### 3.2.6 pH

Segundo Ribeiro *et al.* (2014) o pH (potencial hidrogênio) com valores baixos promove o bloqueio do crescimento de microrganismos. Quando o pH encontrado com valores entre 7,2 e 7,4, se observa um provável aumento de infestações bacterianas. A determinação do pH está relacionada com a forma de extração e armazenamento do mel, além disso, a adulteração é comum, por meio da adição de outras substâncias como por exemplo o xarope de milho que aumenta o pH do mel. De acordo com Pará (2021) o pH normal para méis de ASF é entre 2,9 e 4,5.

### 3.2.7 Acidez livre

A acidez promove a estabilidade dos méis contra o desenvolvimento de microrganismos, além de identificar o processo fermentativo dos açúcares em ácidos orgânicos. Os resultados dessa análise sofrem a influência da origem geográfica e período de colheita que, conseqüentemente, pode alterar a acidez do mel (DA SILVA *et al.*, 2016; TORNUK *et al.*, 2013).

De acordo com Amazonas (2016) o limite máximo de acidez livre para o mel de ASF é de 80 mEq kg<sup>-1</sup>. A acidez livre elevada pode indicar a fermentação dos açúcares em ácidos orgânicos e, conseqüentemente, elevar o teor de acidez livre do mel (DA SILVA *et al.*, 2016).

## 3.3 Atividade antimicrobiana do mel

De acordo com Meo *et al.* (2017), diversas pesquisas tem sido feitas sobre a atividade antimicrobiana do mel contra microrganismos patogênicos. A resistência de bactérias a antimicrobianos se tornou um problema de saúde pública global, ou seja, muitos fármacos deixaram de atuar satisfatoriamente contra infecções bacterianas devido a multirresistência de microrganismos, com isso tem sido utilizado doses mais concentradas de antibióticos (LOUREIRO *et al.*, 2016).

De acordo com Adadi e Obeng (2017) a atividade antimicrobiana do mel está relacionada à sua localização geográfica, condições climáticas e fonte alimentar das abelhas. Além disso, o processamento e armazenamento do mel podem interferir na atividade

antimicrobiana. Os méis de ASF, como por exemplo do gênero *Melipona*, possuem características físico-químicas e microbiológicas pouco conhecidas devido a sua ampla distribuição geográfica no território brasileiro. Dessa forma, isto torna-se o foco de diversas pesquisas sobre o comportamento dos microrganismos frente aos diferentes tipos de méis (BATISTON, 2017; CHUTTONG *et al.*, 2016).

Segundo Pires (2015) alguns microrganismos Gram-positivos como do gênero *Staphylococcus*, são conhecidos como uma das principais causas de infecções bacterianas devido colonizarem a pele e as membranas mucosas do hospedeiro. O mel é capaz de inibir o crescimento de várias bactérias, possivelmente devido as propriedades físico-químicas como a atuação de minerais, proteínas, vitaminas, ácidos orgânicos, fenólicos, flavonoides, enzimas e outros fitoquímicos (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010). Segundo Braghini (2016), as enzimas como a glicose-oxidase, catalase e peroxidase atuam reduzindo o oxigênio atmosférico em peróxido de hidrogênio, conseqüentemente funcionando como agente antimicrobiano. Segundo Kwakman e Zaat (2012) o mel tem atividade antimicrobiana *in vitro* contra os microrganismos mais comuns que infectam feridas, incluindo a *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*.

Para o teste de atividade antimicrobiana têm-se o método *in vitro*, sendo que a maioria das análises é geralmente feita a partir de dois métodos: o ensaio de difusão em ágar e outro processo por meio de diluição seriada em placas de microdiluição. Sendo que ambas as técnicas são utilizadas para a determinação antimicrobiana do mel (SZWEDA, 2017).

A difusão em poço de ágar é baseada na medição do tamanho da zona de inibição de crescimento ao redor da amostra. Neste ensaio, a superfície da placa de ágar é inoculada espalhando por esfregaço o inóculo microbiano sobre toda a superfície do ágar, onde é feito um orifício circular (6–8 mm) e então é escolhida a concentração para ser aplicada ao poço. Em seguida, a placa de ágar é então incubada para permitir que o agente antibacteriano se difunda no meio de ágar e iniba o crescimento da cepa microbiana (KWAKMAN *et al.*, 2010; HOSSAIN *et al.*, 2022).

O método de diluição em série para investigação do potencial antimicrobiano permite a determinação quantitativa da atividade bacteriostática. A atividade bacteriostática é caracterizada com CIM (Concentração Inibitória Mínima), pois determina a menor concentração do mel frente ao crescimento do microrganismo. As CIMs basicamente são determinadas em triplicata por ensaios de microdiluição em placas de 96 poços de acordo com os padrões do CLSI (CLSI, 2012; KUŚ *et al.*, 2016; SZWEDA, 2017).

### 3.4 Atividade antioxidante do mel

De acordo com Ribeiro *et al.* (2015) os méis possuem atividades antioxidantes e agem no controle dos efeitos danosos das reações oxidativas evitando ou minimizando a formação dos radicais livres. De acordo com Tuksitha *et al.* (2018) os méis de ASF possuem concentrações favoráveis de compostos fenólicos e flavonoides que são capazes de atuar como antioxidantes naturais e possuem atividade antimicrobiana. Segundo Escuredo *et al.* (2014), os compostos fenólicos dependem da origem botânica e geográfica das plantas onde as abelhas coletam o néctar. Além disso, a capacidade antioxidante de um mel pode ter a habilidade de minimizar reações de oxidação em alimentos e pode agir no sistema fisiológico dos seres humanos, contribuindo no tratamento e prevenção de doenças crônicas, por exemplo (ALVAREZ-SUAREZ *et al.*, 2010).

As propriedades antioxidantes do mel de ASF aumentaram o interesse por diversas pesquisas que notaram que o mel nativo tem potenciais contra radicais livres. A partir da medição de compostos fenólicos totais, flavonoides, atividade de eliminação de radicais de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), poder antioxidante de redução férrica (FRAP), ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS), tais atividades contra os radicais promovem uma ampla variação de propriedades antioxidantes promovidas por méis de diferentes espécies de abelhas sem ferrão (BILUCA *et al.*, 2016). Nesse sentido, Alvarez-Suarez *et al.* (2018) avaliaram o poder antioxidante do mel de *Melipona beecheii* e encontraram elevada capacidade antioxidante, com altos teores de compostos fenólicos, flavonoides, carotenóides, ácido ascórbico, aminoácidos livres e proteínas, em comparação ao mel de *Apis mellifera*.

Diversas pesquisas evidenciam que o estresse oxidativo contribui para a ocorrência de determinadas doenças crônicas e degenerativas, como por exemplo a hipertensão, o câncer e o mal de Alzheimer. Dessa forma, uma alimentação com a presença significativa de compostos antioxidantes é muito importante para prevenir, retardar ou remover agravos oxidativos (EREJUWA *et al.*, 2012).

### 3.5 Nanopartícula de prata

Segundo Bayda *et al.* (2019) as nanopartículas (NPs) são definidas como partículas ou aglomerados de partículas ultrafinas, com diâmetro entre 1 e 100 nm. Essas partículas agem de acordo com as características geométricas, área superficial, forma e composição química, sendo que as nanopartículas tendem a se comportar de formas diferentes (ECHEVERRY-CHICA, 2020). No entanto, de acordo com Busquets e Mbundi (2017) nem toda estrutura com dimensões externas inferiores a 100 nm pode ser considerada nanomaterial, para isso, as

propriedades físico-químicas precisam ser distinguidas do mesmo material em escalas maiores. As nanopartículas se tornam interessantes devido às diversas propriedades físicas, tais como condutividade elétrica, reatividade, ponto de fusão, ópticas, morfologia, revestimento de superfície e outras (KHEZERLOU *et al.*, 2018; RESCH e FARINA, 2015).

Os nanomateriais promovem o interesse de várias áreas das ciências, entre eles as nanopartículas de prata (AgNPs) que se destacam pela alta estabilidade térmica, versatilidade, ação de longo prazo, durabilidade e principalmente pelo seu desempenho antimicrobiano (BRITO *et al.*, 2021). Desde muito tempo atrás, como há 4000 a.C., era comum a utilização do metal de forma empírica para o armazenamento de água potável e em suturas para fechar feridas, mesmo que nessa época as pessoas não soubessem que os micróbios eram o foco das infecções (HICKS *et al.*, 2015).

As AgNPs apresentam propriedades físico-químicas com características interessantes e são otimizadas por ter boa atividade catalítica, propriedades óticas, térmicas e de alta condutividade elétrica, morfologia ajustável, fácil síntese, alta relação superfície/volume e sistema de entrega intracelular que podem ser manipuladas a favor dos seres humanos. Além disso, as AgNPs apresentam também diversas propriedades biológicas que as tornam ainda mais interessantes por apresentar propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais e anticancerígenas, por exemplo (MATHUR *et al.*, 2018; PATHAKOTI *et al.*, 2017).

De acordo com Dias *et al.* (2021), para a geração de novos produtos o uso da nanotecnologia se tornou essencial em diversos países. O mercado brasileiro detém de investimentos públicos e privados que permitem a criação de programas, redes cooperativas de pesquisa e laboratórios de apoio ao desenvolvimento de pesquisa em universidades, institutos de pesquisas e empresas. Dessa forma, as AgNPs estão presentes em diversas categorias de produtos, com sua utilização em áreas como saúde (curativos de feridas cutâneas, fármacos e cosméticos), além de fazer parte da composição de produtos na indústria de alimentos, têxtil, perfumaria, farmacêutica, agrícola, produtos de limpeza, eletroeletrônicos, entre outros (SILVA, 2020; SOUSA *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2016).

É importante ressaltar a utilização de AgNPs na área da saúde, pois ela tem sido amplamente aplicada em revestimentos antibacterianos, que são utilizados em curativos de feridas, implantes cardiovasculares, cateteres, implantes ortopédicos e dentários. Além disso, as AgNPs são também capazes de detectar células cancerígenas (KOOHI *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2022; WEI *et al.*, 2015) e mesmo com seus benefícios e ascendente interesse e aplicações, a exposição às AgNPs levanta questionamentos sobre suas implicações na saúde humana devido a toxicidade da prata (SOUSA *et al.*, 2022; ZORRAQUÍN-PEÑA *et al.*, 2020).

### 3.6 Síntese verde de nanopartícula de prata

De acordo com Hosny *et al.* (2017) existem vários métodos para sintetizar e estabilizar AgNPs, entre os mais utilizados estão: redução química e técnicas eletroquímicas tradicionalmente empregadas. No entanto, esses mecanismos possuem custos altos, demanda de muita energia e usam, geralmente, reagentes tóxicos, que são danosos para os sistemas biológicos e para o meio ambiente (GONZÁLEZ FÁ *et al.*, 2017; JIANG *et al.*, 2020). Outra maneira para sintetizar e estabilizar as AgNPs é por meio da síntese biológica desenvolvida atualmente devido a sua rapidez, praticidade, simplicidade e sustentabilidade. Ambos os modelos são baseados na redução de íons prata  $Ag^+$  a  $Ag^0$ , formando as AgNPs (DURÁN *et al.*, 2019).

De acordo com Baker *et al.* (2013) na rota química de preparação de AgNPs os agentes redutores de  $Ag^+$  mais utilizados são o citrato de sódio e borohidreto de sódio. Além disso, Díaz-Cruz *et al.* (2016) relatam que são utilizados agentes estabilizantes como os polímeros biocompatíveis. Ottoni *et al.* (2018) citam que a síntese química é o método mais utilizado para sintetizar AgNPs, no qual consiste na redução química de sais na presença de um redutor adequado. Essa rota de síntese necessita de produtos que atuem como estabilizantes e redutores, sendo que em sua maioria acabam se tornando tóxicos e caros (XUE *et al.*, 2016).

Segundo Melo Jr. *et al.* (2012) é comum na síntese por rota química a formação de uma suspensão coloidal, no entanto, é necessário que ela seja estável. Porém, nessa síntese ocorre instabilidade constante já que essas partículas possuem uma alta energia superficial, favorecendo a formação de precipitado e, termodinamicamente, ocorre a agregação das nanoestruturas, impedindo que ocorra a formação de nanomateriais estáveis. Assim, a superfície da nanopartícula deve ser recoberta, isto é, estabilizada, a fim de se evitar a oxidação e aglomeração das AgNPs (DURÁN *et al.*, 2019).

O método de síntese tradicional é descrito pela abordagem “*Bottom-up*”, ou seja, de “de baixo para cima”, no qual as partículas são obtidas por meio de moléculas ou átomos, via métodos químicos, que interagem entre si, aglomerando-se de forma organizada, até formarem uma estrutura em nanoescala por meio da redução, radiação e métodos eletroquímicos. Nos métodos de síntese referidos como métodos “*Top-down*”, ou seja, “de cima para baixo”, as partículas são sintetizadas a partir do fracionamento de estruturas maiores até atingir a condição de nanoescala, por meio de métodos físicos como ablação a laser, decomposição termal, evaporação e condensação. Esses métodos físicos e químicos relatados para a síntese de AgNPs são potencialmente tóxicos e em sua maioria causam riscos para o ambiente e para os

organismos biológicos (PAREEK *et al.*, 2017; RUDRAMURTHY *et al.*, 2016; TREFRY, 2011;).

Segundo Das *et al.* (2019), para diminuir os riscos ambientais e aos seres vivos a síntese verde ou rota biogênica apresenta-se como alternativa economicamente e ecologicamente viável para a síntese de AgNPs. A síntese biogênica usa técnicas simples, de baixo custo, de alto rendimento, sustentável e pode ser realizada sob temperatura e pressão ambiental, além disso, não se utiliza agentes estabilizantes externos, pois os próprios constituintes biológicos fazem essa função (MAKAROV *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2016). O processo de síntese verde utiliza agentes redutores com baixa toxicidade, como por exemplo enzimas, proteínas, polissacarídeos, aminoácidos, flavonoides, alcaloides, polifenóis, terpenoides, compostos heterocíclicos e compostos hidrossolúveis. Esses compostos têm papéis significativos na redução de sais metálicos e, além disso, atuam como agentes de cobertura e estabilização das AgNPs sintetizadas, assim promovendo estabilidade e evitando sua aglomeração (PERALTA-VIDEA *et al.*, 2016; DURÁN *et al.*, 2019).

A síntese verde é realizada por extratos vegetais, fungos, bactérias, algas, leveduras e outros, sendo que a técnica de síntese com extratos de plantas ganhou, atualmente, uma maior importância e atenção, pois utiliza um método simples, eficiente, viável e de baixo custo (JAMKHANDE *et al.*, 2019; SEABRA e DURAN, 2015; SINGH *et al.*, 2018;). As diferentes partes de uma mesma planta, como por exemplo as folhas, flores, caules, sementes, frutos, casca, pupa, raízes, látex e outros, inclusive a biomassa morta e seca da planta podem ser usadas de modo eficaz para sintetizar as AgNPs (LAKSHMANAN *et al.*, 2018; RANI *et al.*, 2020; RATNER *et al.*, 2012).

De acordo com Zhang *et al.* (2016) os extratos de plantas atuam como agentes redutores de íons metálicos promovendo a redução e estabilização das AgNPs, desta forma, a síntese é influenciada pelo tempo da reação, temperatura de síntese, concentração do sal metálico e o pH do meio, no qual influenciam no tamanho e na forma das AgNPs sintetizadas. Além disso, o processo de coleta e o armazenamento do extrato influenciam na síntese de AgNPs (AKHTAR *et al.*, 2013). Segundo Siddiqui *et al.* (2015) o uso de extratos de plantas para a síntese de AgNPs é o mais vantajoso em relação à síntese utilizando microrganismos pois os custos são altos com o isolamento de microrganismos e meios de cultura, além de ocorrer a exposição do pesquisador aos riscos biológicos. Dessa forma, a síntese de AgNPs por meio de extratos de plantas é um método rápido, atóxico, mais econômico e não demanda manutenção da cultura celular (DE MATTEIS *et al.*, 2018).

### 3.7 Síntese de nanopartículas de prata através do mel de abelha

O mel exibe em sua composição compostos que são capazes de reduzir e estabilizar a prata, pois o mel além de possuir ação antimicrobiana natural tem grande capacidade de ser empregado na síntese de AgNPs com benefícios à saúde humana, meio ambiente e para todo o ramo da nanobiotecnologia (DOURADO *et al.*, 2020; OSKUEE *et al.*, 2016). Este produto vem sendo utilizado para a síntese de AgNPs pois, a partir dos compostos fenólicos de diferentes origens florais e açúcares presentes em sua composição, são responsáveis por reduzir os íons metálicos  $\text{Ag}^+$ , formando as AgNPs. Além disso, atuam como agentes estabilizantes para as AgNPs, evitando que elas se aglomerem (AL-BRAHIM; MOHAMMED, 2020; OSKUEE *et al.*, 2016). O mel possui diversos componentes como frutose, glicose, vários ácidos, vitaminas e minerais que agem como agentes redutores e estabilizantes. Além disso, o mel também contém outros componentes, como sacarose e enzimas, que também podem reduzir os íons da prata (HAIZA *et al.*, 2013).

Segundo Ghramh *et al.* (2020) as AgNPs sintetizadas a partir do mel vem sendo estudadas por suas propriedades antimicrobianas. No estudo de Marsudi *et al.* (2021), as AgNPs foram sintetizadas com sucesso usando o método de síntese verde a partir do mel nativo da Indonésia como redutor da prata. O tamanho das partículas foi otimizado principalmente de acordo com a concentração de nitrato de prata e a concentração do mel. Dessa forma, o mel sintetizado por AgNPs pode fornecer uma síntese econômica na geração de agentes antibacterianos comerciais (MUTIA *et al.*, 2022).

### 3.8 Métodos de caracterização de nanopartículas de prata

A caracterização de AgNPs permite a identificação de tamanho, forma e distribuição das partículas e são fundamentais para prever suas aplicações. Os dados obtidos permitem avaliar os mecanismos de formação das partículas, atividade de agentes redutores e estabilizantes e condições de preparo (SILVA, 2016).

Segundo Jiang *et al.* (2020) as AgNPs possuem propriedades ópticas privilegiadas que as fazem interagir com específicos comprimentos de ondas de luz que possibilita acelerada velocidade na obtenção de dados e facilmente sua caracterização por meio de espectroscopia por ultravioleta visível (UV/Vis). A técnica de espectroscopia por UV-Vis apresenta diferentes bandas características nas absorções no espectro eletromagnético que se devem à Ressonância Plasmônica de Superfície (RPS) das AgNPs formadas em consequência das cores características observadas durante a síntese. Tais medidas espectrofotométricas de absorção são

frequentemente visualizadas nas faixas de comprimentos de onda de 400 a 450 nm, o que confirma a síntese das AgNPs (PRABA *et al.*, 2015).

Enquanto a dispersão de luz dinâmica (DLS) é usada para medir o diâmetro de diferentes tipos de partículas dispersas em um meio líquido. O tamanho da partícula pode influenciar nas propriedades importantes do material, como reatividade, velocidade de dissolução e estabilidade da dispersão coloidal (RAMOS, 2017). Segundo Misono (2019) a técnica de DLS usa o princípio do movimento browniano, no qual as partículas dispersas em uma amostra estão constantemente se movendo. O movimento browniano depende da velocidade do tamanho da partícula. As medidas de tamanho de Diâmetro Hidrodinâmico (HD), Índice de Polidispersividade (PDI) e Potencial Zeta (PZ) das partículas são parâmetros indicativos de estabilidade das AgNPs em suspensão (MELO *et al.*, 2010).

O PDI mostra a distribuição do tamanho das AgNPs dentro de uma determinada amostra. Sendo que o resultado numérico de PDI varia de 0,0 (para uma amostra corretamente uniforme em relação ao tamanho da partícula) a 1,0 (para uma amostra que indica alta polidispersividade com variação de diversos tamanhos de partículas). Valores de 0,2 e abaixo são considerados aceitáveis na prática para materiais nanoparticulados, pois são considerados bons indicadores de estabilidade para as suspensões coloidais (CLARKE, 2013; DANAEI *et al.*, 2018; MOHANRAJ *et al.*, 2006).

O PZ indica a estabilidade das AgNPs em suspensão, no qual pode ser avaliada medindo o potencial eletrostático próximo à superfície de uma nanopartícula, que é derivado da medida da velocidade das partículas que se movem um campo elétrico aplicado, sendo que maiores valores de PZ promovem maior repulsão e, conseqüentemente, causa um aumento da estabilidade das AgNPs, ou seja, ocorre menos aglomeração (BHATTACHARJEE, 2015; CHAKRABORTY; PANIGRAHI, 2020). Nas leituras de PZ, valores superiores a  $\pm 30$  mV estão relacionados à alta estabilidade, enquanto resultados de AgNPs com valores com PZ menores que  $\pm 30$  mV indicam condições instáveis, possibilitando a formação de agregação de partículas coloidais (CHAKRABORTY; PANIGRAHI, 2020; MISIRLI *et al.*, 2022; SILVA, 2017).

A espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) mensura a intensidade do infravermelho em relação ao comprimento de onda da luz, o que resulta na determinação de grupos químicos. Além disso, a análise FTIR é feita para identificar as possíveis biomoléculas redutoras dos íons  $\text{Ag}^+$ . Dado isso, o espectro fornece evidências suficientes para o envolvimento de fitoquímicos na estabilização das nanopartículas (BHATTACHARYYA *et al.*, 2015).

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) caracteriza o quantitativo de medidas de tamanho, distribuição e morfologia das nanoestruturas. Essa técnica resulta em uma imagem bidimensional, sendo ampliada e focada para análise, logo, permitem a visualização de partículas individuais e promove uma melhor resolução espacial de amostras para análise (LIN *et al.*, 2014).

### **3.9 Atividade antimicrobiana de nanopartícula de prata**

Segundo Khezerlou *et al.* (2018) as AgNPs têm a capacidade de interagir com a membrana celular das bactérias, levando a inativação do processo de replicação do DNA e geração de espécies reativas de oxigênio, assim, ocasionando a inibição de funções enzimáticas do microrganismo. Dessa forma, a aquisição de resistência às AgNPs pelas bactérias acaba sendo muito difícil, pois as AgNPs apresentam um mecanismo especializado para adentrar e inibir os microrganismos (FERNANDO *et al.*, 2018).

O uso de antibióticos à base de AgNPs tem exibido um melhor efeito terapêutico do que os fármacos convencionais, pois possibilitam a entrega focalizada do fármaco nos vários sítios de infecção e promovem a abertura da membrana e, conseqüentemente, ocasionam a morte dos microrganismos. As AgNPs atravessam a parede celular e a membrana citoplasmática dos patógenos e assim conseguem prejudicar o processo de replicação do DNA (KHEZERLOU *et al.*, 2018; OMOLO *et al.*, 2017; PATRA *et al.*, 2018; THOMAS *et al.*, (2014).

Apesar da capacidade antibacteriana das AgNPs diversas pesquisas têm sido realizadas para avaliar os possíveis efeitos adversos que podem ser ocasionados pela exposição às AgNPs em células dos seres vivos. Dessa forma, esse efeito celular está relacionado com o tamanho, revestimento e dosagem das AgNPs, que se refletem nos efeitos citotóxicos. Vale ressaltar que os efeitos citotóxicos são vistos em nanopartículas menores, pois é provável que elas penetrem e liberem maiores concentrações de íons de prata no meio intracelular, além disso, altas dosagens podem influenciar em efeitos toxicológicos (BRUNA *et al.*, 2021).

A atividade antimicrobiana das AgNPs depende do tipo de material empregado, revestimentos de superfícies, carga elétrica, tamanho e morfologia e outros. Sendo que o uso dessas composições possibilita ação contra diversas bactérias e para diferentes atividades terapêuticas (HOSEINZADEH *et al.*, 2017; SRIDHARAN *et al.*, 2013). As AgNPs possuem um tamanho diminuído e uma ampla área superficial em relação ao volume, o que possibilita uma maior atividade antimicrobiana quando comparada aos antibióticos convencionais, pois

combatem a resistência bacteriana de forma significativa (HOSEINZADEH *et al.*, 2017; KHEZERLOU *et al.*, 2018).

As AgNPs em sua maioria são mais eficazes contra as bactérias Gram-negativas como *P. aeruginosa* e *E. coli* do que contra a *S. aureus*, por exemplo. Essa menor susceptibilidade é explicada devido que as paredes celulares das bactérias Gram-positivas serem mais espessas, devido ao peptidoglicano, o que dificulta a passagem de AgNPs para o interior da célula do microrganismo (RAI *et al.*, 2012; GURUNATHAN *et al.*, 2014). No entanto, Zhao *et al.* (2018) relatam que diversas pesquisas têm demonstrado a capacidade antimicrobiana das AgNPs tanto contra as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Como evidenciado no estudo de Aldayel *et al.* (2022), que citaram que a eficácia das AgNPs contra a bactéria *E. coli*, *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram satisfatórias. Além disso, vários estudos comprovaram uma adequada atividade antimicrobiana das AgNPs por meio da síntese verde contra bactérias Gram-positivas, especialmente nas cepas de *S. aureus* e torna-se uma perspectiva de tratamento para infecções causadas por tais cepas resistentes (BRITO *et al.*, 2022; VIANA *et al.*, 2021).

Um estudo recente de Al-brahim; Mohammed (2020) com AgNPs sintetizadas utilizando méis mostrou a inibição no crescimento de bactérias resistentes à meticilina *S. aureus* além de *E. coli* e *P. aeruginosa*, sendo confirmada a degradação da parede celular microbiana. Dessa forma, as AgNPs apresentam atividade antimicrobiana e atuam na prevenção da formação de biofilmes bacterianos e promovem uma função essencial no reparo tecidual de feridas cutâneas (MATHUR *et al.*, 2018).

### **3.10 Processo de reparo tecidual**

Uma ferida ocorre devido à interrupção da continuação de um tecido corpóreo, podendo ser uma área pequena ou grande, ocasionada por algum tipo de trauma mecânico, físico, químico ou em consequência de um acometimento clínico, como complicações patológicas, sendo que as feridas podem se curar de primeira intenção ou segunda intenção, sendo que esta última envolve a cicatrização e contração de feridas maiores e pode levar até à ocorrências de fibrose do tecido, causando perda de tecido e danos funcionais dos mesmos (ARAÚJO *et al.*, 2015; KUMAR e FAUSTO, 2008).

O reparo tecidual promove a restauração da integridade física interna e externa das estruturas do corpo e inclui complexas comunicações entre as células, sendo um método de cicatrização que envolve a matriz extracelular (MEC), as citocinas, as células sanguíneas e os

fatores de crescimento. A cicatrização de feridas cutâneas é um processo dinâmico essencial que compreende basicamente três eventos: inflamação, proliferação (granulação e contração) e remodelação tecidual (CHEN *et al.*, 2019; OJEH *et al.*, 2015; SENGUPTA *et al.*, 2015). Segundo Oryan e Alemzadeh (2017) essas fases ocorrem em um momento específico, porém diversos fatores, como tipo de ferida, gravidade e tratamento da ferida podem afetar todas as fases da cicatrização, assim ocasionando o atraso na cicatrização. O desenvolvimento da cicatrização se inicia após a lesão, ocorrendo primeiramente o processo da hemostasia ou coagulação, sendo que nesse momento ocorre a agregação de plaquetas e vasoconstrição, ou seja, ocorre a cascata de coagulação por meio da construção de um tampão de fibrinas. Esse tampão serve como um apoio para a migração de células como os neutrófilos, monócitos e células endoteliais ingressarem na ferida (KORDESTANI, 2019; TEJIRAM *et al.*, 2016).

Segundo Ojeh *et al.* (2015) durante a fase inflamatória, que é caracterizada pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, ocorre a migração celular, onde as citocinas e os fatores de crescimento atuam como mediadores inflamatórios e desempenham um papel importante na proliferação vascular e na remodelação tecidual. Nessa fase, determinadas substâncias quimiotáticas e os microrganismos excitam a migração de neutrófilos para a ferida. Essas células são as primeiras a migrar e são responsáveis por promover a limpeza da ferida, por meio da fagocitose de patógenos e de restos teciduais por meio da produção de radicais livres como o óxido nítrico (NO) e enzimas proteolíticas que ajudam na destruição de microrganismos. Após isso ocorre a migração dos macrófagos que são ativados na fase de proliferação e que também tem a função de fagocitar bactérias e resquícios teciduais, além disso, liberam reguladores biológicos para promover o processo normal da cicatrização e essas células liberam fator de crescimento derivado de macrófagos (MDGF) para células endoteliais e fibroblastos (KIM *et al.*, 2019; TSOURDI *et al.*, 2013).

Segundo Curtis *et al.* (2014) os mediadores químicos são conhecidos por estarem de forma ativa envolvidos na cicatrização de feridas em todos os três estágios. Entre essas substâncias mediadoras está o fator transformador de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), que possui atividade quimiotática sobre os macrófagos, queratinócitos e fibroblastos (KHAN; MARSHALL, 2016). Durante a fase de proliferação ocorre o acionamento de fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais que são ativados para fazer a síntese do novo tecido e promover o aumento da contração da ferida. No início, a MEC é sintetizada para proteger a barreira epidérmica. Os fibroblastos são as principais células abrangida com o tecido de granulação, que é abundante em colágeno III e que é gradativamente trocado pelo colágeno I

por ser mais resistente, percebido na fase de remodelação (KRISHNASWAMY *et al.*, 2014; SU; RICHMOND, 2015).

Ainda nessa fase proliferativa, forma-se um tecido conjuntivo pouco diferenciado e muito vascularizado chamado de “tecido de granulação” que é formado por componentes celulares e fibrilares conectados em uma matriz aparentemente sem forma definida. As células do tecido de granulação consistem em fibroblastos, responsáveis pelo processo de síntese do componente fibrilar, por miofibroblastos responsáveis pela ação da contração da ferida, além disso, é constituída por células endoteliais, encarregadas pelo método de neoangiogênese (ALHAJJ, 2020). Também ocorre de forma simultânea com o processo de proliferação o mecanismo de epitelização, com o deslocamento de células epiteliais para cobrir o tecido de granulação, criando uma barreira celular contra patógenos. A reepitelização é caracterizada pela proliferação e migração dos queratinócitos no sentido do núcleo da ferida, sendo preenchida por tecido de granulação entre área do fundo e as bordas da ferida, ou seja, os queratinócitos residentes nas bordas da lesão, migram e proliferam (KIM *et al.*, 2019; TEJIRAM *et al.*, 2016). Dado isso, a fase proliferativa promove a redução do dano tecidual por contração da ferida por miofibroblastos e atividade de fibroplasia. Nesta etapa, os mecanismos de angiogênese e reepitelização são bastante percebidos (GONZALEZ *et al.*, 2016).

A fase de remodelação é caracterizada como última etapa do processo de cicatrização e pode durar um tempo maior de semanas a até meses. Nessa etapa, acontece a maturação e rearranjo de forma organizada do colágeno e da MEC, onde o tecido cicatrizado fica mais rígido, ganhando até uma percentagem de 80% de resistência à tração da pele normal (KORDESTANI, 2019). Com o passar do tempo, os fios de colágeno tipo III são reabsorvidos e depois é produzido um colágeno tipo I com característica mais espessa, sendo organizado no transcórder das linhas de tensão. Estas mudanças provocam na ferida uma força tênsil aumentada. Os fibroblastos e os leucócitos liberam colagenases que promovem a destruição da matriz antiga sendo que a cicatrização tem resultado satisfatório quando ocorre o balanceamento entre a síntese da nova matriz e a destruição da matriz velha (ROY *et al.*, 2012).

O processo de cicatrização do tecido pode ser danificado por diversos fatores como como a idade, o estado nutricional (carência de vitamina C), a ocorrência de doenças de pré-existentes como anemia, hipotireoidismo, diabetes, anormalidades venosas, infecções e outros. Com isso torna-se necessário o uso de recursos alternativos que operem como apoio para auxiliar ou apressar o processo de cicatrização (EMING *et al.*, 2014; KARIMI *et al.*, 2017). De acordo com Hiro *et al.* (2012) a partir do grau de uma ferida, sendo aguda ou crônica, o cuidado é indispensável pois reduz a contaminação por meio de infecção bacteriana que pode causar

implicações para a saúde. Essas consequências podem ser locais ou podem ter influência de fatores sistêmicos que levam ao impacto local da cicatrização (GUO; DIPIETRO, 2010).

### **3.10.1 Nanopartículas de prata na cicatrização de feridas**

Segundo Bruna *et al.* (2021) atualmente existem cosméticos ou medicamentos com AgNPs como principal componente visando melhorar a cicatrização de forma aprimorada em acelerar a regeneração de um ferimento cutâneo, principalmente infectado, devido suas propriedades antibacterianas. A rápida regeneração do tecido acontece por meio da atividade das AgNPs sobre as citocinas pró-inflamatórias, ou seja, diminuindo o período de inflamação e, conseqüentemente, acelerando a remodelação do tecido lesado (KALANTARI *et al.*, 2020).

Segundo Vijayakumar *et al.* (2019) as AgNPs no reparo tecidual promovem a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos, assim possibilitando a migração e proliferação de queratinócitos e a contração da ferida de forma acelerada. Além disso, You *et al.* (2017) também descrevem que as AgNPs promoveram a migração de fibroblastos de forma rápida e ressaltam que as AgNPs com tamanho e concentração adequadas podem ativar macrófagos para modular a resposta inflamatória local. Vale ressaltar que as AgNPs possuem papel importante no controle microbiano, dessa forma, a resolução de uma ferida infectada é crucial para o sucesso do reparo da ferida, como por exemplo utilização de curativos contendo prata, acelerando o avanço da cicatrização da ferida (LIN *et al.*, 2016).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Local**

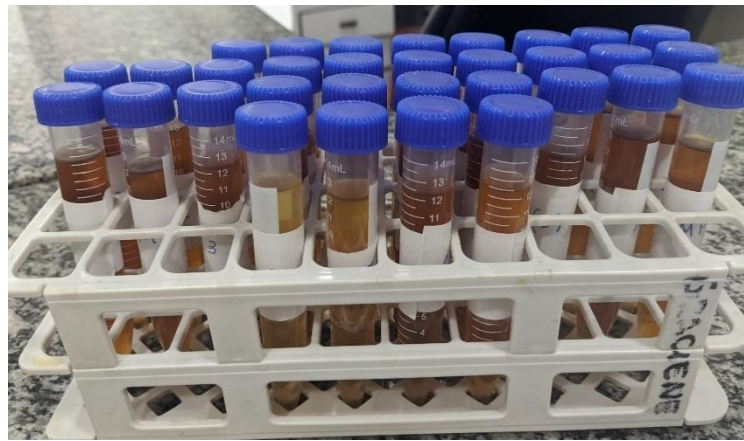
A pesquisa foi realizada no biotério da Universidade do Estado do Pará (UEPA) em Santarém – CAMPUS XII e também nos Laboratório de Estudos Bioquímicos e Químicos (LEBIQ) do Núcleo Tecnológico de Bioativos, Laboratório de Bacteriologia (LABAC), Laboratório de Fisiologia Vegetal e Crescimento de Plantas, Laboratório de Farmacologia, Laboratório Multiusuário de Análises Multifuncionais (LABAM) localizados na Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA). Houve também parceria com o Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília (IB/UnB).

## 4.2 Procedimentos da pesquisa

### 4.2.1 Obtenção dos méis de abelha sem ferrão

Foram analisadas 35 amostras de méis de abelha sem ferrão oriundas de diferentes propriedades rurais do Estado do Amazonas (Figura 1), tais amostras foram conservadas em temperatura de  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  e protegidas da luz.

**Figura 1** - Amostras dos méis de abelha sem ferrão.



Fonte: A autora (2024).

O material foi coletado no período de estiagem e de chuvas no Estado do Amazonas, entre os meses de março a outubro dos anos de 2020 e 2021. As amostras foram fornecidas pelos produtores que retiraram diretamente das caixas e acondicionaram em frascos de vidro, sendo doados para os pesquisadores dessa pesquisa e enviados para análise logo após a coleta. Essas amostras foram analisadas no LEBIQ/UFOPA. Na Tabela 1 são descritas as amostras e suas respectivas espécies identificadas pelos doadores, além disso, tiveram quatro amostras que receberam codificações que remetem aos nomes dos seus respectivos produtores e duas amostras identificadas com referência ao nome popular dos méis.

**Tabela 1** - Tipos de mel, espécies local e período de coleta dos méis.

| Amostra | Espécie                   | Local da coleta dos méis                 | Período da coleta |
|---------|---------------------------|--|-------------------|
| JAN 1   | <i>Melipona subnitida</i> | Boa Vista dos Ramos - AM                 | Setembro de 2020  |
| JAN 2   | <i>Melipona subnitida</i> | Boa Vista dos Ramos - AM                 | Setembro de 2020  |
| JAN 3   | <i>Melipona subnitida</i> | Boa Vista dos Ramos - AM                 | Setembro de 2020  |
| JAN 4   | <i>Melipona subnitida</i> | Boa Vista dos Ramos - AM                 | Setembro de 2020  |
| JAN 5   | <i>Melipona subnitida</i> | Puraquequara- AM                         | Setembro de 2020  |
| JAN 6   | <i>Melipona subnitida</i> | Instituto Federal do Amazonas (IFAM)- AM | Setembro de 2020  |

|       |  |                                    |                      |
|-------|--|------------------------------------|----------------------|
| JAN 7 | <i>Melipona subnitida</i>                | Autazes-AM                         | Outubro de 2020      |
| JAN 8 | <i>Melipona subnitida</i>                | Irاندوبا- AM                       | Outubro de 2020      |
| JUP 1 | <i>Melipona compressipes manaosensis</i> | Boa Vista dos Ramos - AM           | Setembro de 2020     |
| JUP 2 | <i>Melipona compressipes manaosensis</i> | Boa Vista dos Ramos - AM           | Setembro de 2020     |
| JUP 3 | <i>Melipona compressipes manaosensis</i> | Boa Vista dos Ramos - AM           | Setembro de 2020     |
| JUP 4 | <i>Melipona compressipes manaosensis</i> | Boa Vista dos Ramos - AM           | Setembro de 2020     |
| JUP 5 | <i>Melipona compressipes manaosensis</i> | Puraquequara- AM                   | Setembro de 2020     |
| JUP 6 | <i>Melipona compressipes manaosensis</i> | Instituto Federal do Amazonas - AM | Outubro de 2020      |
| JUP 7 | <i>Melipona compressipes manaosensis</i> | Autazes- AM                        | Outubro de 2020      |
| MFC 1 | <i>Melipona (Michmelia) seminigra</i>    | Tefé- AM                           | Março a maio de 2021 |
| MFC 2 | <i>Melipona (Michmelia) paraensis</i>    | Tefé- AM                           | Março a maio de 2021 |
| MFC 3 | <i>Melipona (Michmelia)</i>              | Tefé- AM                           | Março a maio de 2021 |
| MFC 4 | <i>Melipona (Michmelia) paraensis</i>    | Tefé- AM                           | Março a maio de 2021 |
| MFC 5 | <i>Melipona (Michmelia) paraensis</i>    | Tefé- AM                           | Março a maio de 2021 |
| MFD 1 | <i>Melipona (Michmelia) seminigra</i>    | Tefé- AM                           | Abril a maio de 2021 |
| MFD2  | <i>Melipona (Michmelia) seminigra</i>    | Tefé- AM                           | Abril a maio de 2021 |
| MFD 3 | <i>Melipona (Michmelia) seminigra</i>    | Tefé- AM                           | Abril a maio de 2021 |
| MFD 4 | <i>Melipona (Michmelia) seminigra</i>    | Tefé- AM                           | Abril a maio de 2021 |
| MFD 5 | <i>Melipona (Michmelia) seminigra</i>    | Tefé- AM                           | Abril a maio de 2021 |
| MJO 1 | <i>Cephalotrigona femorata</i>           | Tefé- AM                           | Abril de 2021        |
| MJO 2 | <i>Melipona (Michmelia) seminigra</i>    | Tefé- AM                           | Abril de 2021        |
| MJO 3 | <i>Melipona (Michmelia) seminigra</i>    | Tefé- AM                           | Abril de 2021        |
| MJO 4 | <i>Melipona (Michmelia) paraensis</i>    | Tefé- AM                           | Abril de 2021        |
| MJO 5 | <i>Melipona (Michmelia)</i>              | Tefé- AM                           | Abril de 2021        |
| MJE 1 | <i>Melipona (Michmelia) seminigra</i>    | Tefé- AM                           | Abril de 2021        |
| MJE 2 | <i>Melipona (Michmelia) seminigra</i>    | Tefé- AM                           | Abril de 2021        |
| MJE 3 | <i>Melipona (Michmelia)</i>              | Tefé- AM                           | Abril de 2021        |
| MJE 4 | <i>Melipona (Michmelia) seminigra</i>    | Tefé- AM                           | Abril de 2021        |
| MJE 5 | <i>Melipona (Michmelia) seminigra</i>    | Tefé- AM                           | Abril de 2021        |

Legenda: JAN: Jandaíra, JUP: Jupará.

Fonte: A autora (2024).

#### 4.2.2 Análise físico-química e bioquímica dos méis de abelha sem ferrão

As amostras dos méis de ASF foram sujeitas à análise de características físico-químicas e bioquímicas para avaliar se estavam dentro dos padrões de qualidade, isto é, de acordo com o regulamento técnico de identidade e qualidade do mel de abelhas (RTIQ) para os méis das espécies de ASF estabelecido pela portaria da Agência de Defesa Agropecuária e Florestal (ADAF) N° 253/2016 do Estado do Amazonas e também de acordo com o RTIQ da Portaria N°7554/2021, Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará (ADEPARÁ), além de comparar com outros trabalhos publicados realizados com méis de abelha sem ferrão.

As análises físico-químicas e bioquímicas realizados nos méis foram: pH, acidez livre ( $\text{mEqkg}^{-1}$ ), teor de açúcares redutores (%), umidade (%), teor de cinzas (%), teor de sólidos solúveis ( $^{\circ}\text{Brix}$ ), determinação da atividade antioxidante - ABTS ( $\text{mmolTE } 100\text{mg}^{-1}$ ), compostos fenólicos totais ( $\text{mgGA}100\text{g}^{-1}$ ), atividade antioxidante (% de Inibição DPPH) e poder antioxidante redutor de ferro - FRAP ( $\mu\text{molL}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{+2}$  em 10% de solução de mel). As amostras foram analisadas em triplicata em cada um dos procedimentos analíticos realizados.

##### 4.2.2.1 Análise de pH

O pH das amostras foi calculado de acordo com o método eletrométrico da pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (2005) com modificações. Foram diluídos 2 mL de mel em 18 mL de água deionizada. O pH foi mensurado com a utilização de um pHmetro (MS TecnoPON, modelo mPA 210, Piracicaba, Brasil), calibrado de acordo com fabricante.

##### 4.2.2.2 Teor de acidez livre

A análise da acidez livre das amostras dos méis foi executada pelo método da potenciometria de acordo com Brasil (2014). Foi realizada a neutralização da solução ácida do mel (10,0 g de mel dissolvidos em 75 mL de água destilada) usando uma solução de hidróxido de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e uma solução indicadora de fenolftaleína 1% até alcançar a cor rosa. O volume de hidróxido de sódio consumido na titulação foi registrado. O ajuste da solução de hidróxido de sódio ( $0,086 \text{ mol L}^{-1}$ ) foi realizado com a titulação de solução de biftalato de potássio ( $\text{C}_8\text{H}_5\text{HO}_4$ ) (0,50 g diluídos em 75 mL de água deionizada), foi adicionada 2 gotas da solução etanólica de fenolftaleína 1% (m/v) e o fator de correção foi aferido pela fórmula:

$$f = \frac{m}{0,2042 \cdot V \cdot N}$$

Sendo que as nomenclaturas significam:  $m$ : massa (g) de biftalato de potássio,  $V$ : volume (mL) da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação,  $N$ : concentração (normalidade) da solução de hidróxido de sódio utilizada.

O resultado foi descrito em  $\text{mEq/Kg}^{-1}$  por meio da expressão matemática:  $\text{mEq/Kg}^{-1} = V \times f \times 10$ , no qual as terminologias significam:  $V$ : volume de solução titulante gasto na titulação (mL),  $f$ : fator de correção da solução titulante.

#### 4.2.2.3 Teor de cinzas

Cerca de 2,0 g de mel foram mensurados em um recipiente tipo cadinho de porcelana e antecipadamente desidratado à 100 °C no decorrer de 4 h em estufa (NOVA ÉTICA, 402-3D, Vargem Grande do Sul, Brasil). Após voltar a temperatura ambiente, a massa das amostras foi quantificada e depois conduzida para incineração à 600 °C em fornalha tipo mufla (Jung, LF0612, Blumenau, Santa Catarina, Brasil) por 3 h. Depois de retornar à temperatura ambiente, realizou-se a mensuração da massa das cinzas em relação à massa úmida e massa seca dos méis analisados (AOAC, 2006).

#### 4.2.2.4 Teor de umidade

O teor de umidade foi verificado com base no método escolhido pelo Instituto Adolfo Lutz (2005), sendo feitas algumas modificações nos procedimentos. Assim, 2,0 g de mel foram pesadas e passou por aquecimento em uma estufa (NOVA ÉTICA, 402-3D, Vargem Grande do Sul, Brasil), à 60 °C até alcançar uma massa que ficou constante. Sendo que o teor de umidade foi calculado conforme a fórmula:

$$Umidade = 100 - \left[ \left( \frac{Massa\ seca}{Massa\ inicial} \right) * 100 \right]$$

#### 4.2.2.5 Teor de sólidos solúveis (°BRIX)

Os teores de sólidos solúveis (°Brix) dos méis foram mensurados por meio de leituras em refratômetro manual modelo RHB-90ATC (Megabrix, São Paulo, Brasil) de acordo com Yamamoto *et al.* (2010). A determinação é realizada de forma indireta e estabelece o índice de refração com a porcentagem de umidade no intervalo de 13% a 25%. Essa análise é feita a partir da inserção de uma gota da amostra de mel no refratômetro com o auxílio de um bastão, seguido do ajuste do foco e conversão da leitura da refração de acordo com a tabela de Chataway.

#### 4.2.2.6 Teor de açúcares redutores

O teor de açúcares redutores foi verificado por meio da utilização de 2 mL de solução de glicose liquiform (Labteste, Minas Gerais, Brasil) e 200 µL de solução aquosa de mel (1:2500 v/v). Depois de adicionado o mel, a mistura ficou em repouso por 30 min e em seguida a absorbância foi lida a 555 nm em espectrofotômetro UV/vis (Nova 3300, Piracicaba, São Paulo, Brasil). A mensuração foi feita usando uma curva de calibração externa com glicose (Synth, Rio de Janeiro, Brasil) nas concentrações: 0,0; 1,3; 2,5; 3,8 e 5,0 mg mL<sup>-1</sup> (GOMES *et al.*, 2017).

#### 4.2.2.7 Compostos fenólicos totais

A quantidade de compostos fenólicos totais em solução aquosa de mel foi estabelecida por meio do método de Folin-Ciocalteu e os resultados foram demonstrados em miligramas de ácido gálico por kg de mel (mgGA.100g<sup>-1</sup>). Primeiramente foi feita uma solução aquosa de mel (1:10 m/v) e desta foi usada uma alíquota de 0,5 mL misturada com 0,3 mL do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 2 mL de solução a 15% de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (m/v). Em seguida foi acrescentado água destilada até perfazer o volume final de 5 mL. A mistura ficou em repouso em temperatura ambiente por 2 h e logo após a absorbância foi mensurada a 798 nm. Como referência foi montada uma curva de calibração usando o ácido gálico em quantidades entre 7,0 x 10<sup>-4</sup> e 7,8 x 10<sup>-3</sup> mg mL<sup>-1</sup> (FERREIRA *et al.*, 2009).

#### 4.2.2.8 Atividade antioxidante (DPPH)

As amostras dos méis foram diluídas em água deionizada (1:5, v/v) e uma alíquota de 0,4 mL da solução foi colocada junto com 1,6 mL de etanol e 0,2 mL de solução 1,2 mmol L<sup>-1</sup> de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). As misturas foram colocadas durante 30 min em temperatura ambiente. Após, a absorbância foi lida a 555 nm no espectrofotômetro UV/Vis (NOVA 3300, Piracicaba, São Paulo, Brasil), com as misturas de referência foram preparadas de forma parecida, trocando a solução de DPPH por etanol. Como padrão foi usada uma curva de calibração com α-Tocoferol (vitamina E) em solução etanólica de 0,2 mmol L<sup>-1</sup>, em concentrações que variaram entre 0 e 2,50 mg L<sup>-1</sup> (ZHANG e HAMAUZU, 2004).

#### 4.2.2.9 Poder antioxidante redutor de ferro (FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power)

A atividade antioxidante do mel foi determinada segundo metodologia adaptada de Rufino *et al.* (2006). Esse método se baseia na capacidade do mel de reduzir o  $\text{Fe}^{3+}$  na forma do complexo 2,4,6-tri (2-piridil) - 1,3,5-triazina ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) a  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) em pH ácido. Primeiramente, uma alíquota de 400  $\mu\text{L}$  de uma solução de mel  $0.02 \text{ g mL}^{-1}$  foi adicionada a 3,6 mL de uma solução recém montada de reagente FRAP (2,5 mL de solução  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de TPTZ, 2,5 mL de solução  $20 \text{ mmol.L}^{-1}$  de  $\text{FeCl}_3$  e 25 mL de  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$  de tampão acetato, pH 3.6) e posteriormente a solução foi colocada em repouso por 60 min em temperatura ambiente. Após 60 min, a absorbância foi lida a 593 nm no espectrofotômetro UV/Vis (KASVI K37VIS, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Uma curva de calibração foi feita com soluções de  $\text{FeSO}_4$  ( $1 \text{ mol.L}^{-1}$ , com acréscimos de  $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$ ). Os resultados foram demonstrados como  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de  $\text{Fe}^{+2}$  em 10% de solução de mel (m/v).

#### 4.2.2.10 Determinação da atividade antioxidante (ABTS)

O ensaio ABTS foi realizado pelo método descrito por Sant'ana *et al.* (2012), onde 5 mL de solução estoque de ABTS ( $7 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foi misturada com 440  $\mu\text{L}$  de solução de persulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ )  $140 \text{ mmol L}^{-1}$ . A reação foi reservada em espaço escuro por 16 h e 2 mL desta solução foram então dissolvidos em etanol absoluto até atingir a absorbância de  $0,700 \pm 0,005$  a 734 nm. Após, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  da solução de mel ( $2 \text{ mg/mL}^{-1}$ ) com 5,0 mL do ABTS<sup>+</sup> de solução final. Depois de 6 min. em repouso, a absorbância da reação foi medida a 734 nm usando etanol absoluto como branco, com as leituras realizadas no escuro. Todas as reações foram feitas em triplicata. Os valores de absorbância obtidos foram plotados em uma curva Trolox (Sigma-Aldrich, Alemanha; 0 a  $2,4 \text{ mmol/L}$ ;  $Y = -26,37778 X + 0,65164$ ;  $R^2 = -0,9997$ ) e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$ .

### 4.2.3 Avaliação antimicrobiana dos méis de abelha sem ferrão in vitro

#### 4.2.3.1 Análise antimicrobiana em ensaio de difusão em poços

O método de ensaio de difusão em poços foi realizado por meio do protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Os inóculos utilizados foram cepas ATCC de bactérias: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25993) e *Escherichia coli* (ATCC 27853). Os inóculos foram

preparados por meio de suspensão direta do crescimento microbiano em Caldo Triptona Soja (TSB) com turvação equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL) sendo ajustada entre 0,08–0,13 de densidade óptica (D.O) a 600 nm em espectrofotômetro.

O ensaio de difusão em poços foi realizado com o auxílio de *swab* estéril, onde o inóculo microbiano foi semeado na superfície de uma placa de ágar Muller-Hinton, até alcançar um esfregaço uniforme. Após a secagem do inóculo, foram confeccionados poços com auxílio de molde com 6 mm de diâmetro que foram impregnados com 100 µL dos méis de ASF. Para fins de comparação e controle foram utilizados discos de antibióticos para cada cepa, que foram eritromicina (15 mg), cloranfenicol (30 mg), amoxicilina associado ao ácido clavulânico (30 mg), sendo todos da empresa Laborclin<sup>®</sup>. Os testes foram realizados em duplicata e as leituras foram realizadas após 24 h de incubação a 37°C, por meio da medição dos halos de inibição do crescimento em milímetros de diâmetro.

Sobre a escolha dos discos de antibiótico, de acordo com Boelsterli e Kashimshetty (2010), a amoxicilina associado ao ácido clavulânico é um antibiótico de amplo espectro mais comumente prescrito em todo o mundo, sendo ainda bem tolerada mesmo podendo ter possíveis efeitos adversos como complicações hepáticas. Esse fármaco inibe uma variedade de bactérias Gram-positivas, com determinada cobertura Gram-negativa, atuando no tratamento de infecções do trato urinário, sistema respiratório inferior, infecções de ouvido, nariz, garganta e outros (AKHAVAN *et al.*, 2023).

De acordo com Matter (2015), o cloranfenicol é um antimicrobiano de amplo espectro, com alta lipossolubilidade, que gera rápida absorção em quase todos os tecidos, promove a inibição da síntese de proteínas e é amplamente empregado para o tratamento de infecções advindas de meningite bacteriana, sendo também utilizado para tratar abscessos cerebrais principalmente quando o paciente tem alergia grave à penicilina. Um de seus efeitos adversos grave é a anemia aplástica e danos na medula óssea (SANGA e KHAREL, 2022).

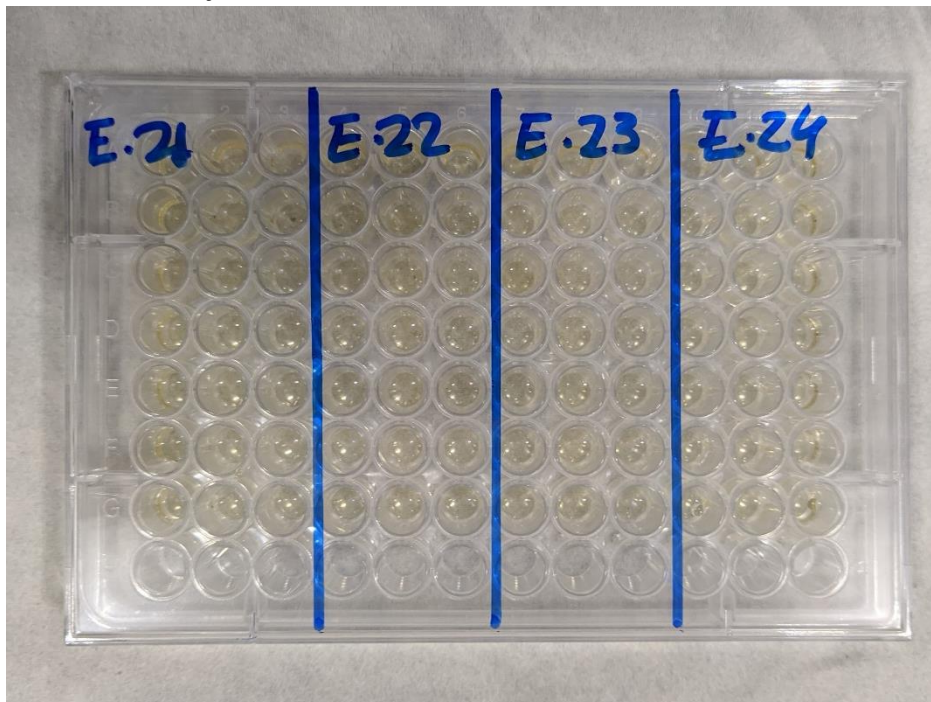
A eritromicina é habitualmente usada para diversas infecções respiratórias e previne contra a conjuntivite neonatal. Além disso, esse antibiótico é usado para o tratamento de infecções gastrointestinais, febre reumática, além de pele, tecidos moles e outras infecções. Esse medicamento possui efeitos colaterais como náusea, vômito, diarreia e interações acentuadas, sendo necessário uma indicação do profissional de saúde sobre sua indicação. (FARZAM *et al.*, 2023).

A utilização desses antibióticos citados acima é usada na prática clínica e com isso todos os profissionais de saúde devem entender o mecanismo, padrões de resistência, reações adversas de medicamentos e gerenciá-los (SHENOY *et al.*, 2019).

#### 4.2.3.2 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Foi utilizado o método de microdiluição em caldo, seguindo as normas da M07-A9 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). Em microplacas de 96 poços foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura caldo Brain Heart Infusion (BHI), previamente inoculado com uma suspensão bacteriana em solução salina estéril, obedecendo a escala 0,5 de McFarland, que corresponde a  $1,5 \times 10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ . O ajuste foi feito em espectrofotômetro (KASVI K37VIS, Piracicaba, São Paulo, Brasil), com o comprimento de onda a 600 nm e a leitura da absorbância entre 0,08 a 0,13. Cada poço da primeira linha foi preenchido com 150  $\mu\text{L}$  de inóculo bacteriano em BHI, e as demais linhas com 100  $\mu\text{L}$ . Na primeira linha, foi colocado 50  $\mu\text{L}$  dos méis na concentração de 1 g/mL, e depois a amostra foi diluída pipetando 100  $\mu\text{L}$  do primeiro poço para o segundo, do segundo para o terceiro, até o fim das linhas e teve um sobrenadante de 100  $\mu\text{L}$  na ponteira que foi para o descarte, ficando dessa forma 100  $\mu\text{L}$  de inóculo e de méis em cada placa (Figura 2). Para cada amostra dos méis foram feitos tratamentos em triplicata. A CIM foi determinada como a menor concentração do mel em mg/mL que inibiu o crescimento microbiano.

**Figura 2** - Placa de microdiluição contendo o inóculo e mel.



Fonte: A autora (2024).

#### 4.2.4 Síntese nanopartículas de prata através dos méis

A síntese das AgNPs foi adaptada da metodologia empregada por Czernel *et al.* (2021). A partir das análises dos dados dos testes microbiológicos, foram selecionados os méis das amostras JUP1 (*Melipona compressipes manaosensis*) e JUP2 (*Melipona compressipes manaosensis*) para a síntese das nanoestruturas. Inicialmente, foram preparadas soluções aquosas de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) (Sigma-Aldrich, Brasil) nas concentrações de 1, 3 e 5 mM e, em seguida, 3 mL de cada foram misturados com 2 mL das amostras de mel JUP1 e JUP2. Os tubos contendo as misturas reacionais foram cobertos com papel alumínio para evitar a oxidação da prata e evaporação do líquido durante a reação que aconteceu a partir da incubação em banho-maria (Centauro<sup>®</sup>) sob diferentes temperaturas (50°, 60°, 70° e 80 °C) a fim de avaliar o efeito dessa variável na mudança de coloração e provável formação das nanoestruturas ao longo de 60 min.

#### 4.2.5 Caracterização das nanopartículas de prata

##### 4.2.5.1 Espectroscopia de UV/Vis

As curvas de absorção das AgNPs sintetizadas pelos méis JUP1 e JUP2 foram avaliadas em um espectrofotômetro (Spectrophotometer<sup>®</sup> modelo Nova 3300 UV) na faixa entre 380 e 600 nm. Cada amostra foi diluída na proporção 1:10 (v/v) em água ultrapura e 2 mL foram colocados em uma cubeta de quartzo que em seguida foi inserida no equipamento e as análises aconteceram sob temperatura ambiente. A água destilada foi usada como branco.

##### 4.2.5.2 Propriedades coloidais (Espalhamento dinâmico de luz – DLS, potencial Zeta de superfície) e estabilidade das AgNPs ao longo do tempo

As propriedades coloidais de AgNPs foi mensurada utilizando a metodologia empregada por Lima *et al.* (2021), com algumas adaptações. O equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido) foi usado para medir o tamanho (diâmetro hidrodinâmico), o índice de polidispersividade (PdI) e o potencial Zeta de superfície (carga elétrica) das AgNPs sintetizadas via méis, no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (IB/UnB). As leituras foram realizadas após 30, 60, 90 e 120 dias da síntese inicial das nanoestruturas e consistiram na diluição 1:10 (v/v) das AgNPs em água ultrapura. Em seguida, essa mistura foi depositada em cubetas específicas e inseridas no equipamento onde, após 120 s de estabilização, foram realizadas 10 execuções em triplicata

com um ângulo de espalhamento de  $173^\circ$  e uma temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . Os resultados consistem no valor médio das três repetições  $\pm$  desvio padrão da média e os dados foram processados pelo software Zetasizer (versão 7.13), desenvolvido pelo mesmo fabricante do equipamento.

#### 4.2.5.3 Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os perfis de ligações/interações químicas dos grupamentos funcionais presentes na superfície das AgNPs foram analisados com o auxílio de um Espectrofotômetro de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) (Shimadzu, IR Prestige), no modo de reflectância total atenuada (ATR), na Central Analítica II da Rede Intregada de Desenvolvimento Humano (RIDH) da UFOPA. Foram realizadas 45 varreduras no intervalo de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $600\text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.2.5.4 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A caracterização morfológica das AgNPs foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM-1011, Japão) no Laboratório de Microscopia e Microanálise (LMM) do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (IB/UnB), sendo seguida a metodologia padrão desse laboratório, com modificações, para alcançar a forma de diluição de cada uma das suspensões de AgNPs. Para as análises no MET, as amostras foram diluídas na proporção de 1:100, 1:300 ou 1:400 (v/v) em água ultrapura a depender da amostra analisada e  $5\ \mu\text{L}$  de cada diluição foram pingados sobre uma telinha de cobre recoberta com filme de Formvar<sup>®</sup>. Após secagem por um período de 24 h sob temperatura ambiente as amostras foram observadas no microscópio e as imagens foram adquiridas de maneira aleatória.

#### 4.2.6 Ensaio de toxicidade

Para o ensaio *in vivo* foi utilizado como modelo animal ratas adultas da espécie *Rattus norvegicus albinus* da linhagem Wistar. Os ensaios toxicológicos foram realizados previamente ao ensaio de cicatrização para fins de segurança. Foram utilizadas 9 ratas com idade entre 8 e 12 semanas de vida com peso entre 160 e 250 g, provenientes do Biotério da UEPA, campus-Santarém. Tais ratas tiveram alojamento adequado, com temperatura ambiente da experimentação na faixa de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , foram alimentadas com ração comercial Purina<sup>®</sup> e água *ad libitum* e foi respeitado o ciclo claro e escuro de 12 h de intercalação.

#### 4.2.6.1 Toxicidade dérmica aguda

O teste de toxicidade dérmica foi adaptado de acordo com as normativas da OECD 402 (2017) que disponibiliza o procedimento metodológico de toxicidade cutânea em uma dose única para um estudo pré-clínico.

Foram utilizadas 9 ratas e feita a dosagem de 0,5 mL das AgNPs na concentração de 3 mM por animal das amostras sintetizadas a partir do mel de *Melipona compressipes manaosensis* JUP1 e JUP2, com 3 ratas para cada grupo. Foi usado também um grupo controle com 3 ratas recebendo solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% na dosagem de 0,5 mL.

Foram utilizados animais com pele íntegra e saudável. As ratas foram eleitas de forma aleatória para a pesquisa e identificadas para a análise. Em seguida, os pêlos das ratas foram removidos utilizando tosquia em uma máquina de cortar cabelo (Mondial®) da área dorsal com no mínimo 10% da área total da superfície do dorso corporal (Figura 3) e após foram colocadas as soluções-testes de AgNPs.

**Figura 3** - Tosquia da área dorsal do animal



Fonte: A autora (2024).

O procedimento de exposição às AgNPs sintetizadas a partir do mel de *Melipona compressipes manaosensis* das amostras JUP1 e JUP2 e ao controle com NaCl 0,9% foi feito de forma uniforme na área tricotomizada (Figura 4).

**Figura 4** - Colocação da AgNPs JUP1 na pele da área tricotomizada da região dorsal do animal.



Fonte: A autora (2024).

E após, as ratas foram colocadas em gaiolas individuais (Figura 5) até o término do experimento a fim de evitar a ingestão oral do produto e interferência de reações na pele por outros animais em gaiolas coletivas.

**Figura 5** - Acomodação das ratas em gaiolas individuais



Fonte: A autora (2024).

A substância foi mantida em contato com a pele com auxílio de uma gaze porosa e fita não irritativa (Figura 6) por um período de exposição de 24 horas, sendo que nos primeiros 30

min após a aplicação do produto houve uma atenção maior ao comportamento dos animais, sendo que essa vigilância se estendeu por 6 h depois da exposição às substâncias. Depois do período de 24 h, os resíduos dos produtos foram retirados com o uso de solução salina estéril (Figura 7) e as avaliações diárias da reação da pele foram feitas por 14 dias de forma individual e interpretadas de acordo com o sistema empregado pela *Federal Hazardous Substances Act (FHSA)* (2008) conforme a Tabela 2.

**Figura 6** - Substância em contato com a pele protegida com gases e fita não irritativa



Fonte: A autora (2024).

**Figura 7** - Limpeza da pele do animal com solução salina com auxílio de gases esterilizadas



Fonte: A autora (2024).

Além disso, foram observadas possíveis manifestações clínicas diariamente e registradas as possíveis alterações de pelagem, sistema respiratório, circulatório, autônomo, nervoso central, atividade somatomotora, padrão de comportamento, sinais de convulsões, tremores, excesso de saliva, evacuações frequentes, estado de sonolência, letargia, coma e dor.

Foi realizada a pesagem dos animais antes do procedimento, no 7º e no 14º dia antes da eutanásia.

Ao término dos 14 dias de observação, as ratas passaram por eutanásia de acordo com o Guia de eutanásia para animais de ensino e pesquisa da UNIFESP (FAVORETTO *et al.*, 2019), com uma superdose de injeção intraperitoneal, com aplicação de no mínimo 3 vezes a dose necessária dos anestésicos de Ketamina (90 mgkg<sup>-1</sup>) e Xilazina (10 mgkg<sup>-1</sup>). Posteriormente foi feita a necropsia macroscópica dos órgãos como a pele, coração, fígado, pulmão, rins, intestino delgado, intestino grosso, pâncreas e estômago, sendo que se fosse observada alguma anormalidade a avaliação histológica seria determinada. O parâmetro para analisar os órgãos na necropsia se embasou na comparação com os animais do grupo controle.

**Tabela 2** - Grau de reação da pele.

| <b>FORMAÇÃO DE ERITEMA E ESCARAS</b>   | <b>Grau</b> |
|--|-------------|
| Sem eritema  | 0           |
| Eritema muito leve (pouco perceptível)   | 1           |
| Eritema bem definido   | 2           |
| Eritema moderado a severo  | 3           |
| Eritema grave severo a formação de escaras                                     | 4           |
| <b>FORMAÇÃO DE EDEMA</b>   | <b>Grau</b> |
| Sem edema  | 0           |
| Edema muito leve (pouco perceptível)   | 1           |
| Edema leve (bordas bem definidas)  | 2           |
| Eritema moderado (aumento superior de aproximadamente 1mm)                     | 3           |
| Eritema severo (aumento superior a 1mm e estendendo além da área de exposição) | 4           |

Fonte: Modelo adaptado de Federal Hazardous Substances Act the USA (2008).

#### 4.2.6.2 Ensaio de irritação/corrosão ocular aguda *in vitro*

O teste da irritação ocular é primordial para produtos dermatológicos pois a substância produzida poderá alcançar acidentalmente os olhos do indivíduo. Já existem pesquisas que recomendam o emprego de métodos alternativos para determinar a irritabilidade dos olhos, como o teste de membrana cório-alantóide do ovo de galinha por meio do método de *Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane* (HET-CAM).

Para a avaliação do potencial de irritação/corrosão ocular foi selecionado o método *in vitro* do HET-CAM que possibilita o não uso de animais em experimentação e permite analisar na forma semiquantitativa a capacidade de irritação de produtos sobre a membrana cório-alantóide de ovo embrionado de galinha no décimo dia de incubação. Além disso, é um método simples de ser realizado e de baixo custo (MEHLING *et al.*, 2007).

Foram usados ovos embrionados de galinha (*Gallus gallus domesticus*) tirados no primeiro dia da fertilização que foram obtidos em uma granja situada no interior da cidade de Santarém-Pará. O peso médio dos ovos foi em torno de 40 – 60 gramas. O delineamento proposto foi de acordo com a ICCVAM (2010) e adaptações do estudo de Derouiche; Abddenour (2017).

Foram utilizados 3 ovos para cada grupo (total de 15 ovos). Os ovos foram colocados em uma incubadora com temperatura controlada de  $37 \pm 0,5$  °C, umidade relativa de 70% por 9 dias e, no décimo dia de incubação, os ovos foram abertos. Foi inserido 0,3 mL de solução fisiológica (0,9%) na membrana interna para hidratação por 30 min. Passado esse tempo, foi retirado de forma cuidadosa o excesso de soro fisiológico e, depois, foi extraída a membrana externa e exposta a membrana cório-alantóide (CAM). Após isso foi misturada sobre a CAM 300 µL da amostra testada em cada um dos ovos, de acordo com os grupos: NaCl 0,9% (controle negativo), hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N (controle positivo). Os grupos experimentais com as AgNPs sintetizadas a partir do mel de *Melipona compressipes manaosensis* das amostras JUP1 e JUP 2 e grupo solução de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ), para fins de comparação.

As análises observacionais duraram 5 min e nesse período foram analisados o comportamento dos vasos sanguíneos, além do tempo de aparição de um dos três pontos finais como lise vascular, hemorragia e a coagulação. Com a meta de assegurar resultados reprodutíveis e confiáveis para a avaliação dos possíveis aparecimentos dos pontos finais foi usado uma câmera de um *smartphone*. A avaliação teve como base o aparecimento de cada um dos três pontos de extremidade do HET-CAM em espaços de tempo fixos de 30 s, 2 min e 5 min (Derouiche; Abddenour, 2017). O tempo para analisar a lise, hemorragia e coagulação recebeu uma pontuação exata de acordo com o tempo em que cada episódio ocorreu, seguindo o esquema da Tabela 3. Posteriormente, as pontuações foram somadas para obter um valor numérico único por meio de uma escala que foi avaliada de 0 a 21, demonstrada na Tabela 4, onde foi verificada a capacidade de irritação das formulações testadas. Com os resultados obtidos, determinou-se uma média (entre 0 e 21), de acordo com a indicação de irritação (lise, hemorragia e coagulação) e não-irritante (Tabela 3).

**Tabela 3** - Esquema de pontuação para testes de irritação com o método de teste.

| Efeitos    | Pontuação    |             |             |
|------------|--------------|-------------|-------------|
|            | 0,5min (30s) | 2min (120s) | 5min (300s) |
| Lise       | 5            | 3           | 1           |
| Hemorragia | 7            | 5           | 3           |
| Coagulação | 9            | 7           | 5           |

Fonte: ICCVAM (2010) e adaptado por Derouiche e Abddenour (2017).

**Tabela 4** - Categoria de irritação de acordo com a faixa de pontuação do HET-CAM.

| Faixa de pontuação | Categoria de irritação |
|--------------------|------------------------|
| 0 a 0,9            | Não rotulado           |
| 1 a 4,9            | Ligeira irritação      |
| 5 a 8,9            | Irritação moderada     |
| 9 a 21             | Irritação grave        |

Fonte: ICCVAM (2010) e adaptado por Derouiche e Abddenour (2017).

#### 4.2.7 Ensaio de cicatrização

O ensaio foi constituído por 60 ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus* da linhagem Wistar, machos, adultos, com idade superior a 90 dias e peso padrão entre 250 g e 300 g. Os ratos foram provenientes do Biotério da UEPA, Campus- Santarém.

Os animais passaram por um período de observação e manejo até alcançarem a idade e peso ideal para o início de qualquer estudo científico e até o final do experimento foram mantidos com condições ambientais controladas: 12 h de ciclo claro-escuro, ambiente higienizado, temperatura de  $22 \pm 2$  °C, ventilação adequada, acesso livre para água *ad libitum* e ração comercial Purina®. Tais recomendações foram seguidas de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2016).

No decorrer do estudo os animais foram acomodados em gaiolas de polipropileno com dimensão de 41cm x 34cm x 16cm, acolchoada com maravalha, abrigando cinco ratos em cada um destes espaço no ambiente de alojamento no período de manejo. Após o ato operatório, os animais foram mantidos em gaiolas individuais, pois em caso de cirurgia experimental o isolamento do animal é aconselhado (VAN LOO *et al.*, 2007).

##### 4.2.7.1 Grupos de animais para o ensaio da cicatrização

Os animais foram alocados aleatoriamente em 6 grupos de 10 animais, sendo assim composto por:

1. Grupo GMJUP1 (tratamento com o mel de abelha sem ferrão de *Melipona compressipes manaosensis*);
2. Grupo GMJUP2 (tratamento com o mel de abelha sem ferrão de *Melipona compressipes manaosensis*);
3. Grupo GNJUP1 (tratamento com AgNPs sintetizadas a partir do mel de abelha sem ferrão de *Melipona compressipes manaosensis*);

4. Grupo GNJUP2 (tratamento com AgNPs sintetizadas a partir do mel de abelha sem ferrão de *Melipona compressipes manaosensis*);
5. Grupo GCS (tratamento com solução fisiológica de NaCl a 0,9%, caracterizado com o controle negativo);
6. Grupo GCP (tratamento com pomada Sulfato de Neomicina 3,5 mg/g, caracterizado com o controle positivo).

Cada grupo foi dividido em 2 subgrupos de 5 animais cada, nomeados de acordo com o período de acompanhamento, totalizando assim 12 subgrupos de cinco animais: sendo 8 subgrupos experimentais e 4 subgrupos controles, totalizando 60 ratos. Dessa forma, os animais foram acompanhados por diferentes períodos, de acordo com a data de eutanásia pré-estabelecida de cada subgrupo, em 7 e 14 dias após o início do tratamento, sendo esses os dias totais de aplicação dos tratamentos e acompanhamento da pesquisa, de acordo com o esquema da Tabela 5, a seguir:

**Tabela 5** - Detalhamento dos subgrupos de animais definidos.

| Número dos subgrupos | Nomenclatura dos grupos | Aplicações dos produtos                               | Número de dias observações |
|----------------------|-------------------------|---|----------------------------|
| 1                    | GMJUP1-7                | Mel de <i>Melipona compressipes manaosensis</i>       | 7 dias                     |
| 2                    | GMJUP1-14               | Mel de <i>Melipona compressipes manaosensis</i>       | 14 dias                    |
| 3                    | GMJUP2-7                | Mel de <i>Melipona compressipes manaosensis</i>       | 7 dias                     |
| 4                    | GMJUP2-14               | Mel de <i>Melipona compressipes manaosensis</i>       | 14 dias                    |
| 5                    | GNJUP1-7                | AgNPs de mel <i>Melipona compressipes manaosensis</i> | 7 dias                     |
| 6                    | GNJUP1-14               | AgNPs de mel <i>Melipona compressipes manaosensis</i> | 14 dias                    |
| 7                    | GNJUP2-7                | AgNPs de mel <i>Melipona compressipes manaosensis</i> | 7 dias                     |
| 8                    | GMJUP2-14               | AgNPs de mel <i>Melipona compressipes manaosensis</i> | 14 dias                    |
| 9                    | GCS-7                   | Solução fisiológica de NaCl 0,9%                      | 7 dias                     |
| 10                   | GCS-14                  | Solução fisiológica de NaCl 0,9%                      | 14 dias                    |
| 11                   | GCP-7                   | Sulfato de Neomicina 3,5 mg/g                         | 7 dias                     |
| 12                   | GCP-14                  | Sulfato de Neomicina 3,5 mg/g                         | 14 dias                    |

Legenda: GMJUP1: Grupo Mel Jupará amostra 1, GMJUP2: Grupo Mel Jupará amostra 2, GNJUP1: Grupo Nanopartícula com Jupará amostra 1, GNJUP2: Grupo Nanopartícula com Jupará amostra 2, GCS: Grupo Controle Soro fisiológico, GCP: Grupo Controle Positivo, NaCl: cloreto de sódio, mg: Miligrama, g: grama, AgNPs: Nanopartícula de prata.

Fonte: A autora (2024).

O número estipulado de animais de cada subgrupo seguiu as diretrizes da CONCEA (2016) pois um número reduzido de animais por alojamento deve ser condizente com a manutenção das condições sociais e ambientais da gaiola.

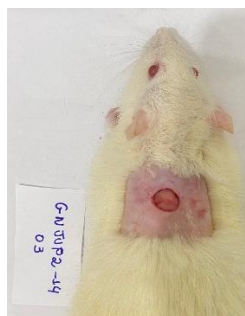
Foi usado no ensaio *in vivo* como controle positivo o sulfato de neomicina pois segundo Nitanan *et al.* (2013) essa substância de uso tópico é um antibiótico aminoglicosídeo de amplo espectro que tem sido usado topicamente na pele, ajuda na cicatrização de feridas e pode ser usado em mucosas. Esse medicamento inibe o crescimento principalmente de uma variedade de bactérias Gram-negativas e algumas bactérias Gram-positivas, além de inibir patógenos fúngicos. Essa pomada é habitualmente usada topicamente em feridas cutâneas inibindo bactérias como *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* e outros *Staphylococcus spp.* (MEHAR *et al.*, 2014).

#### 4.2.7.2 Anestesia e ato operatório dos animais

Essa etapa consistiu na pesquisa experimental com os ratos para o tratamento das feridas infectadas. A anestesia e ato operatório foram feitos por profissionais treinados e capacitados para realizar os procedimentos de administração das substâncias e a indução das feridas (CONCEA, 2016).

Os ratos foram submetidos à anestesia utilizando o método de injeção intraperitoneal de cloridrato de Ketamina 90 mgkg<sup>-1</sup> e foi usado o relaxante muscular cloridrato de Xilazina 10 mgkg<sup>-1</sup> por via de injeção intraperitoneal. Após a anestesia, os animais foram posicionados em decúbito ventral por meio de uma prancha operatória, foi feita a depilação da região dorsocostais e depois os animais foram submetidos a lesões cutâneas de ato cirúrgico único, no qual estiveram sob efeito anestésico e foi utilizado um *punch* metálico de 8 mm<sup>2</sup> (Figura 8). Esse perfuro contém uma lâmina cortante nas suas bordas que faz a retirada da pele e exposição a fáscia da musculatura dorsal (GARROS *et al.*, 2006).

**Figura 8** - Lesão cutânea realizada após anestesia no animal do grupo GNJUP2-14.



Fonte: A autora (2024).

#### 4.2.7.3 Pós-operatório

Após a realização do ato cirúrgico os animais foram colocados em gaiolas individuais, além de serem colhidas de imediato, com *swabs* estéreis, amostras das feridas de todos os animais dos grupos da pesquisa. Logo em seguida, todos os ratos foram infectados com 0,5 mL da suspensão ajustada a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL<sup>-1</sup> de *Staphylococcus aureus* (Figura 9) por animal e após foram devolvidos para as gaiolas individuais com as devidas etiquetas de identificação dos subgrupos. O ato da infecção foi realizado com o uso do método de gotejamento sob a área lesada utilizando uma pipeta *Pasteur* descartável de 3 mL, assim como no trabalho de Silva (2004), que utilizou a mesma técnica de gotejamento nas feridas.

**Figura 9** - Infecção da ferida com *S. aureus* após ato operatório no animal do grupo GCP-7.



Fonte: A autora (2024).

A escolha para a infecção do ensaio *in vivo* foi da bactéria Gram-positiva *S. aureus* que integra a microbiota dos seres humanos e é encontrada principalmente na pele e nas fossas nasais. Ela pode entrar no tecido lesionado e causar danos locais e até mesmo complicações sistêmicas graves. A infecção por esse microrganismo é comum tanto em ambientes comunitários quanto hospitalares (AQUINO; DA SILVA, 2022; TAYLOR; UNAKAL, 2023).

Após aproximadamente 36 h da indução da infecção foi realizada a coleta do *swab* estéril das feridas, em seguida foi realizado o tratamento de forma simultânea com a colocação de 200 µL (equivale a 4 gotas) das amostras de cada grupo da pesquisa, como visto na Figura 10. Esse procedimento se repetiu diariamente durante 7 e 14 dias, conforme cada subgrupo de eutanásia estabelecida, de acordo com a Tabela 5.

**Figura 10** - Tratamento diário da ferida com o mel do GMJUP2.



Fonte: A autora (2024).

#### 4.2.7.4 Coleta dos swabs da ferida e avaliação microbiológica

Para a análise microbiológica foram coletados *swabs* das feridas operatórias, isto é, após o ato cirúrgico e foram colhidos *swabs* após aproximadamente 36 h da indução da infecção e início ao tratamento, uma vez que esse é o período em que se espera ter um crescimento microbiano suficiente para desencadear uma infecção nos animais. Além disso, foram coletados novos *swabs* após 72 h do início do tratamento, no 7° e no 14° dia antes da eutanásia dos animais, de acordo com os grupos de acompanhamento (Figura 11).

**Figura 11** - Coleta de *swab* após o ato operatório e após foi armazenado em tubo de solução salina estéril.



Fonte: A autora (2024).

Os *swabs* estéreis foram colocados em tubos contendo solução salina estéril (NaCl a 0,85%) e foram enviados no mesmo dia ao Laboratório de Bacteriologia (LABAC) onde 100  $\mu$ L foram semeados sobre a superfície das placas de Petri estéreis (90 x 15mm) contendo Ágar Baird Parker (BPA - Kasvi®) utilizando-se o método *Spread Plate*. As placas foram incubadas e invertidas a uma temperatura de 37 °C por 24 h e após esse período foi feita a observação para

Contagem Padrão de Placa (CPP). O método de análise foi qualitativo e foi observado o crescimento de *S. aureus*.

#### 4.2.7.5 Avaliação macroscópica

Foi feita a avaliação morfométrica da área da ferida por meio de registros fotográficos, sendo que a medição das feridas foi realizada pelo aplicativo gratuito imitoMeasure<sup>®</sup>. Na intenção de ter um padrão das capturas das imagens fotográficas, o *smartphone* foi posicionado e mantido em um tripé com distância de 15 a 20 cm de altura de distância e paralelo à ferida. Próximo a lesão foi posicionado um marcador de calibração adesiva no intuito de calibrar a captura da imagem, na qual serviu como referência para a calibração das medidas das lesões, que foram obtidas pelo aplicativo de análise imitoMeasure<sup>®</sup> (Figura 12) que expressou a área da lesão em centímetros quadrados (YOUNIS *et al.*, 2022).

**Figura 12** - Captura da área total da ferida de um animal do grupo GNJUP2-14 com auxílio do calibrador digital



Fonte: A autora (2024).

Com o uso do aplicativo imitoMeasure<sup>®</sup> e o adesivo de calibração, as bordas das feridas foram delineadas manualmente com o dedo indicador na tela do dispositivo, sendo que as medidas de comprimento, largura e área de superfície foram calculadas automaticamente (DO KHAC *et al.*, 2021). As imagens foram capturadas de todos os grupos no primeiro dia após ferimento cirúrgico e após três, sete e no décimo quarto dia de tratamento de acordo com o subgrupo de eutanásia.

O uso de aplicativos para a mensuração macroscópica de lesões, atualmente, é bastante empregado em pesquisas para a verificação morfométrica de feridas cutâneas, pois promove alta portabilidade e mobilidade. Adicionalmente, o imitoMeasure<sup>®</sup> e outros aplicativos

dedicados a *smartphones* surgiram para tornar a medição de feridas e documentação mais fácil, barata, útil e são notadamente atraentes para aplicações clínicas (BIAGIONI *et al.*, 2021).

#### 4.2.7.6 Eutanásia dos animais

O procedimento da eutanásia ocorreu no 7º e no 14º dia de acordo com os subgrupos de animais, seguindo as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2016). A via de administração dos fármacos foi pelo método de injeção intraperitoneal, com aplicação de no mínimo 3 vezes a dose necessária dos anestésicos de Ketamina ( $90 \text{ mgkg}^{-1}$ ) e Xilazina ( $10 \text{ mgkg}^{-1}$ ), caracterizando uma superdose, de acordo com o Guia de eutanásia para animais de ensino e pesquisa da UNIFESP (FAVORETTO *et al.*, 2019). A detecção da morte dos animais foi realizada por meio da avaliação cardiorrespiratória utilizando um estetoscópio para verificar ausência da respiração e dos batimentos cardíacos (CONCEA, 2016).

Depois da confirmação do óbito dos animais, estes foram colocados na mesa cirúrgica para retirada da amostra de pele que compreendeu uma área de 3 cm x 3 cm no local da lesão. Os fragmentos foram colocados em potes coletores universais cobertos por uma solução de formalina a 10% tamponada, sendo feito sua lavagem após 24 h com álcool 50% para retirar a formalina e armazenado em álcool 70º e enviados para o Laboratório Multiusuário de Análises Multifuncionais (LABAM), onde foram confeccionadas as lâminas com lamínulas de vidro para análise histológica.

Ao término das coletas dos fragmentos cutâneos, ocorreu o descarte das carcaças dos animais, sendo respeitada a Política Nacional de Resíduos Sólidos da Lei nº 12.305/10 de 02/08/2010. Além disso, seguiu-se as recomendações da normativa do CONCEA (2016), que orienta que os animais infectados por substâncias químicas tenham um destino adequado.

#### 4.2.7.7 Avaliação microscópica

Para cada amostra dos tecidos foram realizados cortes que posteriormente foram corados em Hematoxilina-Eosina e Picrosirius Red<sup>®</sup>, desse modo, foram confeccionadas 120 lâminas e identificadas com lápis demográfico.

A confecção das lâminas seguiu o manual de Técnica Histológica de Rotina e de Colorações do estudo de Santos *et al.* (2021). Primeiramente os tecidos passaram pela técnica histológica com a seguinte sequência: fixação dos tecidos, inclusão, microtomia e coloração das lâminas. Então, após a fixação do formol nos tecidos que durou 24 h, eles foram lavados

com álcool 50° e armazenados em álcool 70°. A fase da inclusão ocorreu por meio da colocação de parafina líquida no exterior dos tecidos que foram colocados no molde de metal. Nessa fase o tecido foi deixado com a superfície de modo clivada para ser cortada em um molde para inclusão do fragmento e depois foi coberto com o cassete. Sendo que depois do resfriamento, o material incluído foi obtido por meio dos blocos de parafina. A etapa da microtomia promoveu cortes finos com espessura de 5 µm e foi feita por meio da utilização do equipamento micrótomo (Leipzig®). Para realizar a microtomia foi utilizado uma pinça para promover a distensão dos cortes em banho-maria à uma temperatura entre 40 a 50 °C. Em seguida, os cortes foram pescados em lâminas estéreis, no qual foram identificadas e levadas à estufa com temperatura de 40° C por um período mínimo de 1 h (SANTOS *et al.*, 2021).

#### 4.2.7.8 Análise por Hematoxilina e Eosina (HE)

Na última etapa foi realizada a coloração das lâminas onde, após os cortes no micrótomo, as lâminas foram desparafinizadas em xilol I e II (as lâminas ficaram 5 minutos em cada banho) e em banhos de álcool etílico de forma decrescente (álcool 100% I e II, 95%, 90%, 70% e 50%) e água destilada, permanecendo em todos os banhos por 3 min. Posteriormente foram corados em hematoxilina por aproximadamente 30 s e, em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e depois coradas com Eosina por um tempo aproximado de 2 min, depois novamente lavadas em água corrente. Em seguida, passaram por desidratação em álcool (70%, 90%, 95%, 100% I e II), foram clarificadas em xilol I e II por 5 minutos e posteriormente as lâminas foram montadas e realizada sua análise em microscópio óptico (Zeiss®) em aumento de 400x com câmera acoplada e foi possível a verificação do núcleo na coloração azul-púrpura e do citoplasma da célula que tende a ser visualizado em tonalidades de vermelho (SANTOS *et al.*, 2021).

Por meio do corante Hematoxilina e Eosina, as lâminas foram avaliadas a partir da densidade vascular e da contagem direta de fibroblastos. Para a análise da densidade vascular, foram realizadas as fotomicrografias das lâminas em 10 campos utilizando como referência as margens direita e esquerda da ferida, com auxílio do microscópio óptico (Zeiss®) em aumento de 400x e com câmera acoplada. Após o registro das imagens, estas fotomicrografias foram sobrepostas em um gradeado contendo 100 pontos com distâncias equânimes entre os pontos, espalhados por toda a fotomicrografia e, a partir disso, os vasos que coincidiram com os pontos foram contados. Por sua vez, a contagem direta de fibroblastos foi avaliada por meio do software *Image J*®. Foi seguido a ordem de marcação manual celular individual com a ajuda do instrumento *Multi-point* de forma semiquantitativa. Os resultados foram demonstrados pela

média do número total de fibroblastos e apontados nos 10 campos de alta ampliação (400x).

#### 4.2.7.9 Análise por Picro-Sirius Red

Para a coloração foi utilizado 0,5 g do Corante Direct Red 80<sup>®</sup> e 500 mL de solução de ácido pícrico, tais lâminas passaram pelo mesmo processo de desparafinização de HE e depois foram coradas por 30 min por Picro-Sirius Red 0,1. Em seguida, foram desidratadas em banhos de álcool e clarificadas com Xilol I e II e por fim realizada a montagem das lâminas, assim como nos banhos de álcool de HE (SANTOS *et al.*, 2021). Após a coloração das lâminas por Picro-Sirius Red, as análises foram realizadas em um microscópio de luz polarizada (Leica<sup>®</sup>) com câmera acoplada, em grande ampliação (200x), onde passaram por microfotografia em 10 campos ao longo da área de lesão de cada lâmina, tendo a margens da lesão como limite.

A análise de Picro-Sirius Red foi feita de forma quantitativa, em que a avaliação de imagens foi por meio da diferenciação da intensidade das cores. Para quantificar as fibras de colágeno tipo I e tipo III foi visualizada a coloração das fibras de colágeno tipo I, que apareceram com um padrão de birrefringência laranja-avermelhado e as fibras de colágeno do tipo III foram visualizadas em um padrão de birrefringência verde-amarelado (RITTIÉ, 2017). Essas imagens foram processadas pelo software *Image J*<sup>®</sup>, com o *plug-in Threshold Colour*, analisou-se a quantidade por área de colágeno. Para a análise do colágeno tipo I e tipo III foram seguidos os comandos: Image > Adjust > Color Threshold > parâmetros: colágeno do tipo 1: matriz: 0-40, Saturação: 0-255 e Brilho: 5-225 captando a intensidade do vermelho; para colágeno tipo 3: Matiz: 0-45-120, Saturação: 0-255 e Brilho: 5-225 assimilando a intensidade de colorações verdes.

### 4.3 Análises de dados

Para as análises físico-químicas e toxicidade dérmica dos méis utilizou-se teste de Tukey com médias e desvio padrão. Enquanto a análise antimicrobiana *in vitro* se deu em resultados de análise de médias. Já a análise microbiológica *in vivo* e a quantificação de fibroblastos foram feitas de forma semiquantitativas. Além disso, para os ensaios de toxicidade ocular e avaliação da estabilidade coloidal das AgNPs usou-se o teste de ANOVA one-way com os resultados apresentados com médias e desvio padrão. Os resultados da experimentação *in vivo* da cicatrização foram submetidos à análise de desdobramento de variância e, quando significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o pacote estatístico SISVAR 5.6.

#### 4.4 Princípios éticos da pesquisa

O estudo seguiu aos princípios éticos de acordo com a Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, sendo reforçado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (2016), que ressalta que o biotério dispõe de infraestrutura e disponibilização de treinamento de manejo com os animais antes de iniciar a pesquisa, sendo que os pesquisadores apresentaram o compromisso de promover o aperfeiçoamento dos recursos humanos com a produção, manutenção e uso ético e do bem-estar dos animais para fins de ensino e pesquisa para desenvolver com segurança as atividades experimentais.

O presente projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará e aprovado com o seguinte protocolo N° 1220220235 (Anexo 1). A experimentação *in vivo* foi realizada depois da liberação dos animais pela equipe veterinária responsável pelo biotério para adaptação e manejo ao alojamento e foi aguardado que eles alcançassem a idade e o peso ideal para iniciar os testes.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Análise físico-química e bioquímica dos méis

Os resultados das análises físico-químicas de pH, acidez livre (mEq.Kg<sup>-1</sup>), cinzas (%), umidade (%), sólidos solúveis (°Brix) e açúcares redutores (%) dos méis estão representados na Tabela 6. Os resultados das análises bioquímicas da determinação da atividade antioxidante - ABTS (µmolTE 100mg<sup>-1</sup>), compostos fenólicos totais (mgGA.100g<sup>-1</sup>), atividade antioxidante (% de inibição DPPH) e FRAP (µmol.L<sup>-1</sup> de Fe<sup>+2</sup> em 10% de solução de mel), são representados na Tabela 7.

**Tabela 6** - Valores representados das 35 amostras das análises físico-químicas dos méis de abelha sem ferrão.

| Amostras | pH        | Umidade (%) | Açúcares redutores (%) | Sólidos Solúveis °Brix | Acidez livre (meqKg <sup>-1</sup> ) | Cinzas (%) |
|----------|-----------|-------------|------------------------|------------------------|-------------------------------------|------------|
| MFC1     | 3,51±0,06 | 27          | 26,79±1,21             | 67                     | 17,70±0,36                          | 0,27±0,12  |
| MFC2     | 3,74±0,12 | 27          | 32,56±1,09             | 71                     | 28,77±0,71                          | 0,25±0,15  |
| MFC3     | 3,35±0,02 | 30          | 31,45±0,59             | 67.7                   | 18,50±0,63                          | 0,23±0,16  |
| MFC4     | 3,51±0,02 | 28          | 30,16±0,16             | 70                     | 18,27±2,96                          | 0,27±0,15  |
| MFC5     | 3,74±0,01 | 26.1        | 33,91±0,65             | 72                     | 7,95±0,60                           | 0,29±0,11  |
| MJE1     | 3,70±0,02 | 30          | 28,72±0,24             | 68.1                   | 22,55±0,93                          | 0,50±0,12  |
| MJE2     | 3,80±0,01 | 30          | 31,07±4,17             | 68.5                   | 6,14±0,08                           | 0,27±0,15  |
| MJE3     | 3,61±0,02 | 31          | 26,37±0,65             | 67                     | 8,48±0,66                           | 0,24±0,11  |
| MJE4     | 4,07±0,01 | 27          | 30,31±0,64             | 71                     | 6,35±0,76                           | 0,49±0,01  |
| MJE5     | 3,90±0,01 | 26,5        | 32,61±1,05             | 71                     | 6,00±0,16                           | 0,23±0,11  |
| MFD1     | 3,22±0,01 | 35          | 27,45±0,71             | 62                     | 31,70±0,29                          | 0,28±0,14  |
| MFD2     | 3,70±0,02 | 31          | 33,47±3,89             | 67                     | 14,68±0,28                          | 0,36±0,15  |

|             |           |            |            |            |             |           |
|-------------|-----------|------------|------------|------------|-------------|-----------|
| <b>MFD3</b> | 3,61±0,01 | 30         | 29,49±1,10 | 67.5       | 16,71±2,19  | 0,44±0,02 |
| <b>MFD4</b> | 3,76±0,01 | 29         | 32,25±0,16 | 68.5       | 29,01±0,71  | 0,40±0,13 |
| <b>MFD5</b> | 3,90±0,01 | 29         | 34,29±1,15 | 69         | 5,90±0,25   | 0,41±0,04 |
| <b>MJO1</b> | 2,97±0,01 | 32         | 1,25±0,61  | 66         | 74,39±1,94  | 0,41±0,13 |
| <b>MJO2</b> | 3,57±0,04 | 29         | 19,80±0,90 | 68.5       | 30,15±1,09  | 0,31±0,14 |
| <b>MJO3</b> | 3,78±0,01 | 28         | 14,70±0,69 | 69         | 36,33±0,83  | 0,46±0,15 |
| <b>MJO4</b> | 3,54±0,01 | 32         | 22,65±0,52 | 66.5       | 31,83±2,45  | 0,32±0,16 |
| <b>MJO5</b> | 3,21±0,01 | 30         | 24,14±4,30 | 63         | 90,60±7,85  | 0,33±0,16 |
| <b>JAN1</b> | 3,79±0,14 | 25,52±0,03 | 31,72±0,52 | 72,60±0,05 | 62,50±3,86  | 0,35±0,04 |
| <b>JAN2</b> | 3,45±0,03 | 33,93±0,06 | 42,55±2,52 | 66,13±0,03 | 119,26±0,81 | 0,35±0,01 |
| <b>JAN3</b> | 3,59±0,02 | 29,23±0,06 | 35,35±6,61 | 69,11±0,04 | 140,41±2,93 | 0,44±0,05 |
| <b>JAN4</b> | 4,26±0,02 | 29,60±0,10 | 84,13±5,80 | 69,10±0,04 | 144,54±7,25 | 0,55±0,11 |
| <b>JAN5</b> | 6,03±0,03 | 27,47±0,12 | 72,49±7,99 | 70,52±0,02 | 130,53±2,61 | 0,59±0,06 |
| <b>JAN6</b> | 4,42±0,05 | 26,55±0,05 | 41,47±5,02 | 71,52±0,03 | 97,52±3,22  | 0,72±0,06 |
| <b>JAN7</b> | 4,65±0,03 | 25,80±0,05 | 40,82±1,95 | 72,19±0,04 | 107,32±1,28 | 0,76±0,03 |
| <b>JAN8</b> | 4,74±0,01 | 27,23±0,06 | 48,88±0,92 | 71,03±0,03 | 108,51±2,12 | 0,82±0,05 |
| <b>JUP1</b> | 3,27±0,03 | 31,33±0,15 | 21,00±1,54 | 67,81±0,03 | 144,92±2,39 | 0,38±0,17 |
| <b>JUP2</b> | 3,70±0,02 | 26,75±0,05 | 57,66±7,55 | 71,49±0,05 | 72,53±1,89  | 0,35±0,03 |
| <b>JUP3</b> | 4,16±0,04 | 26,13±0,06 | 54,30±8,66 | 72,52±0,06 | 150,61±0,43 | 0,36±0,06 |
| <b>JUP4</b> | 4,03±0,02 | 26,02±0,08 | 33,61±3,34 | 72,03±0,05 | 71,04±0,74  | 0,36±0,04 |
| <b>JUP5</b> | 5,52±0,28 | 25,23±0,06 | 42,87±4,64 | 72,88±0,03 | 49,77±1,38  | 0,61±0,05 |
| <b>JUP6</b> | 4,39±0,02 | 24,97±0,15 | 34,75±1,58 | 73,13±0,03 | 69,83±3,41  | 0,61±0,04 |
| <b>JUP7</b> | 5,63±0,08 | 25,85±0,05 | 25,33±2,53 | 72,50±0,04 | 99,15±4,18  | 0,77±0,09 |

Os valores estão representados como média ± desvio padrão da média de medidas em triplicata. Análise estatística: Teste de Tukey com o nível de significância de valor  $p \leq 0,05$ .

Fonte: A autora (2024).

O baixo valor de pH do mel contribui fortemente para inibir a presença e o crescimento de microrganismos sendo utilizado como potencial agente na redução de algumas doenças infecciosas, como tosses e feridas (MEO *et al.*, 2017). Percebe-se que apenas a amostra MJO1, com valor de pH de 2,97 (Tabela 6), apresentou essa característica próxima do mínimo de 2,9 preconizado pelo RTIQ do Estado do Pará. O estudo de Wong *et al.* (2019) mostrou um resultado de pH de 2,01 em mel de abelha de *Tetrigona binghami*. Além disso, Lani *et al.* (2017) tiveram um resultado de pH de 2,40 em méis de ASF e, apesar de valores inferiores, ele foi adequado para inibir o crescimento de microrganismos, ressaltando que a maioria das bactérias e fungos crescem em torno de um pH neutro.

A Tabela 6 mostra resultados de pH entre 2,97 (MJO1) a 4,42 (JAN6) e estes estiveram dentro da faixa considerada de pH dentro da normalidade para méis de ASF (PARÁ, 2021), o que corrobora com o estudo de Freitas *et al.* (2022) que obtiveram resultados de pH de méis de abelha do gênero *Melipona* variando entre 3,16 e 3,84. Biluca (2018) analisou 20 amostras de méis de ASF que também exibiram resultados de caráter ácido, típico do mel nativo, com valores de pH entre 3,33 e 4,24. Além disso, Gela *et al.* (2021) analisaram méis de *Meliponula beccarii* na região de Oromia, na Etiópia, com pH entre 3,2 e 3,8. Além disso, nesta pesquisa

observou-se que apenas cinco méis (JAN 5, JAN 7, JAN 8, JUP 5 e JUP 7) (Tabela 6) tiveram resultados de pH acima de 4,5 que é o valor de limite superior preconizado pelo RTIQ do Estado do Pará (PARÁ, 2021).

Na literatura se observa alguns resultados de pH acima de 4,5 para méis de ASF, como constatado no estudo de Lima (2017) que obteve um valor máximo de pH de 6,01 do mel de Tiúba (*Melipona compressipes fasciculada*). Além disso, Bafo *et al.* (2019) tiveram resultados de pH de 4,46 a 5,42 em méis de ASF. Dessa forma, o pH do mel pode sofrer influência da região geográfica, solo e origem botânica que a partir de diferentes composições florísticas e dos locais onde as abelhas colhem o néctar promovem suas características próprias. Além disso, o processo de extração, armazenamento do mel e adulteração com utilização de substâncias impuras podem alterar a composição do pH (MOURA, 2010).

Quanto à acidez livre, entre as amostras analisadas, o maior valor encontrado foi de 150,61 mEqKg<sup>-1</sup> para a amostra JUP3 e o menor valor obtido foi de 5,90 mEqKg<sup>-1</sup> para a amostra MFD5 (Tabela 6). Valores evidenciados por Lira *et al.* (2014) de acidez para méis de abelha de *Tetragonisca angustula* estiveram entre 54,06 e 103,95 mEqkg<sup>-1</sup>, sendo que tais resultados foram guiados pela regulamentação da legislação para méis de abelha africanizada (*Apis mellifera*), onde o valor máximo é de 50 mEqkg<sup>-1</sup>. Lopes (2019) obteve resultados de acidez livre com o valor mínimo de 37,55 e máximo de 116,94 mEqkg<sup>-1</sup> em suas amostras de méis de *Tetragonisca angustula*. Enquanto no estudo de Luz (2021) resultados de acidez livre de méis de *Melipona subnitida* variaram entre 17,74 e 76,42 mEqkg<sup>-1</sup>.

Os maiores valores acidez livre foram encontrados nas amostras MJO5 (90,60), JAN2 (119,26), JAN3 (140,41), JAN5 (130,53), JAN6 (97,52), JAN7 (107,32), JUP 1 (144,92), JUP3 (150,61), JUP7 (99,15), JAN4 (144,54) e JAN8 (108,51) (Tabela 6). O máximo indicado pelo RTIQ de Amazonas (2016) e Pará (2021) para este parâmetro é de 80 mEqkg<sup>-1</sup>. Fiorotti (2021) obteve um valor máximo excedido de 175,42 mEqkg<sup>-1</sup>. No estudo de Gomes *et al.* (2022), os resultados de acidez livre de méis de *Melipona* chegaram até uma concentração de 328,56 mEqkg<sup>-1</sup>. As variações nos resultados de acidez livre podem ser em decorrência da origem floral, localização e época da extração do mel, por exemplo (GEBEYEHU; JALATA, 2023). Além disso, Oliveira *et al.* (2017) citam que possivelmente, os resultados da acidez livre são influenciados principalmente por algum problema no armazenamento das amostras adquiridas. Dado isso, a acidez pode representar um dado fundamental na análise do estado de conservação de um produto natural (GOIS *et al.*, 2013).

Quanto aos teores de umidade, os valores obtidos variaram de 24,97% (JUP6) a 35% (MFD1) (Figura 6). Percebe-se que os resultados estão dentro da normalidade, de acordo com

o RTIQ do mel de ASF do Amazonas (2016) que determina que os parâmetros estejam entre 23 e 35%. Gomes *et al.* (2022) tiveram resultados de umidade que variaram entre 18,01 a 32,64%, enquanto Lira *et al.* (2014) apresentaram umidade que variaram de 23,4 a 29,4% em méis de ASF coletados parte em tempo seco e a outra parte em período chuvoso.

A variação de umidade pode ser em decorrência da origem geográfica, que é influenciada pela floresta tropical e solo. O outro fator que pode aumentar a umidade é a estação chuvosa que pode ocasionar a fermentação em concentrações de umidade maior que 35% (SOHAIMY *et al.*, 2015). Segundo Gela *et al.* (2021) as amostras de mel que estão dentro dos limites preconizados indicam adequada qualidade de armazenamento. Resultados superiores de umidade podem reduzir a qualidade do mel, por causa da contaminação por processamento e armazenamento incorreto, causando a proliferação por microrganismos (ESCUREDO *et al.*, 2013).

Os valores de açúcares redutores variaram entre 1,25% (MJO1) e 84,13% (JAN4) (Tabela 6) sendo que a maioria esteve abaixo de 50%, o que é recomendado pela RTIQ do Estado do Amazonas (2016) e Pará (2021) para açúcares redutores. Freitas *et al.* (2022) usaram méis de abelhas ASF e tiveram uma variação de 47,75% a 72,13% de açúcares redutores. Lopes (2019) obteve valores de 53,91 a 83,67% dos méis de jataí (*Tetragonisca angustula*). Nega *et al.* (2020) alcançaram valores de açúcares redutores de méis que variaram entre 45,1 e 63,8%. Bastos (2020) teve uma variação de açúcares redutores entre 42,02 e 98,01%, observando valores acentuados acima do limite mínimo permitido que possivelmente foi devido à influência da flora local.

Ressalta-se que apenas quatro amostras: JAN4 (84,13%), JAN5 (72,49%), JUP2 (57,66%) e JUP3 (54,30%) (Tabela 6) tiveram valores superiores do parâmetro mínimo de açúcares redutores. De acordo com Escuredo *et al.* (2014) esses valores sofrem alterações devido a heterogeneidade da origem botânica, geográfica e do clima de onde o mel é extraído e, conseqüentemente, provoca alterações na composição do açúcar. Dado isso, os açúcares são formados principalmente por monossacarídeos redutores como a glicose e frutose que influenciam na viscosidade, cristalização, higroscopicidade e atividade antibacteriana dos méis (ALMEIDA-MURADIAN *et al.*, 2013).

Os valores de sólidos solúveis (°Brix) encontrados nas amostras analisadas variaram de 62 (MFD1) a 73,13 °Brix (JUP6) (Tabela 6). Isto corrobora com o estudo de Braghini (2016) que teve resultados de suas amostras de mel de ASF entre 67 e 75,50 °Brix. Além disso, Fernandes *et al.* (2022) tiveram valores de 66,6 a 81,7 de °Brix de méis de ASF comercializados em feiras e mercados populares da capital do Amazonas. Oliveira *et al.* (2013) ressalta que a

legislação nacional ou regulamentos estaduais não recomendam valores mínimos e/ou máximos para este parâmetro. Entretanto, a mensuração de sólidos solúveis (°Brix) do mel é um parâmetro importante para indicar possíveis adulterações, pois essa medida está diretamente relacionada com o conteúdo de açúcar (DE SOUSA *et al.*, 2016).

De acordo com os resultados obtidos para a análise do teor de cinzas, os valores variaram de 0,23 (MFC3 e MJE5) a 0,82% (JAN8), sendo que apenas 6 amostras JAN6, JAN7, JAN8, JUP5, JUP6 e JUP7 (Tabela 6) ficaram acima do limite máximo permitido de 0,6%, preconizado pelo RTIQ de méis de ASF do Estado do Amazonas e Pará (AMAZONAS, 2016; PARÁ 2021). Nega *et al.* (2020) tiveram valores que variaram entre 0,09 e 0,26% de cinzas em amostras investigadas. Lopes (2019) encontrou variação entre 0,04 e 0,54% nas análises de cinzas. Freitas (2022) teve resultados de 0,02 a 0,56% de teores de cinzas nos méis de ASF. Oliveira *et al.* (2019) adquiriram valores de cinzas que variaram de 0,04 a 4% para méis da ASF de *Melipona scutellaris*, sendo que os seus resultados adquiridos tiveram uma ampla variação. Isso possivelmente foi favorecido pela diferença de alimentação das abelhas a partir dos néctares, assim como diferenças de manejo e colheita do mel pelos meliponicultores (FINOLA *et al.*, 2007).

Tesfaye *et al.* (2016) descrevem que apesar da presença de pequenas quantidades de minerais eles exercem um papel fundamental no valor nutricional e da coloração do mel. O teor de cinzas sofre variações de acordo com a origem botânica, ambiente e a localidade geográfica, ou seja, depende principalmente do solo e botânica, assim, tais fatores podem influenciar nos valores elevados de cinzas (KARABAGIAS *et al.*, 2014).

Os valores dos compostos fenólicos totais variaram entre 30,72 (JUP4) a 185,37 mgAG.100g<sup>-1</sup> (JAN6) das amostras (Tabela 7). No estudo de Gomes *et al.* (2022) os teores de compostos fenólicos totais variaram de 18,00 a 266,96 mgAG.100g<sup>-1</sup> em méis de ASF. Além disso, Da Costa; Toro (2021) analisaram méis da região norte do Brasil e tiveram resultados que variaram entre 4,27 e 145,43 mgAG.100 g<sup>-1</sup> com atividade antioxidante significativa. Lira *et al.* (2014) obtiveram resultados dos compostos fenólicos de méis meliponídeos entre 61,28 e 105,59 mgAG.100 g<sup>-1</sup>, indicando ainda que a origem botânica pode interferir nos resultados dos teores fenólicos dos méis.

Lopes (2019) verificou que o valor mínimo de compostos fenólicos foi de 23,05 mgAGE.100g<sup>-1</sup> e o valor máximo obtido foi de 79,35 mgAG.100g<sup>-1</sup> em méis de AFS jataí (*Tetragonisca angustula*). Biluca (2018) obteve teores de fenólicos totais entre 10,39 e 45,56 mgAG.100g<sup>-1</sup>. Dessa forma, a quantidade dos compostos fenólicos dos méis está intimamente relacionada com suas fontes florais e origem geográfica (CAN *et al.*, 2015).

Tabela 7 - Valores obtidos das 35 amostras das análises bioquímicas dos méis de abelha sem ferrão.

|          | Compostos fenólicos<br>totais | Atividade Antioxidante | FRAP   | ABST                          |
|----------|-------------------------------|------------------------|--|-------------------------------|
| Amostras | (mgAG.100g <sup>-1</sup> )    | % de Inibição de DPPH  | μmol.L <sup>-1</sup> de Fe(II) em<br>10% de solução de Mel | (μmolTE 100mg <sup>-1</sup> ) |
| MFC1     | 132,60±0,59                   | 58,70±13,05            | 475,51±24,83   | 7,22±0,37                     |
| MFC2     | 140,49±0,45                   | 52,82±9,98             | 425,67±10,95   | 7,37±0,16                     |
| MFC3     | 135,79±0,83                   | 56,82±1,82             | 402,64±55,68   | 8,33±0,44                     |
| MFC4     | 132,46±1,35                   | 44,74±7,78             | 373,98±244,56  | 7,96±0,48                     |
| MFC5     | 138,86±1,27                   | 51,62±5,75             | 233,18±41,61   | 8,13±0,35                     |
| MFD1     | 124,71±0,17                   | 40,98±7,54             | 683,33±145,56  | 6,85±1,37                     |
| MFD2     | 128,34±1,02                   | 23,61±9,03             | 555,63±54,96   | 5,19±0,55                     |
| MFD3     | 131,57±0,33                   | 48,54±9,24             | 310,65±25,60   | 8,18±0,18                     |
| MFD4     | 134,08±0,52                   | 42,90±15,77            | 467,45±8,55  | 7,31±0,09                     |
| MFD5     | 134,74±0,62                   | 32,85±0,60             | 510,53±3,29  | 7,16±0,37                     |
| MJE1     | 130,99±1,40                   | 39,26±9,38             | 807,23±318,56  | 6,27±0,80                     |
| MJE2     | 136,07±1,02                   | 41,87±6,29             | 668,19±155,28  | 7,54±0,65                     |
| MJE3     | 134,95±2,37                   | 53,38±10,50            | 578,99±105,30  | 7,44±0,24                     |
| MJE4     | 137,33±1,17                   | 25,81±9,69             | 659,26±229,89  | 5,52±0,10                     |
| MJE5     | 137,50±0,90                   | 50,74±4,42             | 630,82±90,67   | 7,17±0,56                     |
| MJO1     | 129,17±0,08                   | 32,66±2,73             | 582,10±206,87  | 6,67±0,23                     |
| MJO2     | 135,08±2,01                   | 38,86±0,70             | 644,31±12,04   | 6,33±0,17                     |
| MJO3     | 133,38±3,55                   | 30,65±4,47             | 440,44±201,36  | 5,83±0,45                     |
| MJO4     | 136,38±1,95                   | 12,80±0,85             | 518,67±168,04  | 2,36±0,20                     |
| MJO5     | 126,60±4,46                   | 26,77±2,83             | 656,44±122,68  | 4,88±0,17                     |
| JAN1     | 39,38±1,02                    | 34,64±0,75             | 807,05±87,83   | 38,20±4,16                    |
| JAN2     | 99,32±4,68                    | 25,63±3,62             | 533,21±114,72  | 30,91±5,06                    |
| JAN3     | 72,46±11,25                   | 20,45±4,74             | 725,26±60,70   | 17,05±2,47                    |
| JAN4     | 99,16±8,94                    | 31,61±5,97             | 230,90±18,55   | 53,21±4,96                    |
| JAN5     | 143,74±4,09                   | 28,15±5,61             | 901,41±61,28   | 66,51±2,54                    |
| JAN6     | 185,37±25,01                  | 46,43±1,38             | 170,64±31,68   | 109,84±3,31                   |
| JAN7     | 60,49±4,00                    | 44,91±2,69             | 490,90±124,94  | 113,63±0,41                   |
| JAN8     | 178,32±10,02                  | 52,92±4,71             | 1056,54±60,35  | 126,50±1,40                   |
| JUP1     | 71,57±2,68                    | 29,56±3,04             | 823,46±89,72   | 34,98±3,44                    |
| JUP2     | 49,00±14,36                   | 43,99±4,96             | 576,54±87,82   | 39,82±6,98                    |
| JUP3     | 43,66±3,97                    | 32,50±2,64             | 696,54±36,54   | 39,99±7,40                    |
| JUP4     | 30,72±2,76                    | 41,90±1,85             | 719,36±33,32   | 22,91±1,89                    |
| JUP5     | 41,83±4,66                    | 32,63±5,76             | 670,64±47,97   | 57,11±1,53                    |

|             |             |            |                |             |
|-------------|-------------|------------|----------------|-------------|
| <b>JUP6</b> | 163,32±5,71 | 38,26±5,62 | 957,31±49,88   | 92,69±1,84  |
| <b>JUP7</b> | 150,80±4,35 | 49,12±5,07 | 1122,44±125,11 | 104,66±4,54 |

Os valores estão representados como média ± desvio padrão da média de medidas em triplicata. Análise estatística: Teste de Tukey com o nível de significância de valor  $p \leq 0,05$ .

Fonte: A autora (2024).

Os resultados de DPPH variaram entre 12,80 (MJO4) a 58,70 (MFC1) das amostras descritas (Tabela 7). Essa variação foi também observada no estudo de Biluca (2018) que obteve valores entre 1,41 e 13,95% de inibição de DPPH, justificando que possivelmente as distintas espécies de ASF e a origem botânica causaram a variação dos seus resultados. Além disso, Silva (2021) obteve resultados de 15,99 a 69,32% de inibição do radical DPPH. Gomes *et al.* (2022) também analisaram a capacidade antioxidante de méis de ASF, pelo método de DPPH e encontraram valores de inibição entre 10,63 e 96,53%. Com isso, é possível indicar que o mel contém abundantes sequestradores de radicais livres que são capazes de reduzir a produção de radicais livres (KISHORE *et al.*, 2011).

Os valores de FRAP estiveram entre 170,64 (JAN6) a 1122,44 (JUP7) (Tabela 7). No estudo de Salgueiro *et al.* (2014) os valores de FRAP foram entre 23,88 a 116,47  $\mu\text{mol.Fe(II)} 100 \text{ g}^{-1}$ . Já Biluca (2014) encontrou valores de FRAP variando entre - 64,00 a 666,66  $\mu\text{mol Fe (II)} 100 \text{ g}^{-1}$ . Lavinias *et al.* (2023) apresentaram valores de FRAP variando de 79,53 a 215,07  $\mu\text{mol Fe (II)} 100 \text{ g}^{-1}$ . Enquanto Biluca (2020) obteve FRAP entre 67,5 a 734,5  $\mu\text{mol Fe (II)} 100 \text{ g}^{-1}$ . Tais valores são principalmente influenciados pela quantidade de açúcares redutores como glicose e frutose presente no mel, dessa forma, contribuem para uma maior atividade antioxidante (FERREIRA *et al.*, 2009).

Os resultados de ABTS variaram entre 2,36 (MJO4) a 126,50  $\mu\text{mol.TE } 100 \text{ mg}^{-1}$  (JAN8) das amostras (Tabela 7). Esses valores foram parecidos com o estudo de Salgueiro *et al.* (2014), que tiveram valores de ABTS entre 0,88 e 137,79  $\mu\text{mol.TE } 100 \text{ g}^{-1}$ . Enquanto Lavinias *et al.* (2023) utilizando o ensaio ABTS obtiveram valores entre 37,84 e 54,95  $\mu\text{mol.TE } 100 \text{ g}^{-1}$  para os seus méis.

## 5.2 Análise microbiológica os méis através dos halos de inibição e Concentração Inibitória Mínima

Na Tabela 8 estão expostos os resultados obtidos da análise antibacteriana com os 35 méis de ASF e 3 controles com antibióticos frente a três diferentes bactérias. Observa-se que o maior halo de inibição dos méis frente a *Staphylococcus aureus* foi causado pela amostra JUP2 (24 mm), valor similar ao cloranfenicol (25 mm) e a eritromicina (30 mm) e inferior a

amoxicilina (40 mm). Para *Pseudomonas aeruginosa*, o maior valor de inibição também foi registrado para a amostra JUP2 (29,6 mm), sendo que esse resultado foi maior que o antibiótico cloranfenicol (23 mm) e eritromicina (28 mm) e menor à inibição causada pelo antibiótico amoxicilina (34 mm). Já para *Escherichia coli* teve o maior valor de inibição foi causado pelo mel JAN3 (19,6 mm) e, dos antibióticos testados, apenas o cloranfenicol (35 mm) promoveu inibição.

Como observado na Tabela 8, os halos de inibição dos méis de ASF frente a *E. coli* variaram entre de 8 mm (MFD2) e no máximo de 19,6 mm (JAN3). No estudo Gonçalves *et al.* (2005) a atividade antibacteriana no mel de ASF *Nannotrigona testaceicornis* teve o maior valor na medida do halo de inibição com 19,0 mm frente a *E. coli*. Os halos de inibição das amostras dos méis de ASF frente a bactéria *P. aeruginosa* foram entre 5,6 mm (MFD1) e 29,6 mm (JUP2) (Tabela 8). Hasali *et al.* (2018) usaram méis de ASF de *Heterotrigona itama* de vários locais da costa leste da Península da Malásia e tiveram inibição a *P. aeruginosa* entre 15 mm e 25 mm, enquanto o controle com antibióticos variou entre 10 mm e 19,5 mm. Os halos de inibição das amostras dos méis de ASF frente a bactéria *S. aureus* variaram de 8 mm (MFD5) a 24 mm (JUP2). Roós *et al.* (2018) tiveram resultados com méis de ASF com halos de inibição frente a *S. aureus* com valores entre 18 mm e 21 mm. Grzegozeski (2015) analisou os halos de inibição do mel de ASF *Tetragonisca angustula* frente a *S. aureus* e obteve valores entre 10,89 mm e 11,08 mm, enquanto o controle com a amoxicilina teve inibição em 19,05 mm.

As amostras MFC2, MFC4, MJE3, MJE5, MDF5 e MJO3 dos méis de ASF (Tabela 8) tiveram atividades inibitórias apenas para uma bactéria testada. Essa condição também foi descrita por Domingos (2019) que utilizou méis de ASF de *M. ebúrnea*, *M. grandis*, *M. seminigra* e *M. flavolineata* contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e obteve variadas susceptibilidades dos microrganismos testados. Uma provável explicação para esses resultados seria a baixa quantidade de peróxido de hidrogênio presentes no mel, pois a quantidade de peróxido de hidrogênio é proporcional à sua atividade antibacteriana, além disso, a origem florística, geográfica, estação do ano e condições de armazenamento dos méis influenciam na sua composição e, conseqüentemente, na atividade antimicrobiana (BRUDZYNSKY, 2007; ESCUREDO *et al.*, 2014).

Dessa forma, nota-se que os méis das amostras JUP1 e JUP2 (Tabela 8), ambas da espécie de abelha *Melipona compressipes manaosensis*, apresentaram alguns dos melhores desempenhos contra as bactérias testadas, principalmente contra a *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Vale ressaltar que essas duas amostras foram coletadas na estação seca e tiveram a mesma origem geográfica, sendo que também foram testadas outras duas amostras JUP3 e JUP4 com

a mesma localização geográfica, estação do ano e espécie de abelha, no entanto, com ação microbiológica menor. O estudo de Escuredo *et al.* (2014) justifica que a origem florística e as condições de armazenamento dos méis influenciam também na composição do mel e, conseqüentemente, na atividade antimicrobiana. Além disso, Manyi-Loh *et al.* (2010) justificam que a umidade adequada e o baixo valor de pH interferem na atividade de enzimas, como a glicose oxidase, gerando peróxido de hidrogênio, essencial para a atividade antimicrobiana dos méis.

**Tabela 8** – Diâmetros dos halos de inibição (mm) produzidos pelas 35 amostras testadas com méis de abelha sem ferrão e 3 antibióticos contra as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* no ensaio de difusão em ágar.

| Amostras | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
|----------|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| JUP 1    | 14,3                    | 22,0                         | 24,6                          |
| JUP 2    | 18,3                    | 24,0                         | 29,6                          |
| JUP 3    | 17,6                    | 17,6                         | 14,6                          |
| JUP 4    | 15,3                    | 20,0                         | 17,6                          |
| JUP 5    | 13,3                    | 12,3                         | 14,6                          |
| JUP 6    | 18,3                    | 17,7                         | 17,0                          |
| JUP 7    | 10,0                    | 16,3                         | 12,3                          |
| MFC 1    | 11,3                    | 13,3                         | 9,6                           |
| MFC 2    | 16,3                    | NTI                          | NTI                           |
| MFC 3    | 12,0                    | 10,0                         | 8,6                           |
| MFC 4    | 13,6                    | NTI                          | NTI                           |
| MFC 5    | 10,6                    | NTI                          | 10,3                          |
| MJE 1    | 15,0                    | 15,6                         | 19,6                          |
| MJE 2    | 13,0                    | NTI                          | 17,3                          |
| MJE 3    | NTI                     | 15,0                         | NTI                           |
| MJE 4    | 11,3                    | 15,6                         | 16,6                          |
| MJE 5    | NTI                     | NTI                          | 15,0                          |
| MFD 1    | NTI                     | 12,6                         | 5,6                           |
| MFD 2    | 8,0                     | NTI                          | 10,0                          |
| MFD 3    | 15,3                    | 16,3                         | 8,0                           |
| MFD 4    | 10,3                    | 13,6                         | 15,3                          |
| MFD 5    | NTI                     | 8,0                          | NTI                           |
| MJO 1    | 17,6                    | 21,3                         | 22,0                          |
| MJO 2    | 17,6                    | 11,0                         | NTI                           |
| MJO 3    | NTI                     | 11,3                         | NTI                           |
| MJO 4    | NTI                     | 10,0                         | 10,6                          |
| MJO 5    | 9,6                     | 12,0                         | NTI                           |
| JAN 1    | 11,6                    | 21,3                         | 22,3                          |
| JAN 2    | 14,6                    | 9,6                          | 12,0                          |
| JAN 3    | 19,6                    | 13,5                         | 14,6                          |
| JAN 4    | 17,0                    | 11,0                         | 12,3                          |
| JAN 5    | 19,3                    | 13,5                         | 14,6                          |
| JAN 6    | 13,3                    | NTI                          | 10,6                          |
| JAN 7    | 12,0                    | 9,0                          | 11,0                          |
| JAN 8    | 13,3                    | 13,1                         | 13,0                          |
| AMC 30   | NTI                     | 40                           | 34,0                          |

|        |     |    |      |
|--------|-----|----|------|
| ERI 15 | NTI | 30 | 28,0 |
| CLO 30 | 35  | 25 | 23,0 |

Os valores estão representados como média da duplicata.

Legenda: AMC: Amoxicilina, ERI: Eritromicina, CLO: cloranfenicol, NTI: Não teve inibição

Fonte: A autora (2024).

Na Tabela 9, a concentração inibitória mínima obtida para todas as amostras dos méis variaram entre as concentrações de 1000, 500 e 250 mgmL<sup>-1</sup>. No geral, as amostras dos méis JUP1 e JUP2 apresentaram as melhores atividades antibacterianas na análise de CIM, principalmente nas concentrações de 25% (250 mgmL<sup>-1</sup>). Tais resultados corroboram com o estudo de Pimentel (2010) que utilizou méis de abelha da espécie de *Melipona compressipes manaosensis* e mostrou uma adequada atividade frente a cepas Gram-positivas e cepas Gram-negativas. Além disso, Batiston (2017) mostrou, pelos dados da CIM, a inibição do crescimento de bactérias como a *E. coli* e *S. aureus* na diluição de 25% (250 mgmL<sup>-1</sup>) utilizando méis de ASF.

Algumas amostras de méis de ASF da Tabela 9 não apresentaram atividade inibitória contra uma ou duas cepas testadas e, curiosamente, apenas duas amostras MJE3 e MFD5 não apresentaram inibição contra nenhuma das bactérias testadas. Isso foi observado no estudo de Jesus *et al.* (2020) que utilizaram méis de abelha de *Melipona scutellaris* e *Tetragonisca angustula* e tiveram amostras que não apresentaram atividade antibacteriana contra *E. coli* e *P. aeruginosa*. Dessa forma, a quantidade e distribuição de compostos fenólicos podem justificar essas diferenças inibitórias dos méis contra os microrganismos (BANDEIRA *et al.*, 2018).

**Tabela 9** - Concentração inibitória mínima (CIM) das 35 amostras de méis de abelha sem ferrão contra o crescimento de *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

| Amostras | <i>Escherichia coli</i>  | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
|----------|--------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| JUP 1    | 250 mg mL <sup>-1</sup>  | 250 mg mL <sup>-1</sup>      | 250 mg mL <sup>-1</sup>       |
| JUP 2    | 250 mg mL <sup>-1</sup>  | 500 mg mL <sup>-1</sup>      | 250 mg mL <sup>-1</sup>       |
| JUP 3    | 500 mg mL <sup>-1</sup>  | 1000 mg mL <sup>-1</sup>     | 500 mg mL <sup>-1</sup>       |
| JUP 4    | 250 mg mL <sup>-1</sup>  | 500 mg mL <sup>-1</sup>      | 250 mg mL <sup>-1</sup>       |
| JUP 5    | 500 mg mL <sup>-1</sup>  | 1000 mg mL <sup>-1</sup>     | 500 mg mL <sup>-1</sup>       |
| JUP 6    | 500 mg mL <sup>-1</sup>  | 500 mg mL <sup>-1</sup>      | 500 mg mL <sup>-1</sup>       |
| JUP 7    | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup>     | 1000 mg mL <sup>-1</sup>      |
| MFC 1    | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup>     | 1000 mg mL <sup>-1</sup>      |
| MFC 2    | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup>     | 1000 mg mL <sup>-1</sup>      |
| MFC 3    | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup>     | 1000 mg mL <sup>-1</sup>      |
| MFC 4    | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup>     | 1000 mg mL <sup>-1</sup>      |
| MFC 5    | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup>     | 1000 mg mL <sup>-1</sup>      |
| MJE 1    | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup>     | 1000 mg mL <sup>-1</sup>      |

|       |                          |                          |                          |
|-------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| MJE 2 | NTI                      | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | NTI                      |
| MJE 3 | NTI                      | NTI                      | NTI                      |
| MJE 4 | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup> |
| MJE 5 | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 500 mg/mL                | 1000 mg mL <sup>-1</sup> |
| MFD 1 | NTI                      | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | NTI                      |
| MFD 2 | NTI                      | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | NTI                      |
| MFD 3 | NTI                      | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | NTI                      |
| MFD 4 | NTI                      | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | NTI                      |
| MFD 5 | NTI                      | NTI                      | NTI                      |
| MJO 1 | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 500 mg/mL                | 1000 mg mL <sup>-1</sup> |
| MJO 2 | NTI                      | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | NTI                      |
| MJO 3 | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup> |
| MJO 4 | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup> |
| MJO 5 | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup> |
| JAN 1 | NTI                      | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | NTI                      |
| JAN 2 | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup> |
| JAN 3 | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup> |
| JAN 4 | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup> |
| JAN 5 | NTI                      | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | NTI                      |
| JAN 6 | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup> |
| JAN 7 | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | 1000 mg mL <sup>-1</sup> |
| JAN 8 | NTI                      | 1000 mg mL <sup>-1</sup> | NTI                      |

Legenda: NTI - Não teve inibição; CIM - Concentração inibitória mínima.

Fonte: A autora (2024).

Dessa forma, os méis meliponídeos apresentam diferentes graus de atividade antibacteriana e isso pode ser justificado por vários fatores, como por exemplo, à composição química do mel e, principalmente, a flora visitada pelas abelhas (SOUZA *et al.*, 2021). Yaacob *et al.* (2017) mencionam que a atividade antibacteriana do mel depende da localização geográfica, colheita, clima, manuseios e situações de armazenamento, bem como presença de compostos fenólicos, acidez e maior pressão osmótica. Segundo Kwakman e Zaat (2012) a alta concentração de açúcares em sinergia com baixas concentrações de umidade provoca o estresse osmótico da célula, o que impede a deterioração do mel por bactérias e, conseqüentemente, favorecem as atividades antimicrobianas.

### 5.3 Síntese de nanopartículas de prata

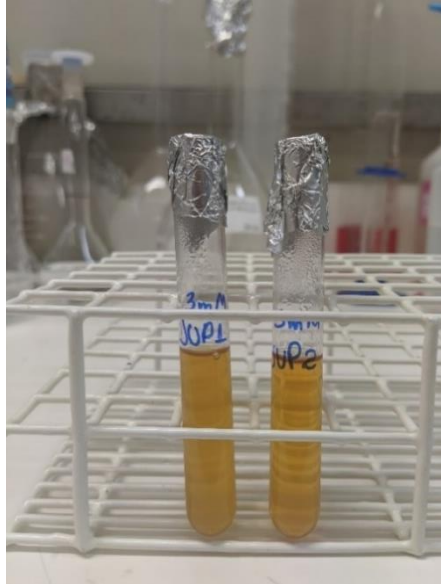
As amostras JUP1 e JUP2, ambas da espécie de abelha de *Melipona compressipes manaosensis*, apresentaram alguns dos melhores resultados antibacterianos e com isso foram

testadas como agentes redutores e estabilizantes de íons prata ( $\text{Ag}^+$ ) com o intuito de sintetizar AgNPs biogênicas. De acordo com os resultados advindos da inspeção visual, somente as suspensões incubadas a 80 °C nas concentrações de 3 mM e 5 mM apresentaram mudanças consideráveis na coloração, sendo este um dos principais indícios da formação de AgNPs estáveis podendo variar devido fatores como o tamanho, forma e temperatura utilizada durante a reação (BEHRAVAN *et al.*, 2019; VANLALVENI *et al.*, 2018). Observou-se a mudança de coloração das duas amostras incubadas na temperatura de 80° C, partindo de transparente para cor amarelo ou âmbar, como visualizado na Figura 13. Essa coloração é característica nas suspensões de AgNPs e tem relação com o fenômeno de ressonância plasmônica de superfície (RPS), que é entendido como a oscilação aleatória dos elétrons livres que estão ao redor da superfície das AgNPs, gerado pela interação com a luz incidente (DADA *et al.*, 2019).

Niraimathi *et al.* (2013) citaram que as mudanças de cor das soluções são devidas às biomoléculas como alcaloides, compostos fenólicos, flavonoides, açúcares, saponinas, esteroides e corantes presentes nos extratos naturais que reduzem os íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ) a um átomo de prata ( $\text{Ag}^0$ ). Dessa forma, o mel apresenta em sua composição compostos capazes de reduzir e estabilizar a prata (VENU *et al.*, 2011). A síntese de AgNPs irá depender da natureza dos materiais como a concentração do sal metálico e dos extratos naturais, além do tempo e temperatura de síntese, entre outros. Essas condições influenciam no rendimento das nanopartículas durante a síntese, bem como o seu tamanho, estrutura e forma (BORIOLLO *et al.*, 2020; HUSSAIN *et al.*, 2016).

Dias *et al.* (2021) relataram que a síntese de AgNPs a partir de extratos de *Podocarpus lambertii* foi bem otimizada na temperatura de 90° C, similarmente à temperatura ideal encontrada no presente estudo. Czernel *et al.* (2021) promoveram a síntese de AgNPs a partir de mel que foi confirmada pela mudança visível na cor da mistura de síntese em amarelo âmbar na temperatura de 70 °C em banho maria na concentração de 1 mM de  $\text{AgNO}_3$ , sendo observado que a temperatura acelera significativamente a reação de redução do íon  $\text{Ag}^+$ . Em contrapartida, El-Desouky e Ammar (2016) observaram que a coloração da solução se tornou marrom-amarelada em 72 h, após incubação em temperatura de 30°C, indicando a formação de AgNPs a partir de méis com diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$  em meio aquoso. Oskuee *et al.* (2016) testaram diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$ , com diferentes temperaturas e com distintas concentrações de méis, obtendo amostras com colorações de amarelo a marrom escuro.

**Figura 13** - Aspecto visual da síntese de AgNPs utilizando os méis JU1 e JUP2 nas concentrações de 3 mM.



Fonte: A autora (2024).

## 5.4 Caracterização de nanopartículas de prata

A caracterização das AgNPs das amostras JUP1 e JUP2 nas concentrações de 3 mM e 5 mM descreve resultados relacionados às suas absorbâncias por meio da técnica de espectroscopia de UV/vis, propriedades coloidais e estabilidade por DLS, análise por FTIR e observação morfológica por MET.

### 5.4.1 Avaliação por UV/VIS

Os espectros observados para as AgNPs apresentaram absorbâncias máximas na faixa entre 400 e 480 nm (Figura 14), o que corrobora com Alharbi *et al.* (2022) que descrevem o comprimento de onda com variação de 400 a 800 nm são rotineiramente usados para indicar a presença de AgNPs sintetizadas.

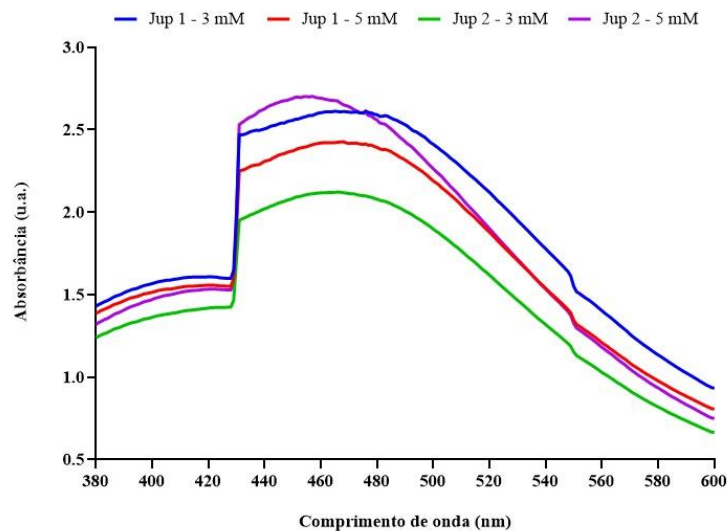
A banda de maior absorção das AgNPs JUP1 na concentração de 3 mM foi em 476 nm e 468 nm na concentração de 5 mM. Por sua vez, as AgNPs sintetizadas pelo mel JUP2 tiveram máxima absorção em 466 nm e 457 nm nas concentrações de 3 e 5 mM, respectivamente (Figura 14), corroborando com a mudança de coloração observada nas soluções coloidais após a formação das nanoestruturas que, no geral, mudou de incolor para amarelo âmbar (Figura 13). Essas bandas de maior absorção foram semelhantes aos observados estudo de Ghramh *et al.* (2023) que sintetizaram AgNPs a partir de diferentes porcentagens (20, 40 e 80%) de um mel

florestal obtido na cidade de Abha, na Arábia Saudita e observaram bandas em 472 nm, 468 nm e 464 nm, respectivamente.

As AgNPs JUP2 na concentração de 5 mM tiveram a maior intensidade de absorção em comparação às demais (Figura 14) e esse valor é similar a diversos estudo envolvendo AgNPs sintetizadas utilizando de mel, como por exemplo no estudo de Matar *et al.* (2023) que tiveram AgNPs de mel natural que foram coletadas em diferentes regiões da Turquia, o mel Sidr foi obtido na região do Mediterrâneo, enquanto o mel de rododendro foi obtido na região do Mar Negro, na Turquia que, no geral, tiveram bandas em torno de 443 nm e 456 nm,. No estudo de Al-Brahim e Mohammed (2020), AgNPs do mel de abelha das flores de *Ziziphus spina-christi* e *Acacia gerrardii* apresentaram bandas de absorção máximas nos comprimentos de onda de 441 nm e 446 nm, respectivamente.

A intensidade de absorção das AgNPs depende fortemente do tamanho, forma e funcionalização no ambiente químico e meio dielétrico (CAVASSIN *et al.*, 2015). De acordo com Bélteky *et al.* (2021) e Prathna *et al.* (2011), o comprimento de onda máximo está intimamente ligado ao tamanho médio das AgNPs, isto é, as partículas maiores apresentam um comprimento de onda de absorbância maior, enquanto partículas menores apresentam comprimento de onda menor em solução.

**Figura 14** - Espectros de absorção de UV-Vis das AgNPs em diferentes concentrações.



Fonte: A autora (2024).

#### 5.4.2 Avaliação da estabilidade coloidal das AgNPs por DLS e potencial Zeta de Superfície

Os resultados de DLS e potencial Zeta de superfície mostram as características coloidais das AgNPs sintetizadas a partir dos méis das amostras JUP1 e JUP2 após 30, 60, 90 e 120 dias da síntese inicial, como pode ser observado na Tabela 10. As características coloidais em relação ao diâmetro hidrodinâmico das amostras JUP1 nas concentrações de 3 mM e 5 mM no decorrer do tempo revelaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em relação às medidas de 60 a 120 dias quando comparadas à medida do dia 30 (Tabela 10). Observa-se ainda que os valores de diâmetro hidrodinâmico diminuíram de forma tempo-dependente e sendo menores nas medidas de 120 dias, independente da concentração de AgNPs utilizada.

Por sua vez, as características coloidais do diâmetro hidrodinâmico das amostras JUP2 nas concentrações de 3 mM e 5 mM (Tabela 10) foram semelhantes principalmente nas análises de 30 a 60 dias e não apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Outro aspecto a ser considerado é que o tamanho médio das AgNPs-JUP2 no dia 120 das concentrações de 3 a 5 mM aumentaram cerca de 49 nm e 39 nm, respectivamente em relação à medida do dia 90. Liao e Li (2019) citam que quanto menor o tamanho da partícula, maior a área de superfície em relação ao volume e maior será a sua atividade antimicrobiana, por exemplo.

Oskuee *et al.* (2016) sintetizaram AgNPs por meio da síntese verde utilizando mel contendo diferentes concentrações de  $\text{AgNO}_3$  (0,05, 0,1, 0,2, 0,3 e 0,4 mM) e tiveram tamanho hidrodinâmico variando entre 50 e 250 nm. Hosny *et al.* (2017) sintetizaram AgNPs de mel na concentração de  $\text{AgNO}_3$  de 1 mM de um mercado comercial egípcio e obtiveram diâmetro hidrodinâmico em 11,7 nm. Enquanto Dourado *et al.* (2020) alcançaram diâmetro hidrodinâmico médio de 600 nm para AgNPs de méis de abelha *Apis mellifera* nas concentrações de  $0,1 \text{ molL}^{-1}$ . El-Desouky e Ammar (2016) mostraram a distribuição de tamanho médio de 9,99 nm de AgNPs em solução coloidal utilizando mel egípcio nas concentrações de  $\text{AgNO}_3$  em 1, 10, 20, 30, 40 e 50 mM.

Os valores de diâmetro hidrodinâmico descritos acima envolvendo AgNPs sintetizadas por méis são em sua maioria diversificados quando comparados com os resultados da presente pesquisa. De acordo com Umoren *et al.* (2014) essa variação de resultados ocorre devido ao processo de síntese de AgNPs com a influência da quantidade de  $\text{AgNO}_3$ , concentração do agente redutor, tempo de síntese, entre outros. Dado isso, o pequeno tamanho AgNPs possibilitam diversas aplicações biológicas com propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, bem como citotoxicidade e outras (PRYSHCHEPA *et al.*, 2020).

Os resultados de PDI das amostras JUP1 em 3 mM e 5 mM no decorrer do tempo (Tabela 10) estiveram em sua maioria homogêneas, sem alterações significativas ( $p < 0,05$ ). Vale ressaltar que dentre as amostras de JUP1, alguns dos resultados de PDI foram os mais elevados em relação às amostras de JUP2 e por mais que esses valores sejam considerados menos uniformes, Mankodi *et al.* (2017) revelaram em seu estudo utilizando mel nas concentrações de  $\text{AgNO}_3$  de 0,1, 0,5, 0,7 g que o PDI acima de 0,5 indica AgNPs com boa uniformidade. Além disso, os dados de PDI das amostras JUP2 em 3 mM e 5 mM também indicaram resultados satisfatórios e, no geral, mais próximos a 0, caracterizando uma boa uniformidade das AgNPs (Tabela 10). Czernel *et al.* (2021) estudaram AgNPs de mel da região montanhosa do sul da Polônia e obtiveram resultados de PDI variando de 0,36 a 0,96, confirmando a presença de partículas aglomeradas e homogêneas. Enquanto Dourado *et al.* (2020) alcançaram valores médios de PDI entre 0,36 e 0,28 com características de AgNPs sem aglomeração.

Os resultados de potencial Zeta das amostras JUP1 e JUP2 nas concentrações de 3 mM e 5 mM no decorrer do tempo (Tabela 10) mostram carga positiva de todas para as partículas em todas as leituras e com resultados significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) em relação as leituras do dia 30. Gengan *et al.* (2013) citam que um potencial Zeta superior a +30 mV ou a -30 mV indica estabilidade coloidal. Czernel *et al.* (2021) encontraram potencial Zeta de -23 mV a -43 mV de AgNPs de mel, enquanto Al-Brahim e Mohammed (2020) apresentaram AgNPs sintetizadas de mel de abelha com -0,4 mV de potencial Zeta.

As amostras JUP2 nas concentrações de 3 mM e 5 mM mostram menores valores em módulo de PZ, indicando provável tendência a cargas neutras principalmente nas medidas de 30 dias de ambas as amostras de AgNPs sintetizadas com o mel JUP2 (Tabela 10). Dourado *et al.* (2020) obtiveram em seu estudo um valor de potencial Zeta de -0,39 mV com AgNPs de méis de *Apis Mellifera*. De acordo com Padilha (2014) quando um resultado de potencial Zeta é mais próximo de 0 mV, maiores são os indícios de agregados.

No presente estudo somente cargas positivas do potencial Zeta foram encontradas para as AgNPs sintetizadas utilizando méis de abelha de jupará (*Melipona compressipes manaosensis*) (Tabela 10) e esse resultado pode ser justificado pelo pH das amostras dos méis JUP1 e JUP2 que foram ácidos, conforme a Tabela 6. Isso corrobora com o estudo de Gontijo *et al.* (2020) que sintetizaram AgNPs que exibiram uma mudança de carga de superfície de potencial Zeta para positivo em pH baixo e estiveram estáveis em pH 2,63 até 3,6 em seu estudo. Clébis *et al.* (2022) sintetizaram AgNPs por meio de méis de abelha *Scaptotrigona bipunctata* e obtiveram potencial Zeta com cargas positivas para praticamente todas as amostras em comparação aos méis de abelhas *Apis mellifera*.

Dependendo do método de síntese, as AgNPs podem exibir diferentes cargas superficiais. Dessa forma, os agentes redutores e estabilizadores alteram as cargas de superfícies das nanopartículas e, por fim, podem influenciar em suas atividades biológicas (ZHOU *et al.*, 2012). Radovic-Moreno *et al.* (2012) explicam que as paredes da maioria das bactérias são carregadas negativamente, assim, as nanopartículas carregadas positivamente possuem maior atração eletrostática para se ligar ao microrganismo. Abbaszadegan *et al.* (2015) ressaltam que as AgNPs com cargas positivas possuem melhores atividades antibacterianas contra os microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos.

**Tabela 10** - Características coloidais das AgNPs sintetizadas a partir dos méis das amostras JUP1 e JUP2.

| Amostra    | Tempo (dias) | DH (nm)                   | PdI                        | Potencial Zeta (mV)      |
|------------|--------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|
| JUP1- 3 mM | 30           | 248,9 ± 7,8 <sup>×</sup>  | 0,504 ± 0,106 <sup>×</sup> | 17,9 ± 0,3 <sup>×</sup>  |
| JUP1- 3 mM | 60           | 229,1 ± 7,9 <sup>×</sup>  | 0,449 ± 0,005              | 19 ± 0,1 <sup>×</sup>    |
| JUP1- 3 mM | 90           | 211,7 ± 2,9 <sup>×</sup>  | 0,454 ± 0,001              | 19,1 ± 0,4 <sup>×</sup>  |
| JUP1- 3 mM | 120          | 201,5 ± 2,1 <sup>×</sup>  | 0,439 ± 0,048              | 19,9 ± 0,2 <sup>×</sup>  |
| JUP1- 5 mM | 30           | 229,4 ± 6,1 <sup>*</sup>  | 0,520 ± 0,074 <sup>*</sup> | 17,9 ± 0,1 <sup>*</sup>  |
| JUP1- 5 mM | 60           | 210,5 ± 2,6 <sup>*</sup>  | 0,447 ± 0,030              | 18,9 ± 0,4               |
| JUP1- 5 mM | 90           | 195,2 ± 5,1 <sup>*</sup>  | 0,491 ± 0,039              | 19 ± 0,2 <sup>*</sup>    |
| JUP1- 5 mM | 120          | 180,8 ± 7,9 <sup>*</sup>  | 0,557 ± 0,103              | 19,2 ± 0,7 <sup>*</sup>  |
| JUP2- 3 mM | 30           | 257,5 ± 19,0 <sup>°</sup> | 0,377 ± 0,020 <sup>°</sup> | 8,92 ± 1,2 <sup>°</sup>  |
| JUP2- 3 mM | 60           | 257,3 ± 17,8              | 0,295 ± 0,019 <sup>°</sup> | 10,1 ± 0,2               |
| JUP2- 3 mM | 90           | 147,9 ± 2,6 <sup>°</sup>  | 0,422 ± 0,012              | 12,1 ± 0,1 <sup>°</sup>  |
| JUP2- 3 mM | 120          | 197 ± 5,2 <sup>°</sup>    | 0,295 ± 0,024 <sup>°</sup> | 11,3 ± 0,1 <sup>°</sup>  |
| JUP2- 5 mM | 30           | 226,1 ± 5,8 <sup>˚</sup>  | 0,420 ± 0,029 <sup>˚</sup> | 8,53 ± 0,5 <sup>˚</sup>  |
| JUP2- 5 mM | 60           | 243,2 ± 20,1              | 0,273 ± 0,028 <sup>˚</sup> | 9,99 ± 0,2 <sup>˚</sup>  |
| JUP2- 5 mM | 90           | 135,1 ± 6,7 <sup>˚</sup>  | 0,512 ± 0,050              | 11,7 ± 0,1 <sup>˚</sup>  |
| JUP2- 5 mM | 120          | 174,5 ± 8,7 <sup>˚</sup>  | 0,328 ± 0,049              | 11,5 ± 1,04 <sup>˚</sup> |

\* Os valores estão representados como média ± desvio padrão da média de medidas em triplicata. Análise estatística: teste One-way ANOVA (p<0,05), seguido do teste de Dunnet. Os símbolos (°, \*, °, ˚) representam valores estatisticamente diferentes em relação às medidas do dia 30 (primeira medida) para as amostras dentro de cada parâmetro para cada grupo de AgNPs.

Legenda: JUP1 e JUP2 (AgNPs sintetizadas a partir de jupará (*Melipona compressipes manausensis*). DH: Diâmetro hidrodinâmico, PZ: Potencial Zeta, PdI: Índice de polidispersividade.

Fonte: A autora (2024).

#### 5.4.3 Avaliação das nanopartículas de prata através de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As avaliações por FTIR foram realizadas para identificar os grupamentos químicos possivelmente relacionados às biomoléculas que estão presentes no mel e que podem promover

a redução e estabilização os íons  $\text{Ag}^+$ . A Figura 15 mostra os espectros de FTIR das AgNPs JUP1 e JUP2 nas concentrações de 3 mM e 5 mM.

Tendo em vista que todas as suspensões coloidais foram preparadas a partir da mesma fonte biológica, alterando somente a concentração do sal metálico de prata, apenas sutis desvios foram observados em relação ao comprimento de onda (eixo x). A forte banda em torno de  $3200\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$  corresponde à ligação de grupos hidroxilas (O-H) de compostos fenólicos e flavonoides, que comumente são relacionados à formação de AgNPs biogênicas. Hosny *et al.* (2017) sintetizaram AgNPs a partir de méis egípcios na concentração de  $\text{AgNO}_3$  de 1 mM e identificaram a presença de uma banda em  $3444\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao alongamento O-H de álcoois e fenóis. Além disso, Al-brahim e Mohammed (2020) observaram picos em torno de  $3266\text{ cm}^{-1}$  e  $3300\text{ cm}^{-1}$  ao analisar AgNPs sintetizadas usando méis de *Z. spina-christi* e *A. gerrardii* adquiridas na região de Riyadh, Arábia Saudita, na concentração de  $\text{AgNO}_3$  1 mM e ressaltaram que esses picos podem estar relacionados à presença de carboidratos.

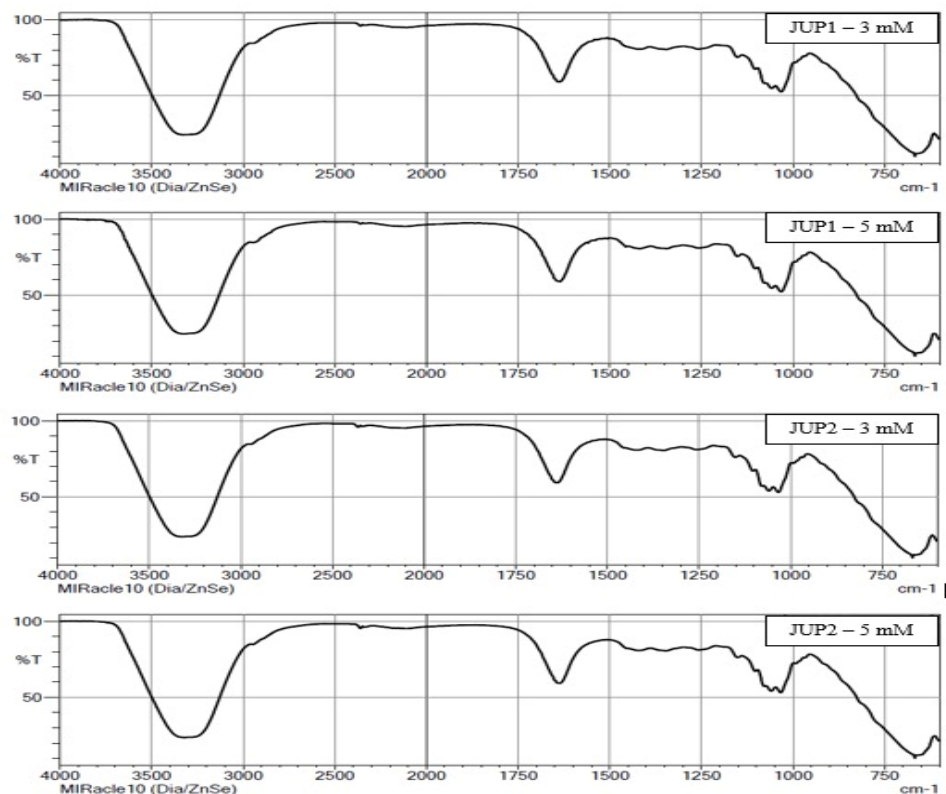
A banda em torno de  $1650\text{ cm}^{-1}$  indica interação de grupos carbonila (C=O) de anéis aromáticos, mas também podem corresponder às aminas aromáticas (N-H) e às ligações carbono-carbono (C=C). Matar *et al.* (2023) tiveram resultados de AgNPs de méis de diferentes regiões da Turquia nas concentrações de soluções de  $\text{AgNO}_3$  (1, 3 e 5 mM) com FTIR possuindo uma banda em  $1643,95\text{ cm}^{-1}$ , correspondente ao estiramento C=O. Al-Zaban *et al.* (2021) relataram a presença de um pico em torno de  $1634,25\text{ cm}^{-1}$  ao analisarem o espectro de FTIR de AgNPs a 1 mM sintetizadas a partir de mel comercial. Recentemente, Ercan (2023) sintetizaram de AgNPs da planta *Nasturtium officinal* com concentração de  $\text{AgNO}_3$  1 mM e que tiveram FITR com banda em  $1622\text{ cm}^{-1}$  a presença de uma ligação C=C. Enquanto Adil *et al.* (2019) detectaram picos entre  $1626\text{ cm}^{-1}$  a  $1637\text{ cm}^{-1}$ , que correspondem às vibrações de estiramento N-H da amida I das proteínas presentes em AgNPs do extrato de *Fagonia indica* em concentrações de 4 mM de  $\text{AgNO}_3$ .

Alguns picos entre  $1000\text{ cm}^{-1}$  e  $1250\text{ cm}^{-1}$  foram observados em todos os espectros das AgNPs. Como o mel é um alimento rico em diversas macromoléculas, como glicose, vitaminas, gorduras, entre outras, a presença desses picos pode indicar a ocorrência de ligações C-O e C-O-C de álcoois primários e de distintos compostos fenólicos que dão ao mel o seu teor antioxidante extensivamente conhecido, além de já terem sido relatadas em outros estudos de AgNPs biogênicas utilizando o mel como agente redutor (AL-ZABAN *et al.*, 2021). Matar *et al.* (2023), tiveram resultados de AgNPs de méis com bandas no FTIR entre  $1028\text{ cm}^{-1}$  e  $255,99\text{ cm}^{-1}$ , correspondentes ao estiramento C-O. Assim como, Stojkovska *et al.* (2019) tiveram

resultados de AgNPs de méis da Sérvia nas concentrações de  $\text{AgNO}_3$  de 3,9 mM e banda na região em torno de  $1200\text{ cm}^{-1}$  originadas das vibrações de flexão C–O.

O pico próximo de  $650\text{ cm}^{-1}$  indica vibrações de alongamento referentes à ligação N–O que é característica do sal metálico, corroborando com o estudo de Ghramh *et al.* (2020) onde o espectro de FTIR de AgNPs de méis de *Apis mellifera ligustica* apresentaram bandas de  $600\text{ cm}^{-1}$  com intensidade baixa. Alguns estudos descrevem que a ocorrência de bandas abaixo de  $1000\text{ cm}^{-1}$  é oriunda da ligação Ag–O–H, onde o oxigênio e hidrogênio pertencem às biomoléculas adsorvidas na superfície das AgNPs (DUA *et al.*, 2023; PRABULA *et al.*, 2022).

**Figura 15** - Espectros de FTIR de AgNPs sintetizadas a partir dos méis de abelha sem ferrão JUP1 e JUP2 nas concentrações de 3 mM e 5 mM.



Fonte: A autora (2024).

#### 5.4.4 Análise morfológica das AgNPs

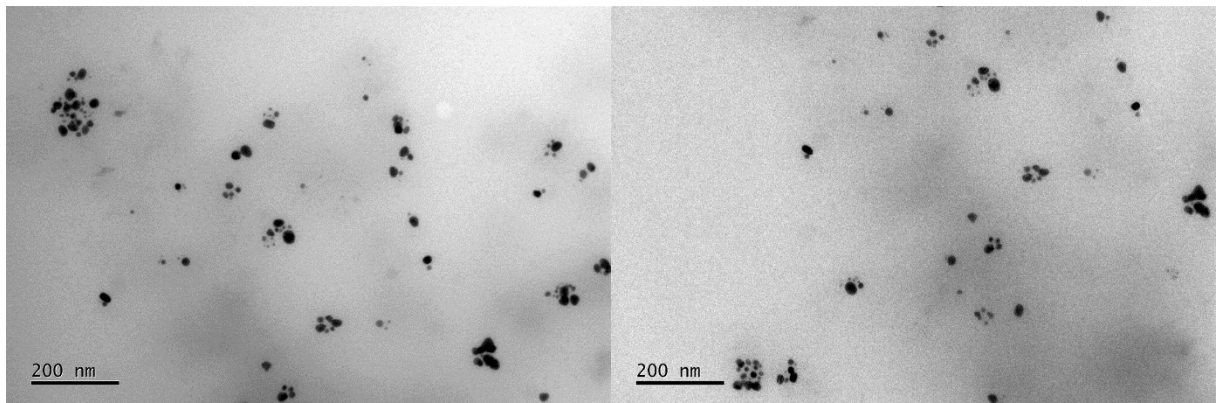
A análise morfológica das AgNPs obtida pelo MET demonstra formas predominantemente esferoidais nas amostras JUP1 e JUP2 nas concentrações de 3 mM e 5 mM (Figuras 16, 17, 18 e 19), o que corrobora com o estudo Oskuee *et al.* (2016) que ao sintetizar AgNPs a partir de méis naturais observaram formatos esféricos, com tamanho médio de  $11,8 \pm 4,90\text{ nm}$ . Al-Zaban *et al.* (2021) também sintetizaram AgNPs esféricas e com tamanho médio

entre 5 a 25 nm. Hosny *et al.* (2017) visualizaram a mesma forma esférica para AgNPs de méis do mercado egípcio. Do mesmo modo, El-Desouky e Ammar (2016) mostraram os mesmos contornos em MET com tamanhos que variaram entre 9 e 22 nm para AgNPs utilizando mel egípcio. Enquanto Al-brahim e Mohammed (2020) relataram diâmetros médios de 200 nm para AgNPs sintetizadas com méis de abelha derivados de duas fontes florais diferentes, com forma de esfera, bordas lisas e bem distribuídas.

Foram também visualizadas outras morfologias nas imagens de MET das AgNPs JUP1 e JUP2, como por exemplo formato de bastões e triangulares nas Figuras 16, 17, 18 e 19, corroborando com o estudo de Youssef *et al.* (2019) que ao analisar a micrografias por TEM revelou que as AgNPs de méis naturais de um mercado egípcio estavam bem dispersas e predominantemente com forma esférica, enquanto alguns tinham formato irregulares. Além disso, Singh *et al.* (2018) analisaram por MET AgNPs sintetizados por extrato da folha de *Symphytum officinale* e visualizaram formato irregular.

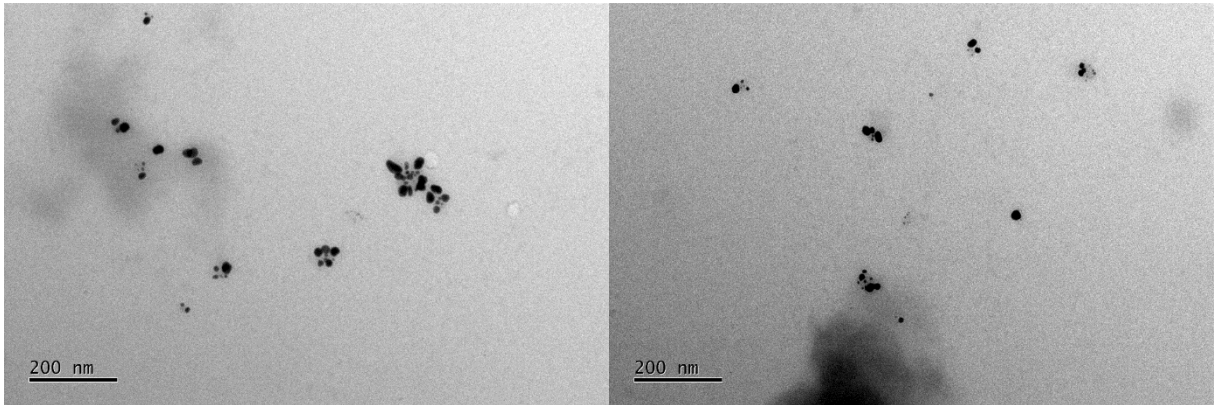
Essa variedade de formas das AgNPs depende de vários fatores, como esclarece Zheng *et al.* (2015) que descreveram que as AgNPs sintetizadas por rotas de síntese verde possuem diversas morfologias e tamanhos. Alayande *et al.* (2021) esclarecem que a concentração de um agente redutor e a temperatura da reação favorecem diferentes morfologias. Além disso, a forma e o diâmetro de AgNPs observadas por MET também são influenciadas pelas concentrações do precursor como o  $\text{AgNO}_3$ , tipo do extrato natural e o tempo de reação (BHAUMIK *et al.*, 2015). Dessa forma, Pryshchepa *et al.* (2020) concluíram que as morfologias das AgNPs influenciam nas suas propriedades, pois levam à mudanças na relação superfície-volume.

**Figura 16-** Eletromicrografias das AgNPs-JUP1 na concentração de 3 mM.



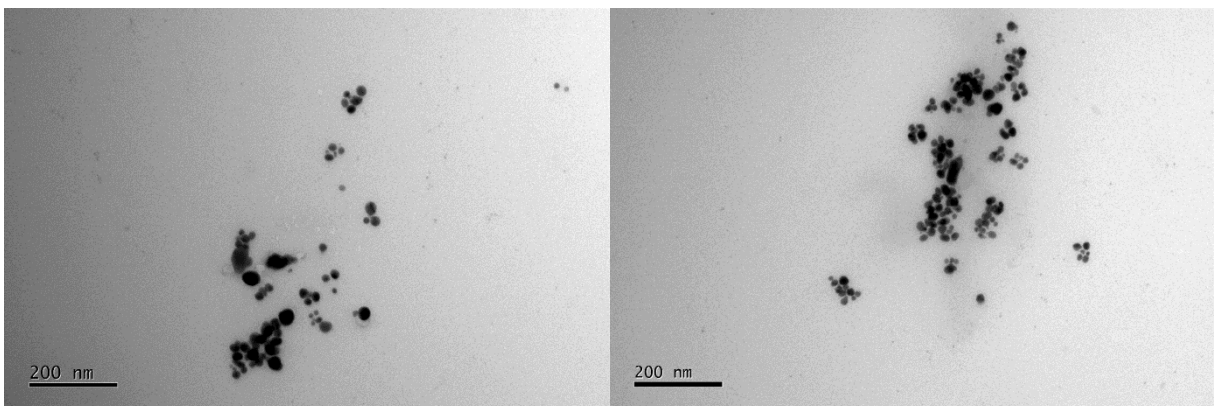
Fonte: A autora (2024).

**Figura 17-** Eletromicrografias das AgNPs-JUP1 na concentração de 5 mM.



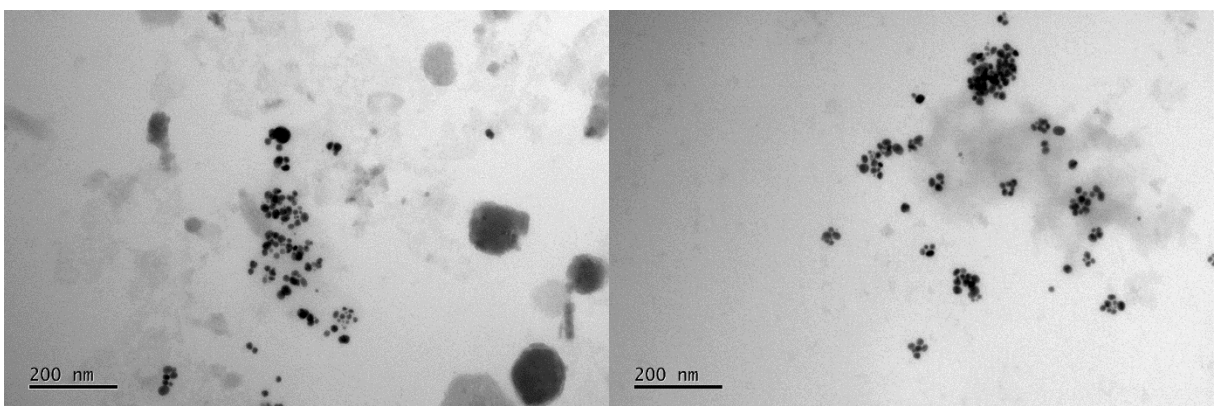
Fonte: A autora (2024).

**Figura 18-** Eletromicrografias das AgNPs-JUP2 na concentração de 3 mM.



Fonte: A autora (2024).

**Figura 19-** Eletromicrografias das AgNPs-JUP2 na concentração de 5 mM.



Fonte: A autora (2024).

A partir da análise dos resultados das caracterizações físico-químicas e morfológicas das AgNPs nas concentrações de 3 mM e 5 mM pôde-se observar similaridades entre os diâmetros, cargas superficiais e formas. Assim, para os ensaios de toxicidade e de cicatrização *in vivo* no presente estudo, optou-se por utilizar as AgNPs-JUP1 e AgNPs-JUP2 na concentração de 3 mM. De acordo com Htwe *et al.* (2019) as AgNPs com uma menor concentração de  $\text{AgNO}_3$  podem ter menor tamanho e maior área de superfície. Além disso,

escolher a menor concentração do sal metálico é também muito mais econômico e pode evitar efeitos biológicos causados pela liberação de cátions  $\text{Ag}^+$  livres em suspensão (BASOGLU e AKAR *et al.*, 2022).

## 5.5 Ensaio de Toxicidade

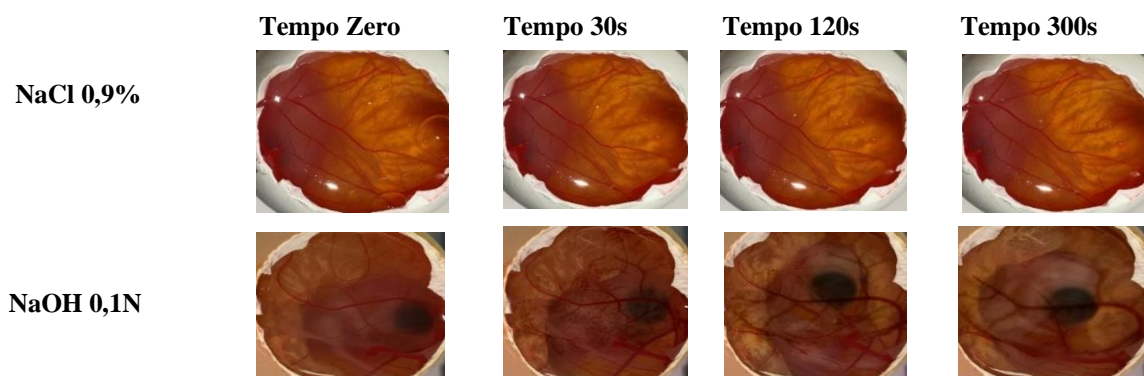
### 5.5.1 Toxicidade ocular aguda

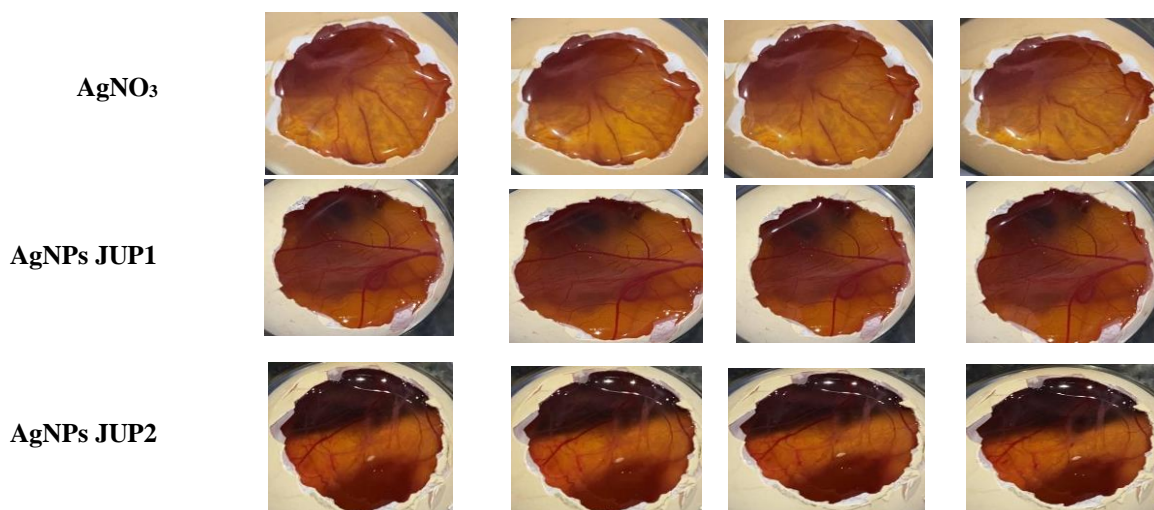
Não foi visualizado nenhum sinal de lise, hemorragia e coagulação nos grupos testes de  $\text{AgNO}_3$ , AgNPs de JUP1, AgNPs de JUP2 na concentração de 3 mM e o grupo contendo somente NaCl (0,9%), classificando-os como “não rotulado” ou como “substâncias não irritantes”. Já o grupo controle positivo apresentou uma pontuação de  $17,60 \pm 0,75$  que confirma a atividade tóxica do NaOH 0,1N e o classifica como produto indutor de “Irritação grave”, conforme Tabela 11 e Figura 20.

No estudo de Reire *et al.* (2015), a citotoxicidade das AgNPs foi avaliada com base em sinais de alteração vascular na membrana corioalantóica utilizando o teste do ovo de galinha (HET-CAM) e as nanoestruturas provaram não ser irritantes pois não foram capazes de promover vasoconstrição, hemorragia ou coagulação. De acordo com Hadrup *et al.* (2018), diversos estudos sobre os efeitos das AgNPs não mostram grande irritação nos olhos.

Apesar dos grupos com  $\text{AgNO}_3$  e AgNPs não apresentarem toxicidade ocular, esse teste é essencial pois, segundo Araújo *et al.* (2012) e Zhu *et al.* (2019), a toxicidade das AgNPs possui influência das suas propriedades físico-químicas como o tamanho, a forma, a carga superficial, a dose e o revestimento. Vale ressaltar que os componentes químicos, como metais pesados ou outros tipos de elementos tóxicos, podem causar diferentes níveis de toxicidade ocular e ainda invadir facilmente a barreira protetora ocular (BAHADAR *et al.*, 2016).

**Figura 20** - Sequência de fotografias ilustrando o efeito da administração de 300 $\mu\text{L}$  de NaOH 0,1N (controle positivo), NaCl a 0,9% (controle negativo),  $\text{AgNO}_3$ , AgNPs JUP1 e AgNPs JUP2 ao longo de um período de 5 min, sobre a CAM.





Fonte: A autora (2024).

**Tabela 11-** Pontuação de irritação e classificação do produto conforme ao índice de irritação no teste de membrana cório-alantóide do ovo de galinha.

\*\* Diferença estatística apresentada quando comparada com o grupo controle soro fisiológico ( $p \leq 0,0001$ ;  $n=3$ ). Os resultados foram expressos em Média ( $\pm$  E.P.M.). ANOVA One-way, Teste de Múltipla Comparação de Tukey.

| Substância        | Índice de Irritação (Score) | Classificação   |
|-------------------|-----------------------------|-----------------|
| NaCl 0,9%         | 0,0 ( $\pm$ 0,0)            | Não rotulado    |
| NaOH 0,1 N        | 17,60 ( $\pm$ 0,75) **      | Irritação grave |
| AgNO <sub>3</sub> | 0,0 ( $\pm$ 0,0)            | Não rotulado    |
| AgNPs JUP1        | 0,0 ( $\pm$ 0,0)            | Não rotulado    |
| AgNPs JUP2        | 0,0 ( $\pm$ 0,0)            | Não rotulado    |

Fonte: A autora (2024).

### 5.5.2 Toxicidade dérmica aguda

Ao se observar a pele, após o período de 24 h da tricotomia realizada no dorso dos animais, não foi visualizado nenhum sinal de toxicidade, como exemplificado na Figura 21. Além disso, no decorrer dos 14 dias de observação, notou-se que a pele dos animais dos grupos experimentais se manteve íntegra, sendo detalhado na tabela 12 que o grau de reação que cada tratamento exerceu nos animais foi 0 já que não foi observada a formação de eritema/escaras ou de edema causados pelo AgNO<sub>3</sub> e pelas AgNPs de JUP1 e AgNPs de JUP2 na concentração de 3 mM.

**Figura 21** - Pele íntegra do animal do grupo AgNPJUP1 após 24 h de observação



Fonte: A autora (2024).

**Tabela 12** - Resultado da toxicidade dérmica com teste de uma única aplicação com observação diária por 14 dias (n=3).

| Animal | GNJUP1          |        | GNJUP2          |        | NaCl 0,9%       |        |
|--------|-----------------|--------|-----------------|--------|-----------------|--------|
|        | Eritema/Escaras | Edema  | Eritema/Escaras | Edema  | Eritema/Escaras | Edema  |
| 1      | Grau 0          | Grau 0 | Grau 0          | Grau 0 | Grau 0          | Grau 0 |
| 2      | Grau 0          | Grau 0 | Grau 0          | Grau 0 | Grau 0          | Grau 0 |
| 3      | Grau 0          | Grau 0 | Grau 0          | Grau 0 | Grau 0          | Grau 0 |

Fonte: A autora (2024).

No decorrer dos dias de experimento não foram visualizados sinais clínicos adversos nos animais, isto é, não houve alterações dos comportamentos das ratas, além de não terem sido observados sinais de aparecimento de toxicidade e não houve mortalidade dos animais até o 14º dia de observação. Além disso, também não houve mudanças no consumo de alimentos ou água durante o período de exposição e não teve alterações significativas no peso corporal das ratas nos grupos testes AgNPs de JUP1 e AgNPs de JUP2 em comparação ao grupo controle (Tabela 13).

Nossos resultados corroboram com o estudo de Padilla-Camberos *et al.* (2022) que testou a toxicidade dérmica aguda de AgNPs de sintetizadas com extrato de casca de *Stenocereus queretaroensis* nas concentrações de 2 mM em ratas fêmeas, conforme as recomendações das diretrizes 402 da OCDE de 2017 e observaram que não houve alterações na pele, pelagem, olhos, mucosas, padrões de comportamento ou nos sistemas respiratório e circulatório. Além disso, todos os animais se mantiveram vivos até o 14º dia de observação e também não houve diferença significativa no peso corporal das ratas. Em um estudo recente, Andleeb *et al.* (2023) sintetizaram AgNPs utilizando extrato de *Trillium govanianum* e os resultados *in vivo* dos testes de toxicidade dérmica aguda revelaram que nenhuma anormalidade na camada epidérmica e dérmica foi observada.

Além disso, Andleeb *et al.* (2022) avaliou a toxicidade dérmica causada por AgNPs sintetizadas por raízes e partes aéreas de *Ajuga bracteosa* na concentração de 1 mM em ensaio

*in vivo* com camundongos albinos suíços. Após a observação dos animais por 14 dias, os autores constataram que no decorrer de 24 h o sítio dérmico não apresentava nenhum sinal de inflamação ou irritação e nenhum sinal de toxicidade foi observado quando os animais foram acompanhados por 14 dias, bem como não houve mortalidade detectada durante todos os dias de observação. Em outro estudo também não foram observados sinais de toxicidade dérmica aguda de AgNPs sintetizadas por meio de síntese verde de extratos aquosos de folhas de *Elaeis guineensis* (FOKOU *et al.*, 2023).

**Tabela 13** - Peso (g) dos animais expostos dermicamente às AgNPs em comparação ao grupo controle NaCl 0,9%.

| Grupo     | Dia 0         | Dia 07       | Dia 14        |
|-----------|---------------|--------------|---------------|
| GNJUP1    | 213,33±14,05  | 223,00±9,85  | 232,33± 12,86 |
| GNJUP2    | 201,67±14,84  | 209,33±11,37 | 215,33±14,43  |
| NaCl 0,9% | 175,00± 14,11 | 182,33±10,69 | 196,00±19,97  |

Legenda: Os valores estão representados como média ± desvio padrão da média de medidas em triplicata. Análise estatística: Teste de Tukey com o nível de significância de valor  $p \leq 0,05$ .

Fonte: A autora (2024).

Ao final do 14<sup>o</sup> dia foi feita a necropsia macroscópica após a eutanásia dos animais e foi observado que não houve alterações patológicas relevantes nos grupos experimentais AgNPJUP1 e AgNPJUP2 em comparação ao grupo controle. No estudo de Padilla-Camberos *et al.* (2022) também não foram visualizadas alterações macroscopicamente relevantes nos órgãos internos quando comparados ao grupo controle.

## 5.6 Avaliação microbiológica *in vivo*

Na Tabela 14 são observadas as contagens da *S. aureus* apenas nos tempos de 0h, 36h, 72h e 7 dias uma vez que no 14<sup>o</sup> dia as feridas já se encontraram fechadas. Na análise antibacteriana *in vivo* das feridas antes da indução da infecção no tempo de 0h foi observado que as amostras já apresentavam um mínimo crescimento de *S. aureus* mesmo após o cuidado com a assepsia no momento da coleta. Apesar dessa contaminação inicial, Angel *et al.* (2011) e Bowler (2003) relatam que a interação entre o hospedeiro e as bactérias determinarão a influência na cicatrização de feridas e não apenas a presença do microrganismo, porém certas combinações de bactérias podem atenuar ou exacerbar os efeitos locais no ferimento devido a produção de toxinas, a formação de biofilme e a competição entre espécies.

Observa-se na análise qualitativa, demonstrada na Tabela 14, um crescimento variável da contagem da *S. aureus* entre os grupos da pesquisa e dentro de uma mesma categoria, sendo notado o aumento, inibição e crescimento incontável da bactéria. De acordo com Serena *et al.*

(2021), apesar da imprecisão da análise semiquantitativa usando *swabs*, ela é amplamente utilizada e é relativamente barata em comparação ao método de cultura quantitativa de biópsias (padrão ouro) e técnicas moleculares que são mais precisos para a prática clínica na detecção exata da bactéria e principalmente para verificar a carga bacteriana, controlando o uso indevido de antimicrobianos no tratamento de feridas.

Apesar da variabilidade no crescimento da *S. aureus*, a análise qualitativa da Tabela 14, mostrou uma contagem menor do crescimento bacteriano no sétimo dia dos grupos das AgNPs sintetizadas utilizando o mel JUP1 em comparação ao grupo de AgNPs de JUP2 que tiveram em pelo menos dois animais a contagem incalculável da bactéria. Além disso, foi observada maior redução na contagem bacteriana no grupo controle positivo (pomada de sulfato de neomicina) que teve apenas um indivíduo com contagem incalculável. No entanto, a contagem de *S. aureus* no grupo de controle negativo (NaCl a 0,9%) foi significativamente superior a dos outros grupos e definido como incontável o número de colônias da bactéria na maioria dos animais. O número incontável de *S. aureus* visto nos grupos de AgNPs sintetizadas utilizando os méis corrobora com o estudo de Meikle *et al.* (2020) que explica que a espessa parede celular das bactérias Gram-positivas pode reduzir a penetração de AgNPs nas suas células.

De acordo com Mcloone *et al.* (2020), a aplicação tópica do mel é recomendada para o manejo clínico de infecções de feridas e, apesar da utilidade do mel na cicatrização de feridas, as infecções crônicas continuam a ser um problema global que requerem protocolos de tratamento que otimizem as interações sinérgicas ou aditivas por meio do mel. Adibhesami *et al.* (2017) avaliaram o efeito de AgNPs (20 nm de diâmetro) em feridas cutâneas induzidas cirurgicamente e inoculadas com *S. aureus* e os grupos de AgNPs (0,04 mg kg<sup>-1</sup> e 0,02 mg kg<sup>-1</sup>) tiveram uma leve e significativa redução na contagem bacteriana em comparação ao grupo controle negativo (solução salina). Já os grupos de AgNPs de 0,08 mg kg<sup>-1</sup> e gentamicina (grupo controle positivo) tiveram menor número de colônias do microrganismo em comparação aos outros grupos e foi visualizado também que alguns animais tiveram incontáveis números de colônias de bactérias em todos os grupos.

Na busca na literatura há poucos estudos relatando atividade antimicrobiana em ensaios *in vivo* envolvendo méis e AgNPs sintetizadas a partir de méis de abelha. Hillebrand *et al.* (2021) relatam a importância da análise *in vivo* e os efeitos realistas do uso do produto, diluição e a capacidade do tecido responder às perturbações. Além disso, Malone *et al.* (2023) reforçam que é aconselhável desenvolver estudos que imitem de perto as condições clínicas.

**Tabela 14** - Contagem por unidade de *S. aureus* das feridas dos animais tratados com AgNPs de JUP 1, AgNPs de JUP 2, mel de JUP 1, mel de JUP 2, Soro fisiológico 0,9% e pomada sulfato de neomicina.

| <b>GRUPO AgNPs de JUP 1</b> |               |            |            |               |                |           |            |            |                |
|-----------------------------|---------------|------------|------------|---------------|----------------|-----------|------------|------------|----------------|
| <b>An.</b>                  | <b>7 DIAS</b> |            |            |               | <b>14 DIAS</b> |           |            |            |                |
|                             | <b>0h</b>     | <b>36h</b> | <b>72h</b> | <b>7 DIAS</b> | <b>An.</b>     | <b>0h</b> | <b>36h</b> | <b>72h</b> | <b>14 DIAS</b> |
| <b>1</b>                    | 6             | 38         | 6          | 0             | <b>1</b>       | 22        | 136        | 71         | FF             |
| <b>2</b>                    | 23            | 18         | INC        | INC           | <b>2</b>       | 3         | INC        | 94         | FF             |
| <b>3</b>                    | 32            | INC        | 7          | 2             | <b>3</b>       | 2         | INC        | INC        | FF             |
| <b>4</b>                    | 17            | 94         | 48         | 16            | <b>4</b>       | 2         | 130        | 72         | FF             |
| <b>5</b>                    | 0             | 151        | 87         | 65            | <b>5</b>       | 10        | INC        | INC        | FF             |

| <b>GRUPO MEL JUP 1</b> |               |            |            |               |                |           |            |            |                |
|------------------------|---------------|------------|------------|---------------|----------------|-----------|------------|------------|----------------|
| <b>An.</b>             | <b>7 DIAS</b> |            |            |               | <b>14 DIAS</b> |           |            |            |                |
|                        | <b>0h</b>     | <b>36h</b> | <b>72h</b> | <b>7 DIAS</b> | <b>An.</b>     | <b>0h</b> | <b>36h</b> | <b>72h</b> | <b>14 DIAS</b> |
| <b>1</b>               | 7             | 15         | 4          | 22            | <b>1</b>       | 14        | INC        | INC        | FF             |
| <b>2</b>               | 12            | 21         | INC        | 169           | <b>2</b>       | 24        | INC        | INC        | FF             |
| <b>3</b>               | 5             | 28         | 179        | 152           | <b>3</b>       | 85        | 119        | 52         | FF             |
| <b>4</b>               | 3             | 4          | 5          | 2             | <b>4</b>       | 52        | INC        | INC        | FF             |
| <b>5</b>               | 5             | 98         | INC        | 163           | <b>5</b>       | 15        | 19         | 152        | FF             |

| <b>GRUPO CONTROLE SORO FISIOLÓGICO 0,9%</b> |               |            |            |               |                |           |            |            |                |
|---|---------------|------------|------------|---------------|----------------|-----------|------------|------------|----------------|
| <b>An.</b>                                  | <b>7 DIAS</b> |            |            |               | <b>14 DIAS</b> |           |            |            |                |
|   | <b>0h</b>     | <b>36h</b> | <b>72h</b> | <b>7 DIAS</b> | <b>An.</b>     | <b>0h</b> | <b>36h</b> | <b>72h</b> | <b>14 DIAS</b> |
| <b>1</b>                                    | 32            | INC        | INC        | 42            | <b>1</b>       | 2         | INC        | INC        | FF             |
| <b>2</b>                                    | 0             | INC        | INC        | INC           | <b>2</b>       | 0         | INC        | 89         | FF             |
| <b>3</b>                                    | 24            | INC        | INC        | INC           | <b>3</b>       | 3         | INC        | INC        | FF             |
| <b>4</b>                                    | 27            | INC        | INC        | INC           | <b>4</b>       | 0         | INC        | INC        | FF             |
| <b>5</b>                                    | 23            | INC        | INC        | INC           | <b>5</b>       | 2         | INC        | INC        | FF             |

| <b>GRUPO AgNPs de JUP 2</b> |               |            |            |               |                |           |            |            |                |
|-----------------------------|---------------|------------|------------|---------------|----------------|-----------|------------|------------|----------------|
| <b>An.</b>                  | <b>7 DIAS</b> |            |            |               | <b>14 DIAS</b> |           |            |            |                |
|                             | <b>0h</b>     | <b>36h</b> | <b>72h</b> | <b>7 DIAS</b> | <b>An.</b>     | <b>0h</b> | <b>36h</b> | <b>72h</b> | <b>14 DIAS</b> |
| <b>1</b>                    | 0             | 3          | 23         | 45            | <b>1</b>       | 4         | 19         | INC        | FF             |
| <b>2</b>                    | 0             | 1          | 81         | INC           | <b>2</b>       | 0         | 2          | INC        | FF             |
| <b>3</b>                    | 2             | 3          | INC        | INC           | <b>3</b>       | 0         | 2          | 81         | FF             |
| <b>4</b>                    | 1             | 3          | INC        | 4             | <b>4</b>       | 1         | 2          | INC        | FF             |
| <b>5</b>                    | 4             | 7          | INC        | 27            | <b>5</b>       | 0         | 0          | 231        | FF             |

| <b>GRUPO MEL JUP 2</b> |               |            |            |               |                |           |            |            |                |
|------------------------|---------------|------------|------------|---------------|----------------|-----------|------------|------------|----------------|
| <b>An.</b>             | <b>7 DIAS</b> |            |            |               | <b>14 DIAS</b> |           |            |            |                |
|                        | <b>0h</b>     | <b>36h</b> | <b>72h</b> | <b>7 DIAS</b> | <b>An.</b>     | <b>0h</b> | <b>36h</b> | <b>72h</b> | <b>14 DIAS</b> |
| <b>1</b>               | 4             | 1          | 5          | 12            | <b>1</b>       | 4         | 18         | 24         | FF             |
| <b>2</b>               | 8             | 1          | INC        | INC           | <b>2</b>       | 1         | 2          | 4          | FF             |
| <b>3</b>               | 2             | 8          | 12         | 28            | <b>3</b>       | 37        | 9          | 54         | FF             |
| <b>4</b>               | 2             | 18         | 15         | 3             | <b>4</b>       | 1         | 2          | 4          | FF             |
| <b>5</b>               | 1             | 12         | 34         | 47            | <b>5</b>       | 8         | 122        | 198        | FF             |

| <b>GRUPO CONTROLE POMADA</b> |               |            |            |               |                |           |            |            |                |
|------------------------------|---------------|------------|------------|---------------|----------------|-----------|------------|------------|----------------|
| <b>An.</b>                   | <b>7 DIAS</b> |            |            |               | <b>14 DIAS</b> |           |            |            |                |
|                              | <b>0h</b>     | <b>36h</b> | <b>72h</b> | <b>7 DIAS</b> | <b>An.</b>     | <b>0h</b> | <b>36h</b> | <b>72h</b> | <b>14 DIAS</b> |

|          |   |    |     |   |          |   |    |    |    |
|----------|---|----|-----|---|----------|---|----|----|----|
| <b>1</b> | 2 | 10 | 35  | 0 | <b>1</b> | 5 | 0  | 3  | FF |
| <b>2</b> | 0 | 26 | 43  | 0 | <b>2</b> | 0 | 1  | 3  | FF |
| <b>3</b> | 2 | 4  | 15  | 0 | <b>3</b> | 0 | 15 | 10 | FF |
| <b>4</b> | 3 | 47 | 23  | 6 | <b>4</b> | 2 | 0  | 4  | FF |
| <b>5</b> | 0 | 12 | INC | 7 | <b>5</b> | 2 | 5  | 4  | FF |

Legenda: An: Animal, INC: Incontável Número de Colônias, FF: Ferida fechada.

Fonte: A autora (2024).

### 5.7 Avaliação macroscópica da cicatrização

Macroscopicamente, na avaliação morfométrica da área inicial da ferida após o procedimento cirúrgico no TEMPO 0h (Tabela 15, Figura 22), as feridas não diferiram estatisticamente entre os grupos GMJUP1, GNJUP1, GNJUP2, GCS e GCP, exceto no grupo GMJUP2 que foi estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ). Em relação ao dia 3 e 7 houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) na contração das feridas entre os grupos testados. A partir do dia 14 de pós-operatório as feridas de todos os animais apresentaram completa cicatrização e não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Comparando os resultados em relação à contração das feridas nos grupos no dia 3 (Tabela 15, Figura 22), os animais dos grupos GNJUP1, GNJUP2 e GMJUP1 apresentaram feridas menores e não diferiram do grupo GCS, porém a área de cicatrização foi estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ) daquelas dos grupos GMJUP2 e GCP, que apresentaram as maiores lesões. Apesar do grupo GMJUP2 ter tido uma das menores contrações da ferida no dia 3 e ter apresentado uma ferida maior no tempo 0h, ele não diferiu do grupo GCS no dia 3 (Tabela 15, Figura 22). Yilmaz e Aygin (2020) justificam que o mel dificulta a infestação bacteriana, reduz o pH, aumenta a atividade antioxidante, aumenta a geração de peróxido e libera citocinas pró-inflamatórias durante a fase inflamatória.

De acordo com Scherrer *et al.* (2023), pode ocorrer a sensibilização da pele à neomicina e devido a isso são necessárias prescrições criteriosas, apesar desse fármaco ser amplamente disponibilizado em formulações farmacêuticas. Além disso, Yan *et al.* (2018) descrevem que o processo de cicatrização de feridas pode ser influenciado por fatores de crescimento e citocinas, podendo levar ao aumento da morbidade e mortalidade, desconforto e resultados farmacológicos ruins. Apesar das citocinas ativarem substâncias necessárias para a resposta inflamatória e a produção de colágeno, também podem contribuir para a cicatrização inadequada.

No dia 7 não houve diferença significativa entre os grupos GCS, GMJUP1, GNJUP1 e GNJUP2 e verificou-se que tais grupos tiveram os menores tamanhos das feridas, diferindo em

relação ao GCP e GMJUP2, que entre si não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no dia 7 (Tabela 15, Figura 22). De acordo com Bahari *et al.* (2022), apesar da eficiência do mel contra microrganismos em curativos de feridas, mais estudos são necessários para confirmar seu comportamento em um ambiente *in vivo*. De acordo com Yupanqui Miele *et al.* (2022) o mel possui variedade de sua qualidade e depende fortemente da origem botânica e geográfica, das espécies de abelhas e dos métodos de produção. Esta variedade leva a diferentes níveis e consistência de eficácia antimicrobiana.

Em relação a evolução da ferida de acordo com os períodos de avaliação, notou-se que todos os grupos apresentaram redução entre 3, 7 e 14 dias (feridas fechadas) (Figura 22), o grupo GNJUP1 apresentou maior redução da área da ferida no dia 3, apesar de não se diferir estatisticamente ( $p < 0,05$ ) dos grupos GCS, GMJUP1, GNJUP2. Já no dia 7, o grupo GNJUP1 permaneceu com um dos menores tamanhos de feridas mesmo que não tenha diferido estatisticamente dos grupos GCS, GMJUP1 e GNJUP2 (Tabela 15, Figura 22). De acordo com Bahari *et al.* (2022), reforça a necessidade crítica de compreender a seleção apropriada do mel para a síntese de nanomateriais, bem como identificar as proteínas do mel mais prevalentes, responsáveis pela estabilização de íons metálicos na formação de nanopartículas.

O estudo de Rani *et al.* (2018) avaliou o efeito combinado de AgNPs sintetizadas por mel multifloral que foram aplicadas topicamente em feridas infectadas com *P. aeruginosa* e tiveram os melhores percentuais de fechamento das lesões no dia 1, 5, 10 e 15 em comparação ao grupo do mel aplicado isoladamente, apesar de que as feridas em todos os grupos experimentais eram quase iguais no início. No estudo de Guruvu *et al.* (2022), que sintetizou AgNPs utilizando mel, foi demonstrando um melhor percentual de fechamento das feridas infectadas com *S. aureus* em relação ao mel sozinho e ao controle. Além disso, Osman *et al.* (2022) sintetizaram AgNPs utilizando de extrato aquoso de caules de *Tinospora crispa* e em ensaios *in vivo* verificaram a aceleração da cicatrização de feridas em ratos.

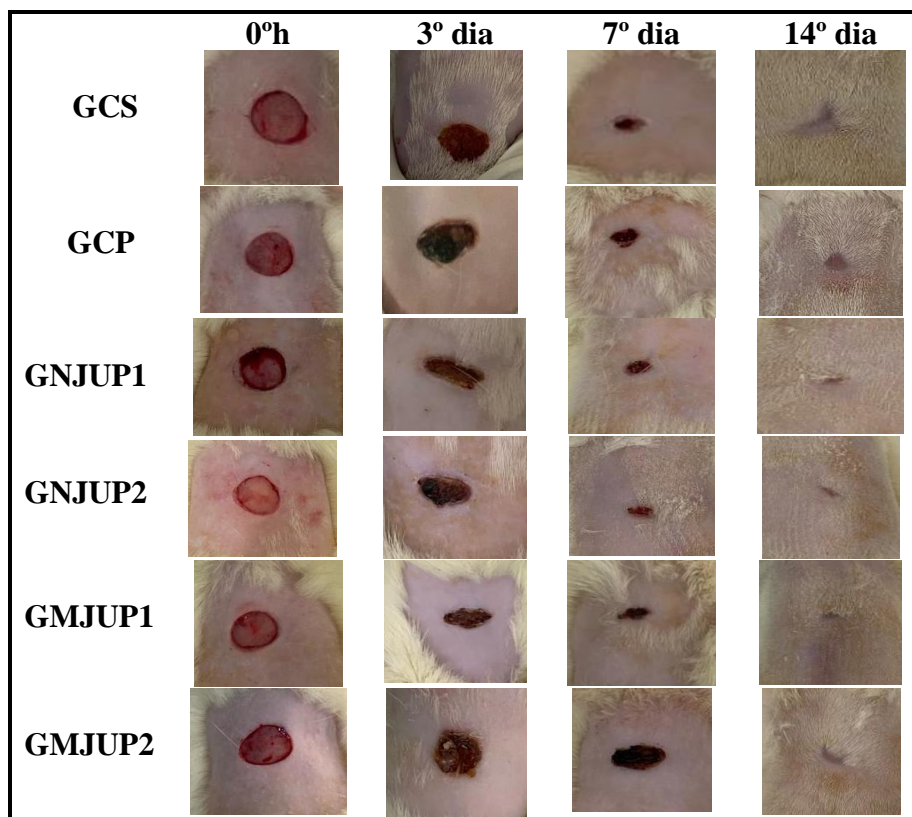
De acordo com Jaldin-Crespo *et al.* (2022) os nanomateriais podem ser usados sinergicamente e aprimorados com o mel devido a presença de compostos fenólicos, polifenóis, enzimas e outros. A consolidação do uso terapêutico de bionanomateriais a partir do mel ainda é limitada devido à complexidade do processo de cicatrização de lesões teciduais, barreiras no modelo de estudo, especialmente modelo de feridas crônicas e o impacto desse tratamento no aumento da resistência aos microrganismos. No entanto, Bahari *et al.* (2022) citam que apesar dessas limitações, são debatidos avanços recentes em nanopartículas sintetizadas utilizando o mel para cicatrização de feridas.

**Tabela 15** - Área de cicatrização das feridas nos dias que foram realizadas as medições.

| Tratamento | Tempo (dia)  |               |               |          |
|------------|--------------|---------------|---------------|----------|
|            | 0            | 3             | 7             | 14       |
| GCP        | 0,75± 0,10 B | 0,64± 0,11 A  | 0,14± 0,05 AB | 0,0      |
| GCS        | 0,78± 0,13 B | 0,56±0,10 ABC | 0,11± 0,03 B  | 0,0±0,0  |
| GMJUP1     | 0,77± 0,13 B | 0,50± 0,12 BC | 0,11± 0,02 B  | 0,0 ±0,0 |
| GMJUP2     | 0,9± 0,09 A  | 0,58± 0,15 AB | 0,24± 0,08 A  | 0,0 ±0,0 |
| GNJUP1     | 0,77± 0,11 B | 0,47± 0,07 C  | 0,11± 0,02 B  | 0,0 ±0,0 |
| GNJUP2     | 0,70± 0,08 B | 0,51± 0,06 BC | 0,10± 0,00 B  | 0,0 ±0,0 |

Legenda: Médias seguidas pela letra maiúscula crescente na linha com desdobramento realizado pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: A autora (2024).

**Figura 22** - Evolução da contração da ferida nos dias: 0, 3, 7 e 14 dias.

Legenda: GCS = Grupo Controle Soro fisiológico; GCP= Grupo Controle Positivo; GMJUP1: Grupo Mel Jupará amostra 1, GMJUP2: Grupo Mel Jupará amostra 2, GNJUP1: Grupo Nanopartícula com Jupará amostra 1, GNJUP2: Grupo Nanopartícula com Jupará amostra 2.

Fonte: A autora (2024).

## 5.8 Avaliação microscópica da cicatrização

### 5.8.1 Avaliação de fibroblastos e densidade vascular

No dia 7, a média dos fibroblastos nos animais do grupo GMJUP2 (119,95) foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que a média dos outros grupos. Por sua vez, os grupos

GCP (80,66), GNJUP2 (78,66) e GMJUP1 (66,26) não tiveram diferenças significativas entre si ( $p < 0,05$ ). No entanto, os grupos GNJUP2 e GMJUP1 não diferiram estatisticamente do grupo GCS (62,98) ( $p < 0,05$ ). Por fim, o grupo GNJUP1 (59,54) teve a menor contagem de fibroblastos no dia 7, porém não se diferenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) dos grupos GMJUP1 e GCS (Tabela 16).

O número de fibroblastos foi maior no grupo GMJUP2 no sétimo dia (Tabela 16), apesar de ter tido uma área de lesão maior no tempo 0h e dia 7, conforme a Tabela 15. De acordo com Wang; Li (2011) e Tan *et al.* (2012), o mel possui flavonoides, compostos fenólicos e enzimas, além de grandes quantidades de aminoácidos que podem promover a deposição de fibroblastos. Isso corrobora com o estudo de Medeiros *et al.* (2016) que tratou feridas infectadas por *S. aureus* utilizando o mel de *Melipona scutellaris* e observaram maior deposição de fibroblastos e colágeno em relação ao grupo controle.

No décimo quarto dia, a média dos fibroblastos do grupo GCS (105,48) foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) do que a média dos outros grupos. Além disso, a contagem de fibroblastos nos grupos GMJUP2 (50,80) e GCP (35,44) não apresentou diferenças significativas entre si ( $p < 0,05$ ). Da mesma forma, o grupo GNJUP1 (28,87), GMJUP1 (28,04) e GNJUP2 (27,40) não tiveram diferenças entre as médias do grupo GCP ( $p < 0,05$ ) (Tabela 16). Em comparação a evolução do número de fibroblastos em relação ao 7º e 14º dia, o grupo GCS teve um crescimento na contagem dessa célula no dia 14 em comparação ao dia 7, enquanto os demais grupos tiveram uma queda na proliferação de fibroblastos. De acordo com da Paixão *et al.* (2014), é de se esperar que os fibroblastos diminuam com o tempo visto que essas células podem sintetizar precocemente o colágeno tipo III e conseqüentemente depositar o colágeno tipo I, melhorando o reparo tecidual.

Apesar do grupo GNJUP2 não diferir do grupo GCS na contagem de fibroblastos no sétimo dia, ele teve a maior contagem de vasos sanguíneos em comparação a todos os outros grupos, sendo diferente estatisticamente ( $p < 0,05$ ) (Tabela 17). No estudo de Rani *et al.* (2018), que utilizou AgNPs sintetizadas por méis multiflorais, houve diminuição da inflamação, edema e ativação da angiogênese na fase inicial da cicatrização após tratamento com as nanoestruturas. Essa maior ativação de neovascularização no grupo GNPUP2 pode ser explicada pelas propriedades dos agentes redutores presentes no mel JUP2, como explicou Hajialyani *et al.* (2018) em relação às características antioxidantes e liberação de fatores de crescimento endotelial vascular na ferida por meio das AgNPs que interferem na formação de novos vasos.

A contagem da densidade vascular no dia 14 não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos ( $p < 0,05$ ), porém ocorreu uma diminuição em relação ao sétimo dia ( $p < 0,05$ ). De acordo

com Asai *et al.* (2018), nessa fase ocorre mais fortemente a deposição de colágeno e a deposição da matriz extracelular. Dessa forma, ocorre a diminuição de fibroblastos e da neovascularização.

Apesar dos grupos GNJUP1 e GNJUP2 e GMJUP1 não diferirem do grupo controle negativo no sétimo dia em relação à contagem dos fibroblastos, na visualização das imagens histológicas houve maior alinhamento e paralelismo das fibras colágenas dos grupos dos méis, AgNPs sintetizadas através dos méis e grupo controle positivo (Figura 23).

**Tabela 16** - Contagem de fibroblastos no 7º e 14º dia de experimento em lesões cutâneas infectadas.

| Tratamento | Tempo (dia)     |           |
|------------|-----------------|-----------|
|            | Fibroblastos    |           |
|            | 7               | 14        |
| GMJUP1     | 66,26±12,55 BCD | 28,04± C  |
| GMJUP2     | 119,95±8,00 A   | 50,80± B  |
| GNJUP1     | 59,54±3,89 D    | 28,87± C  |
| GNJUP2     | 78,66±15,56 BC  | 27,40± C  |
| GCP        | 80,66±9,93 B    | 35,44± BC |
| GCS        | 62,98±8,55 CD   | 105,48± A |

Legenda: Médias e desvio padrão, seguidas pela letra maiúscula crescente em relação ao dia na linha com desdobramento realizado pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: A autora (2024).

**Tabela17** - Contagem da densidade vascular no 7º e 14º dia de experimento em lesões cutâneas infectadas.

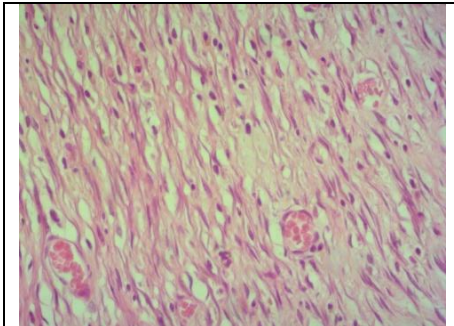
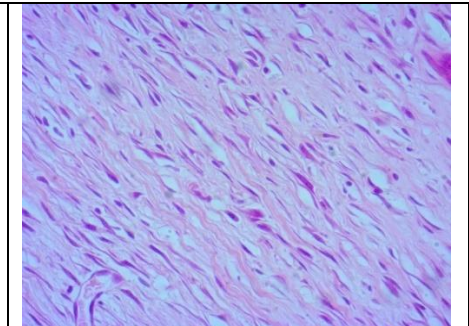
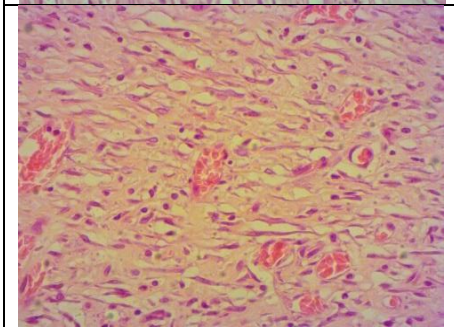
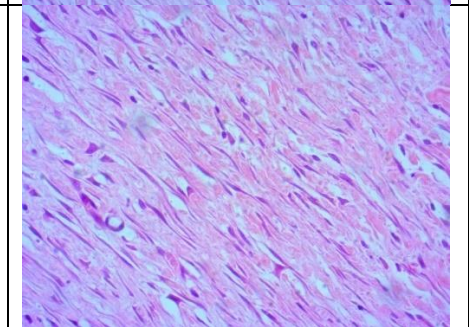
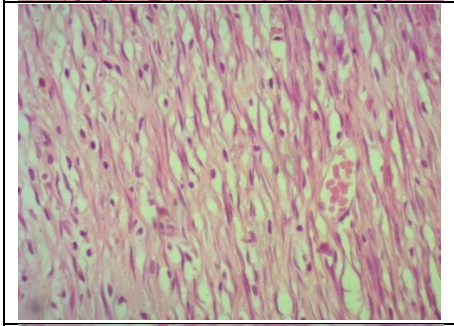
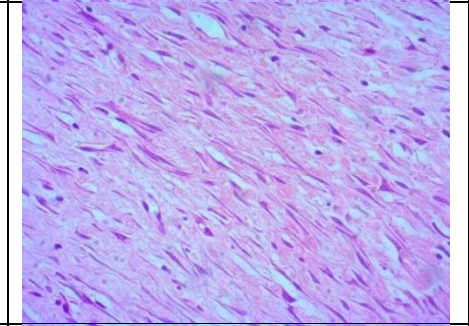
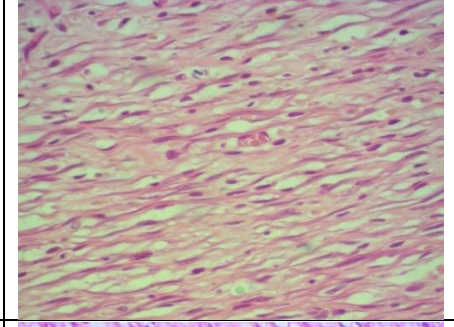
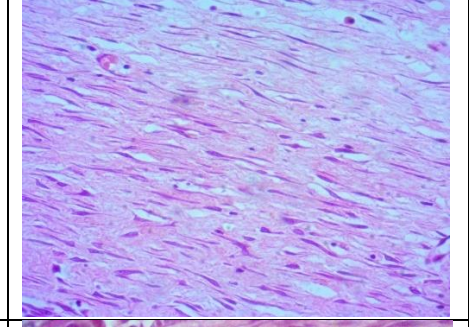
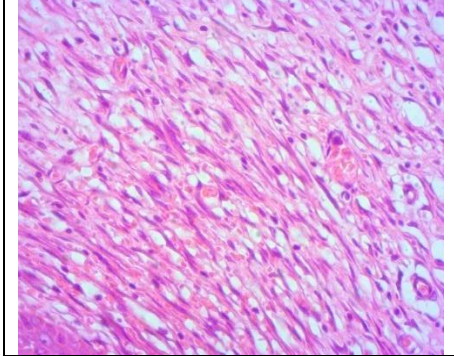
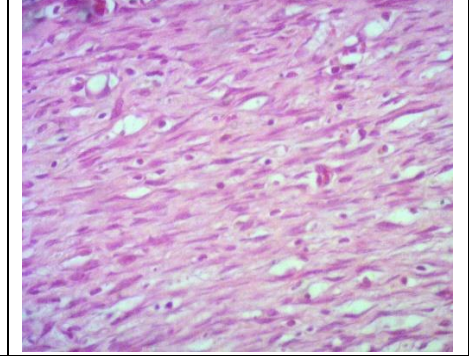
| Tratamento | Tempo (dia)        |             |
|------------|--------------------|-------------|
|            | Densidade vascular |             |
|            | 7                  | 14          |
| GMJUP1     | 1,84±0,59 B        | 0,74±0,56 A |
| GMJUP2     | 2,28±0,50 B        | 0,66±0,19 A |
| GNJUP1     | 1,98±0,54 B        | 0,52±0,10 A |
| GNJUP2     | 3,28±0,72 A        | 0,65±0,16 A |
| GCP        | 2,38±0,35 B        | 0,64±0,27 A |
| GCS        | 2,10±0,56 B        | 0,70±0,35 A |

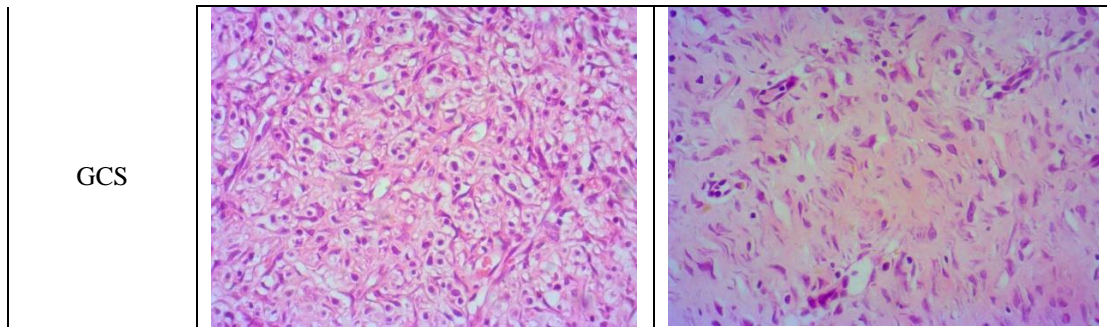
Legenda: Médias e desvio padrão, seguidas pela letra maiúscula crescente em relação ao dia na linha com desdobramento realizado pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: A autora (2024).

**Figura 23** - Microfotografias representativas do 7º e 14º dias das feridas infectadas (400x). Coloração com hematoxilina e eosina.

| Tratamento | 7º dia | 14º dia |
|------------|--------|---------|
|------------|--------|---------|

|        |   |  |
|--------|---|--|
| GNJUP1 |    |    |
| GNJUP2 |    |    |
| GMJUP1 |   |   |
| GMJUP2 |  |  |
| GCP    |  |  |



Legenda: Aspectos histológicos quanto a presença de fibroblastos e vasos sanguíneos nas lâminas no 7º e 14º dia, nos grupos tratados com a amostra de GNJUP1, GNJUP2, GMJUP1 e GMJUP2, GCP e GCS.

Fonte: A autora (2024).

### 5.8.2 Avaliação das fibras de colágeno tipo I e tipo III

Em relação a deposição das fibras colágenas tipo III no 7º e 14º dia, não houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre a área de colágeno entre os grupos de tratamento (Tabela 18). De acordo com Ribeiro *et al.* (2015), as fibras de colágeno tipo III são as primeiras a serem formadas durante o processo cicatricial, sendo posteriormente substituídas por fibras de colágeno I.

Quanto ao colágeno tipo I, não houve diferenças significativas no 7º dia entre os grupos ( $p < 0,05$ ) (Tabela 18), porém visualmente por meio da análise histológicas, tiveram fibras finas e organizadas em paralelismo quando comparado ao grupo controle negativo (fibras colágenas mal organizadas) (Figura 24). Em relação ao colágeno tipo I no 14º dia, os grupos GMJUP1 e GCP foram significativamente iguais ( $p < 0,05$ ), apresentando as maiores áreas colágenas, diferindo significativamente somente do grupo GNJUP2. Na Figura 24, após 14 dias, são mostradas fibras mais dispostas em paralelismo nos grupos GMJUP1, GCP, GNJUP1 e GNJUP2, quando comparado ao GCS (Figura 24).

No estudo de Rani *et al.* (2018), AgNPs sintetizadas utilizando mel foram potencialmente úteis como curativo de feridas. Por sua vez, Guruvu *et al.* (2022) demonstraram que AgNPs sintetizadas por méis e tiveram com maior deposição de colágeno, quando comparado ao controle. De acordo com Chinnasamy *et al.* (2021), a eficácia das AgNPs por síntese verde na cicatrização de feridas depende dos parâmetros de sua preparação como pH, temperatura, concentração de extrato, concentração de nitrato de prata, forma, estrutura e distribuição de tamanho.

De acordo com Medeiros e Dantas-Filho (2016), o colágeno desempenha um papel essencial ao promover resistência e coesão aos tecidos, além disso, quando ocorrem lesões, sua deposição é importante para corrigir imperfeições, restaurar a integridade estrutural e apoiá-las. No estudo de Iftikhar *et al.* (2010), o mel aumentou a taxa de cicatrização com o aumento da

formação de colágeno em comparação ao grupo placebo. Assim como estudo de Alves *et al.* (2018) que trataram feridas infectadas com mel de *Melipona subnitida* e resultou em reação cicatricial com densidade de colágeno, leucócitos e fibroblastos significativamente maior do que nos demais grupos ( $p < 0,05$ ).

Considerando que a interpretação dos resultados depende da magnitude das variáveis, no presente trabalho, apesar de terem sido observadas correlações fortes, moderadas e fracas entre as técnicas avaliadas, quando comparados os resultados intragrupos verificou-se uma pequena variação do desvio padrão em relação a contagem do colágeno (Tabela 18), apesar da padronização das configurações dos softwares utilizados e a qualidade das fotomicrografias. De acordo com Guyton e Hall (2011), lesões infectadas podem influenciar nas diferenças do desvio padrão e na quantidade de fibras colágenas tipo I e III em decorrência do processo inflamatório persistente.

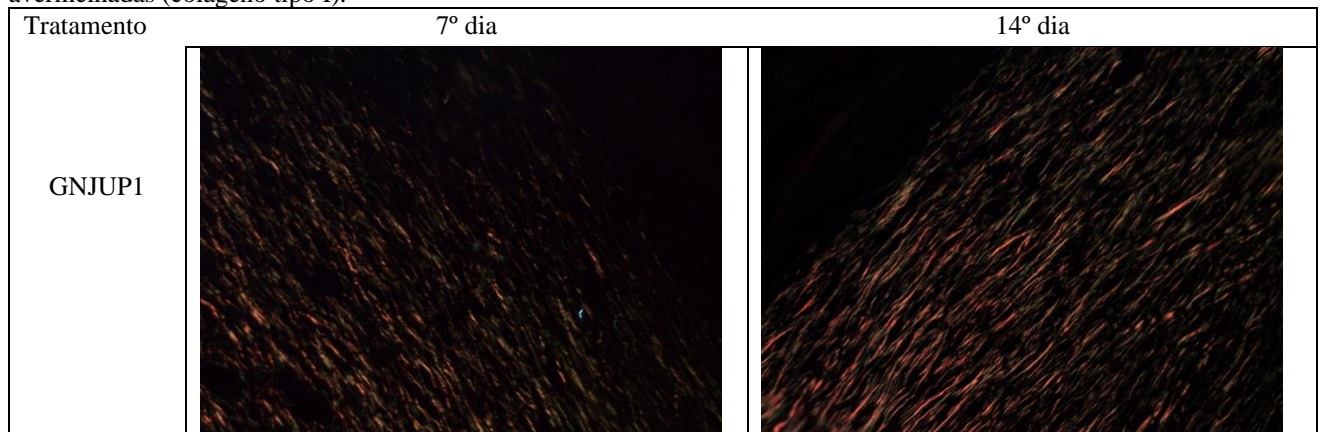
**Tabela 18** - Contagem da área de colágeno tipo I e tipo III no 7º e 14º dia de experimento nas lesões cutâneas infectadas.

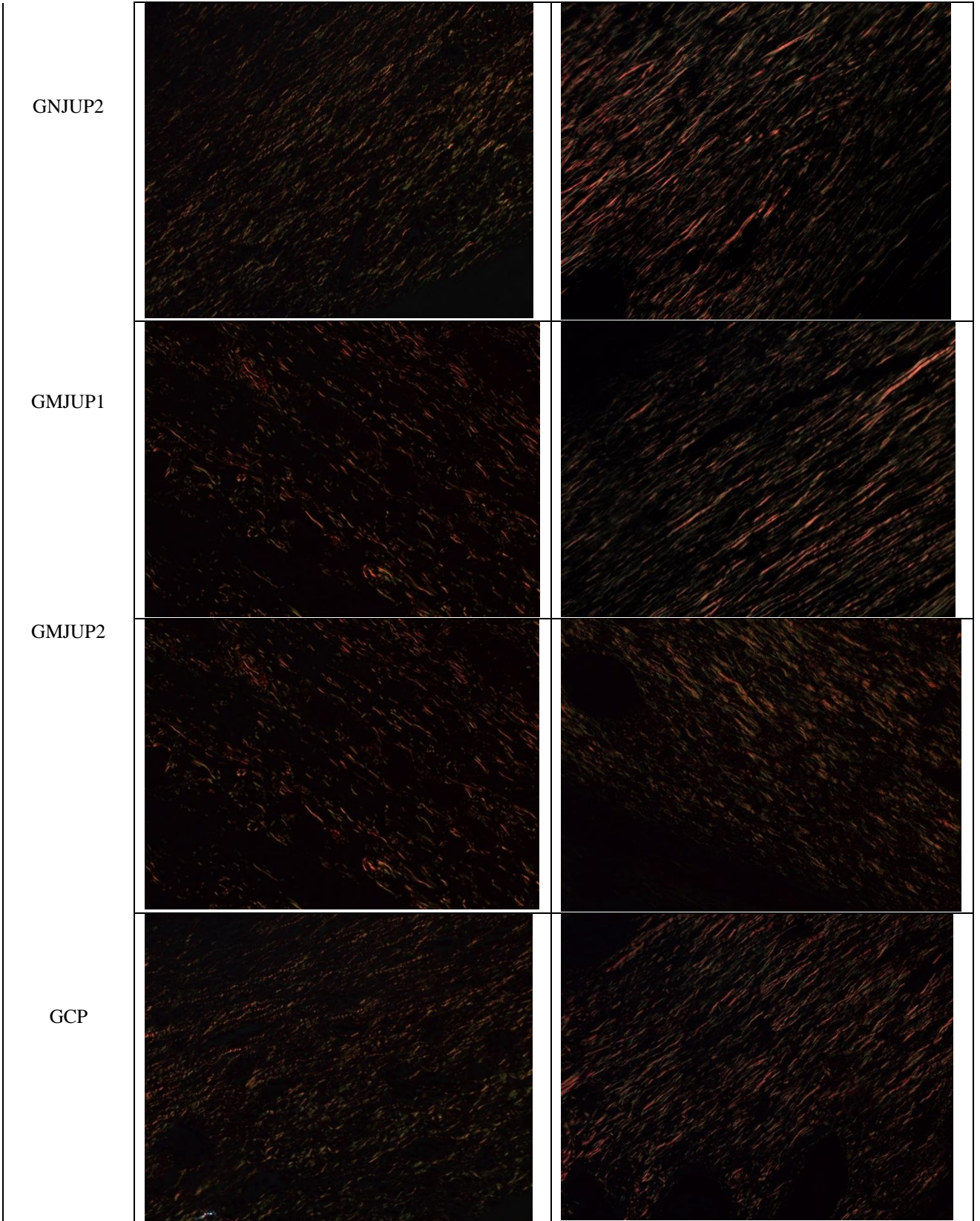
| Tratamento | Tempo (dia)   |               |              |              |
|------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
|            | Colágeno I    |               | Colágeno III |              |
|            | 7             | 14            | 7            | 14           |
| GMJUP1     | 17,68±4,49 A  | 21,86±3,94 A  | 1,58±1,51 A  | 0,94±0,26 A  |
| GMJUP2     | 21,78±4,03 A  | 20,13±2,00 AB | 1,28±1,20 A  | 1,61±1,01 A  |
| GNJUP1     | 20,69±1,94 A  | 20,60±3,76 AB | 3,77±2,22 A  | 0,17± 0,20 A |
| GNJUP2     | 21,66±2,54 A  | 12,27±6,29 B  | 3,26±2,21 A  | 3,01±1,52 A  |
| GCP        | 20,41±2,35 A  | 21,40±7,11 A  | 3,33±2,46 A  | 0,86±0,30 A  |
| GCS        | 17,27± 5,33 A | 19,02±4,01 AB | 0,95± 0,84 A | 1,88±2,70 A  |

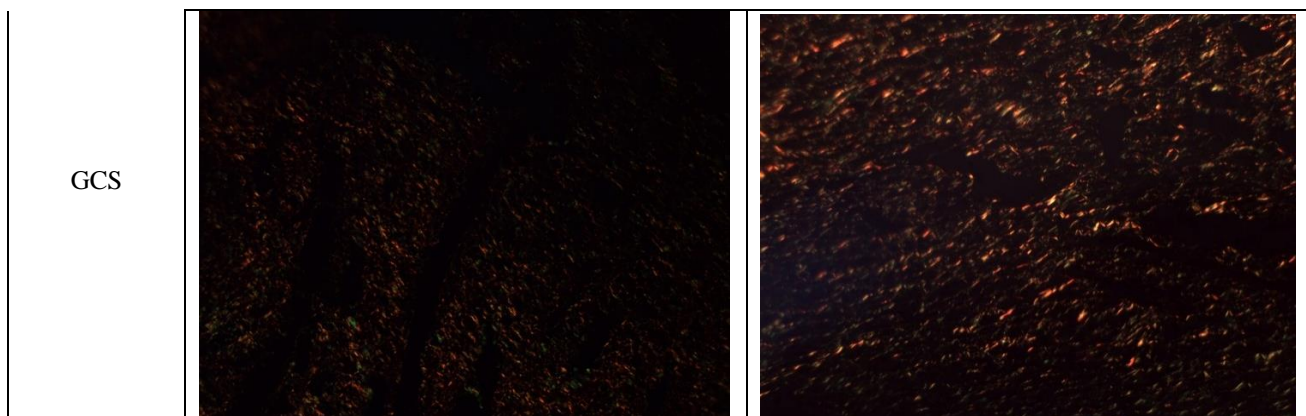
Legenda: Médias e desvio padrão, seguidas pela letra maiúscula crescente em relação ao dia na linha com desdobramento realizado pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: A autora (2024).

**Figura 24** - Microfotografias representativas das fibras de colágeno das feridas infectadas do 7º e 14º dia (200x). Coloração Picro-Sirius Red sob luz polarizada. Fibras esverdeadas (colágeno tipo III) e fibras amarelo avermelhadas (colágeno tipo I).







Legenda: Fibras esverdeadas (colágeno tipo III) e fibras amarelo avermelhadas (colágeno tipo I), microfotografias das feridas infectadas do 7º e 14º dia, nos grupos tratados com a amostra de GNJUP1, GNJUP2, GMJUP1 e GMJUP2, GCP e GCS.

Fonte: A autora (2024).

## 7 CONCLUSÃO

A análise físico-química e bioquímica das 35 amostras de méis de ASF tiveram variações em seus resultados, reforçando o entendimento de que os méis apresentam características únicas. Quanto a análise antimicrobiana *in vitro* evidenciou que a maioria dos méis de ASF são capazes de inibir os microrganismos e que as condições de armazenamento, espécies das abelhas e outros interferem nas suas inibições de microrganismos.

A síntese de AgNPs utilizando os méis JUP 1 e JUP 2 foi confirmada por meio da mudança de coloração das suspensões coloidais para amarelo âmbar. Quanto a caracterização das AgNPs dos méis JUP 1 e JUP2, tiveram suspensões com com bandas de absorção máxima em torno de 400-480 nm. Vale ressaltar que as nanoestruturas apresentaram poucas variações nas características coloidais quanto ao diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial Zeta após 120 dias de análise, confirmando sua estabilidade. Por sua vez, a análise estrutural por FTIR demonstrou similaridade nos grupamentos funcionais presentes na superfície das AgNPs e que podem estar envolvidos na sua redução/estabilização. Além disso, a morfologia das AgNPs mostrou formatos predominantemente esféricos, mas também outras formas como bastões e triangulares foram visualizadas. Dessa forma, ficou evidenciado o uso de méis de ASF da Amazônia junto à nanobiotecnologia agregam valores a esse produto natural que é muitas vezes subexplorado.

O teste de toxicidade ocular *in vitro* das AgNPs JUP1 e JUP2 não apresentou qualquer sinal/sintoma de irritação. Quanto as observações da toxicidade dérmica evidenciar a ausência

de sinais de toxicidade nos animais em um curto período de 14 dias após exposição às AgNPs na concentração de 3 mM, são necessários mais estudos para avaliar as interações entre AgNPs biogênicas, sintetizadas com a utilização do mel de ASF como agente redutor e, conseqüentemente, suas repercussões nos sistemas fisiológicos de maneira dependente do tempo de exposição a longo prazo e da dose.

Apesar da variabilidade da contagem de *S. aureus* entre os grupos experimentais, houve uma menor contagem do microrganismo qualitativamente no grupo controle positivo e nas AgNPs JUP1 e no mel de JUP 1 e JUP2 no sétimo dia em comparação aos outros grupos. Apesar disso, essa pesquisa reforça a necessidade de novos estudos que envolvem a avaliação *in vivo* da atividade antimicrobiana de méis de abelha sem ferrão e de AgNPs sintetizadas por méis.

O efeito na contração de feridas causado pelas AgNPs JUP1 e JUP2 foi similar ao do grupo controle negativo (soro fisiológico) e do mel da amostra JUP1 no 3<sup>a</sup> e 7<sup>o</sup> dia. No entanto, em relação aos efeitos no fechamento da ferida, os grupos contendo as AgNPs foram melhores em relação ao grupo controle positivo (sulfato de neomicina) e mel da amostra JUP2.

Quanto a análise de fibroblastos, densidade vascular e colágeno não se diferiram estatisticamente do grupo controle negativo, o estudo teve ferida infectadas, conseqüentemente, pode interferir na deposição de fibroblastos, novos vasos e colágeno. Dado isso, essa pesquisa pode analisar que as AgNPs sintetizadas por méis agregam ao conhecimento científico junto a nanobiotecnologia e suas repercussões na cicatrização de uma ferida infectada, apesar de ser um mecanismo complexo.

## REFERÊNCIAS

ABBASZADEGAN, A.; GHAHRAMANI, Y.; GHOLAMI, A.; HEMMATEENEJAD, B.; DOROSTKAR, S.; NABAVIZADEH, M.; SHARGHI, H. The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: A preliminary study. **Journal of Nanomaterials**. v. 2015 p. 1-8, 2015.

ADADI, P.; OBENG, A. K. Assessment of Antibacterial Quality of Honey Produced in Tamale Metropolis (Ghana). **J. Food Drug Anal.** v. 25, n.2, p. 369–373, 2017.

ADIBHESAMI, M.; AHMADI, M.; FARSHID, A. A., SARRAFZADEH-REZAEI, F.; DALIR-NAGHADEH, B. Effects of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus* contaminated open wounds healing in mice: An experimental study. **In Veterinary Research Forum**, v. 8, n.1, p. 23-28, 2017.

ADIL, M.; KHAN, T.; AASIM, M.; AYAZ ALI KHAN, A. A. K.; ASHRAF, M. Evaluation of the antibacterial potential of silver nanoparticles synthesized through the interaction of antibiotic and aqueous callus extract of *Fagonia indica*. **Amb Expr**, v.9, n.74, 2019.

AKHAVAN, B. J.; KHANNA, N. R.; VIJHANI, P. Amoxicillin. 2022 Aug 8. **In: StatPearls** [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.

AKHTAR, M. S.; PANWAR, J.; YUN, Y. Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts. **ACS Sustainable Chemistry e Engineering**, v. 1, n. 6, p. 591-602, 2013.

ALAYANDE, S. O.; AKINSIKU, A. A.; AKINSIPO, O. B; OGUNJINMI, E. O.; DARE, E.O. Green synthesized silver nanoparticles and their therapeutic applications. **Química analítica abrangente**, v. 94, pp. 585-611, 2021.

AL-BRAHIM, J. S.; MOHAMMED, A. E. Antioxidant, cytotoxic and antibacterial potentials of biosynthesized silver nanoparticles using bee's honey from two different floral sources in Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 27, n.1, January, p. 363-373. 2020.

ALDAYEL, F. M.; ALSOBEG, M. S.; KHALIFA, A. In vitro antibacterial activities of silver nanoparticles synthesized using the seed extracts of three varieties of *Phoenix dactylifera*. **Rev. Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2022.

ALHAJJ, M.; BANSAL, P.; GOYAL, A. **Physiology, Granulation Tissue; StatPearls: Treasure Island**, FL, USA, 2020.

ALHARBI, N. S.; ALSUBHI, N. S.; FELIMBAN, A. L. Green synthesis of silver nanoparticles using medicinal plants: Characterization and application. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 15, n. 3, p.109-124, 2022.

ALMEIDA-MURADIAN, L. B. STRAMM, K. M.; HORITA, A.; BARTH, O. M.; FREITAS, A. S.; ESTEVINHO, L. M. Comparative study of the physicochemical and palynological characteristics of honey from *Melipona subnitida* and *Apis mellifera*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 8, p. 1698-1706, 2013.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M. GIAMPIERI, Francesca; BRENCIANI Andrea; Luca MAZZONI; GASPARRINI, Massimiliano; GONZÁLEZ-PARAMÁS, Ana M.;

SANTOS-BUELGA, Celestino; MORRONI, Gianluca; SIMONI, Serena; FORBES-HERNÁNDEZ, Tamara Y.; AFRIN, Sadia; GIOVANETTI, Eleonora; BATTINO, Maurizio. *Apis mellifera* vs *Melipona beecheii* Cuban polyfloral honeys: A comparison based on their physicochemical parameters, chemical composition and biological properties. **LWT**. v 87, p. 272-279, 2018.

ALVAREZ-SUAREZ, J. M. TULIPANI, S. DIA, D. ESTEVEZ, Y. ROMANDINI, S. GIAMPIERI, F. DAMIANI, E. ASTOLFI, P. BOMPADRE, S. BATTINO, M. Antioxidant and antimicrobial capacity of several mono floral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. **Food and Chemical Toxicology**. v. 48, p. 2490-2499, 2010.

ALVES, D. F. S.; CABRAL JÚNIOR, F. D. C.; CABRAL, P. P. D. A. C.; OLIVEIRA JUNIOR, R. M. D.; REGO, A. C. M. D.; MEDEIROS, A. C. Efeitos da aplicação tópica do mel de *Melipona subnitida* em feridas infectadas de ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 35, p. 188-193, 2008.

AL-WAILI, N.; SALOM, K.; AL-GHAMDI, A.; ANSARI, M. J. Antibiotic, Pesticide, and Microbial Contaminants of Honey: human health hazards. **The Scientific World Journal**. v. 2012, p. 1-9, 2012.

AL-ZABAN, Mayasar, I.; MOHAMED, A. Mahmoud; MAHA, Al Harbi, A. Catalytic degradation of methylene blue using silver nanoparticles synthesized by honey. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 3, 2021.

AMAZONAS. Portaria N° 253/2016 – ADAF/Amazonas, 31 de outubro de 2016. **Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel de abelhas sem ferrão**. Portaria da Agência de Defesa Agropecuária e Florestal do estado do Amazonas. Diário oficial do estado, p. 7. Manaus, 01 nov., 2016.

ANDLEEB, S.; IQBAL Z, GULZAR, N.; RAZA, A.; AHMAD, A. Synthesis, Characterization, Acute Dermal Toxicity, Anti-inflammatory, and Wound Healing Potential of Biogenic Silver Nanoparticles in Balb C Mice. **Curr Pharm Biotechnol**. 2023.

ANDLEEB, S.; SADIA NAZER, S.; ALOMAR, S. Y.; AHMAD, N.; KHAN, I.; RAZA, A.; AWAN, U. A; RAJA, S. A. Wound healing and anti-inflammatory potential of *Ajuga bracteosa*-conjugated silver nanoparticles in Balb/c mice. **BioRxiv**, 2022.

ANGEL, D. E.; LLOYD, P.; CARVILLE, K.; SANTAMARIA, N. The clinical efficacy of two semi-quantitative wound-swabbing techniques in identifying the causative organism(s) in infected cutaneous wounds. **International wound journal**, v. 8, n. 2, p. 176-185, 2011.

AOAC. **Official Methods of Analysis**. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburgs, MD, 18 th Edition, 2006.

AQUINO, M. S.; DA SILVA, C. M. *Staphylococcus Aureus* e sua importância no âmbito das infecções hospitalares: revisão da literatura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 14, 2022.

ARAÚJO, J.; GARCIA, M. L.; MALLANDRICH, M.; SOUTO, E. B.; CALPENA, A. C. Perfil de liberação e permeação transescleral de transportadores lipídicos nanoestruturados carregados

com acetonido de triancinolona (TA-NLC): Estudos *in vitro* e *ex vivo*. **Nanomedicina**, v. 8, n. 6, p. 1034–1041, 2012.

ARAÚJO, M. A.; LEMOS, I. C. S.; MENEZES, I. R. A.; FERNANDE, S, G, P.; KENRTOPF, M. R. Uso de plantas medicinais para o tratamento de feridas. **Interdisciplinar**, v. 8, n. 2, p. 60-67, 2015.

ASAI, E.; YAMAMOTO, M.; UEDA, K.; WAGURI, S. Spatiotemporal alterations of autophagy marker LC3 in rat skin fibroblasts during wound healing process. **Fukushima Journal of Medical Science**, v. 64, n. 1, p. 15-22, 2018.

ÁVILA, S.; BEUX, M. R.; RIBANI, R. H.; ZAMBIAZI, R. C. Stingless bee honey: Quality parameters, bioactive compounds, health-promotion properties and modification detection strategies. **Trends in Food Science e Technology**. v. 81, p. 37-50, 2018.

BAFO, W.; SEIFU, E.; MOLAPISI, M.; SONNO, K. eliponiculture and physicochemical properties of honey produced by the African stingless bee *Plebeina hildebrandti* Friese in Kalakamati village, **Botswana Journal of Agriculture and Applied Sciences**, v.13, n.1, p. 33-42, 2019.

BAHADAR, H.; MAQBOOL, F.; NIAZ, K.; ABDOLLAHI, M. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. **Iran Biomed J**. v. 20, n.1, pp. 1-11, 2016.

BAHARI, N.; HASHIM, N.; AKIM, A. M.; MARINGGAL B. Recent Advances in Honey-Based Nanoparticles for Wound Dressing: A Review. **Nanomaterials**, v. 12, n.15, p. 2560, 2022.

BAKER, S.; RAKSHITH, D.; KAVITHA, K.S.; SANTOSH, P.; KAVITHA, H. U.; RAO, Y.; SATISH, S. Plants: Emerging as Nanofactories towards Facile Route in Synthesis of Nanoparticles. **Bioimpacts**., v. 3, n.3, p.111-117, 2013.

BANDEIRA, A. M. P.; VASCONCELOS, A. A.; BARROSA, E. C.; TAUBE, P. S.; BANDEIRA FILHO, J. R.; DIASC, A. L.; SOUSA JÚNIOR, J. J. V.; BOGER, A. E.; ESCHERC, S. K. S.; RUY BESSA LOPES, R. B.; SANTOS FILHO; M. B.; MOURA, L. S.; SANTANA, M. B. Antimicrobial activity of honey produced in the West of the state of Pará, Brazil. **Academia Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 3, 2018.

BARBOSA, L.; S.; MACEDO, J. L.; SILVA, M. R. F.; MACHADO, A. V. Estudo Bioquímico de Qualidade do Mel de Abelha Comercializado no Município de Caraúbas – RN. **Verde (Mossoró – RN - Brasil)**, v. 9. n.2, p. 45-51, 2014.

BASOGLU, A.; AKAR, Z. Green biosynthesis, characterization of silver nanoparticles using a green alga *Spirogyra* sp. and their antioxidant and enzyme activities. Basoglu and Akar, **International Advanced Research and Engineering Journal**, v. 7, n.1, p. 41-51, 2022.

BASTOS, G.. **Avaliação da qualidade físico-químicos de méis obtidos de produtores rurais da região do alto Uruguai – RS**. Monografia em engenharia química. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões. ERECHIM – RS, 2020.

BATISTON, T. F. T. P. **Atividade antimicrobiana de diferentes méis de abelha sem ferrão**. Dissertação de mestrado, Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Chapecó, SC, Brasil. 2017.

BATISTON, T. F. T. P. **Atividade antimicrobiana de diferentes méis de abelha sem ferrão**. Dissertação em Zootecnia. Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). Chapecó, Santa Catarina, 2017.

BAYDA, S.; ADEEL, Muhammad, ; TUCCINARDI, Tiziano ; CORDANI, Marco ; RIZZOLIO, Flavio .The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine, **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 1, p. 112, 2019.

BEHRAVAN, M.; PANAHI, A. H.; NAGHIZADEH, A.; ZIAEE, M.; MAHDAVI, R.; MIRZAPOUR, A. Facile green synthesis of silver nanoparticles using *Berberis vulgaris* leaf and root aqueous extract and its antibacterial activity. **International journal of biological macromolecules**, v. 124, p. 148-154, 2019.

BÉLTEKY, P.; RÓNAVÁRI, A.; ZAKUPSZKY, D.; BOKA, E.; IGAZ, N.; SZERENCSES. B.; PFEIFFER, I.; VÁGVÖLGYI, C.; KIRICSI, M.; KÓNYA, Z. Are Smaller Nanoparticles Always Better? Understanding the Biological Effect of Size-Dependent Silver Nanoparticle Aggregation Under Biorelevant Conditions. **Int J Nanomedicine**, v. 16, p. 3021-3040, 2021.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential- What they are and what they are not? **J. Control. Release.**, v. 235, p. 337–351, 2016.

BHATTACHARYYA, A.; SENGUPTA, S.; BHATTACHARYA, S. K. Hydrophobic hydration from solubilities of aliphatic hydrocarbons in water, **Journal of Molecular Liquids**. v. 204, p.176-183, 2015.

BHAUMIK, J.; THAKUR, N.S.; AILI, P. K; GHANGHORIYA, A.; MITTAL. A K.; BANERJEE, U. C. Bioinspired nanotheranostic agents: synthesis, surface functionalization, and antioxidant potential, ACS Biomater. **Sci. Eng.** v.1, n.6, p. 382-392, 2015.

BIAGIONI, R. B.; CARVALHO, B. V.; MANZIONI, R.; MATIELO, M. F.; BROCHADO NETO, F. C.; SACILOTTO, R. Smartphone application for wound area measurement in clinical practice. **Journal of Vascular Surgery Cases, Innovations and Techniques**, v. 7, n. 2, p. 258-261, 2021.

BIFFI, G. Y. M. **Determinação de compostos antioxidantes em mel de abelha sem ferrão**. **Monografia**. Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campo Mourão, 2021.

BILUCA, F. C. **Caracterização química e bioativa de méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) produzidos no estado de Santa Catarina**. Tese em ciências de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

BILUCA, F. C. **Caracterização química e influência do tratamento térmico em méis de abelha sem ferrão (*meliponinae* spp.) produzidos no Estado de Santa Catarina**. p. 110. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2014.

BILUCA, F. C.; SILVA, B.; CAON, T.; MOHR, E. T. B.; VIEIRA, G. N.; GONZAGA, E. V.; VITALI, L.; MICKE, G.; FETT, R.; DALMARCO, E. M.; COSTA, A. C. O. Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (*Meliponinae*). **Food Research International**,v. 129, 2020.

BILUCA, F. C; BRAGHINI, F; GONZAGA, L. V; COSTA, A. C. O; FETT, R. Physicochemical profiles, minerals and bioactive compounds of stingless bee honey (*Meliponinae*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 50, p. 61-69, 2016.

BOELSTERLI, U.A.; KASHIMSHETTY, R. 9.17 - Lesão Hepática Idiossincrática Induzida por Drogas: Mecanismos e Fatores de Suscetibilidade. **Toxicologia Abrangente (Segunda Edição)**, v. 9, p. 383-402, 2010.

BOMBIN, A. D. J.; DUNNE, N. J.; MCCARTHY, H. O. Electrospinning of natural polymers for the production of nanofibres for wound healing applications. **Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl**, v. 114, 2020.

BORIOLO, M. F. G.; ALVES, V. E.; SILVA, T. A.; SILVA, J. J.; BARROS, G. B. S.; DIAS, C. T. S.; HÖFLING, J. F.; OLIVEIRA, N. M. S. Decrease of the DXRinduced genotoxicity and nongenotoxic effects of Theobroma cacao revealed by micronucleus assay. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, n. 2, 2021.

BOWLER, P. G. The 10 (5) bacterial growth guideline: reassessing its clinical relevance in wound healing. **Ostomy/wound management**, v. 49, n.1, p. 44-53, 2003.

BRAGHINI, F. **Estabilidade de méis de abelhas sem ferrão (*Meliponinae spp.*) submetidos a diferentes condições térmicas**. 156 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciências de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2016.

BRAGHINI, F., BILUCA, F. C, SCHULZ, M., GONZAGA, L. V, COSTA, A. C, FETT, R. Mel de abelha sem ferrão: um produto precioso, mas não regulamentado, realidade e expectativas. **Avaliação de Alimentos Internacionais**, v. 28, n.1, p. 683-712, 2021.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. **Estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais**; revoga a lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979 e dá outras providências. Presidência da república, casa civil, subchefia para assuntos jurídicos.

BRASIL. LEI Nº 12.305, DE 2 DE AGOSTO DE 2010. **Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos**; altera a Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998; e dá outras providências. Presidência da República Casa Civil Subchefia para Assuntos Jurídicos. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Laboratório Nacional Agropecuário. Laboratório de Produtos de Origem Animal/SLAV. Método de Ensaio – MET. **Determinação de acidez em mel por potenciometria**, Brasília-DF, 2014.

BRITO, J. E. de, PARANHOS, C. N., VIANA, D. dos S. F., NUNES, J. L., e CAVALLI, L. C. G. Genotoxicidade das nanoestruturas aplicadas em saúde: Uma revisão integrativa. **Eletrônica Acervo Saúde**, v.13. n. 3. 2021.

BRITO, J. E. de.; VIANA, D. S. F.; VIANA, V. G. G.; FIGUEIRÊDO, G. S. de. Ação antimicrobiana das nanopartículas de prata (AgNPs) estabilizadas em extrato de jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, 2022.

BRUDZYNSKI, K. Effect of hydrogen peroxide on antibacterial activities of Canadian honeys. **Canadian journal of microbiology**, v.52, n.12, p.1228-1237, 2007.

BRUNA, T.; MALDONADO-BRAVO, F.; JARA, P.; CARO, N. Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. **Int J Mol Sci.**, v. 22, n. 13, p. 7202, 2021.

BUDAI-SZÚCS, M.; RUGGERI, M.; FACCENDINI, A.; LÉBER, A.; ROSSI, S.; VARGA, G.; BONFERONI, M. C.; VÁLYI, P.; BURIÁN, K.; CSÁNYI, E.; SANDRI, G.; FERRARI, F. Electrospun Scaffolds in Periodontal Wound Healing, **Polymers.** v. 13, n. 2, p. 307, 2021.

BUSQUETS, R; MBUNDI, L. **Em Emerging Nanotechnologies in Food Science**; Busquets, R; Mbundi, L., eds.; Elsevier: Amsterdam, cap.1. 2017.

CAMARGO, R. C. R. de; OLIVEIRA, K. L. de; BERTO, M. I. Mel de abelhas sem ferrão: proposta de regulamentação. **Brazilian of Food Technology.** Campinas, v. 20, p. 6. 2017.

CAN, Z; YILDIZ, O.; SAHIN, H.; TURUMTAY, E. A.; SILICI, S.; KOLAYLI, S. An investigation of Turkish honeys: Their physico-chemical properties, antioxidant capacities and phenolic profiles. **Food Chemistry**, v. 180, p. 133-141, 2015.

CAVASSIN, E. D.; DE FIGUEIREDO, L. F. P.; OTOCH, J. P.; SECKLER, M. M.; DE OLIVEIRA, R. A.; FRANCO, F. F.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTI, V.; LEVIN, A. S. S.; COSTA, S. F. Comparação de métodos para detectar a atividade in vitro de nanopartículas de prata (AgNPs) contra bactérias multirresistentes. **J. Nanobiotechnol.** v. 13, p. 64, 2015.

CHAKRABORTY, S.; PANIGRAHI, P. K. Stability of Nanofluid: A Review. **Applied Thermal Engineering.** v.174, 2020.

CHATTHA, M.U.; AMJAD, T.; KHAN, I.; NAWAZ, M.; ALI, M.; CHATTHA, M.B.; ALI, H.M.; GHAREEB, R.Y.; ABDELSALAM, N.R.; AZMAT, S. Mulberry based zinc nanoparticles mitigate salinity induced toxic effects and improve the grain yield and zinc bio-fortification of wheat by improving antioxidant activities, photosynthetic performance, and accumulation of osmolytes and hormones. **Front. Plant Sci.**, v. 13, 2022.

CHEN, Q.; WU, J.; LIU, Y.; LI, Y.; ZHANG, C.; QI, W.; YEUNG, K. W. K.; WONG, T.M.; ZHAO, X.; PAN, H. Electrospun chitosan/PVA/bioglass Nanofibrous membrane with spatially designed structure for accelerating chronic wound healing. **Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.** v. 105. 2019.

CHINNASAMY, G.; CHANDRASEKHARAN, S.; KOH, T. W.; BHATNAGAR, S. Synthesis, characterization, antibacterial and wound healing efficacy of silver nanoparticles from *Azadirachta indica*. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 611560, 2021.

CHUTTONG, B.; CHANBANG, Y. SRINGARM, K.; BURGETT, M. Physicochemical profiles of stingless bee (Apidae: Meliponini) honey from Southeast Asia (Thailand). **Food Chemistry**, v. 192, p. 149-155, 2016.

CLARKE, S. **Development of Hierarchical Magnetic Nanocomposite Materials for Biomedical Applications.** Ph.D. Thesis, Dublin City University, Northside, Dublin, 2013.

CLEBIS, V. H.; SCANDORIEIRO, S.; SPINOSA, W. A.; DA COSTA, V. L. L.; LOURENÇO, I. M.; SEABRA, A. B., KOBAYASHI, R. K. T.; NAKAZATO, G. Comparison of the Antibacterial Effect of Different Biological Silver Nanoparticles Synthetized and Integrated with Honeys. **New Environmentally Friendly Materials**, v. 1, n. 1, p. 1-23, 2022.

CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Except as stated below, neither this publication nor any portion thereof may be adapted, copied, or otherwise reproduced, by any means (electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise) without prior written permission from Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012.

CONCEA. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Normativas da CONCEA para produção para produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino e ou pesquisa científica**. Lei, decretos, Portarias, Resoluções, Normativas e orientações técnicas. 3ª Edição, Brasília, 2016.

COSTA, A. C. V.; SOUSA, J. M. B.; SILVA, M. A. A. P.; GARRUTI, D. S.; MADRUGA, M. S. Sensory and volatile profiles of monofloral honeys produced by native stingless bees of the Brazilian semiarid region. **Food Research International**, v. 105, p. 110-120, 2018.

CURTIS, B. J.; HLAVIN, S.; BRUBAKER, A. L.; KOVACS, E. J.; RADEK, K. A. Episodic binge ethanol exposure impairs murine macrophage infiltration and delays wound closure by promoting defects in early innate immune responses. **Alcoholism: Clinical e Experimental Research**, v. 38, n. 5, p. 1347–1355, 2014.

CZERNEL, G.; BLOCH, D.; MATWIJCZUK, A.; CIEŚLA, J.; KĘDZIERSKA-MATYSEK, M.; FLOREK, M.; GAGOŚ, M. Biodirected Synthesis of Silver Nanoparticles Using Aqueous Honey Solutions and Evaluation of Their Antifungal Activity against Pathogenic Candida Spp. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, n. 14, p. 7715, 2021.

DA COSTA, I.F.; TORO, M. J. U. Evaluation of the antioxidant capacity of bioactive compounds and determination of proline in honeys from Pará. **J. Food Sci Technol**, v. 58, pp. 1900–1908, 2021.

DA PAIXÃO, D. R.; FLAUSINO, P. A.; REIS, N. G.; DE LIMA, C. C.; BERNARDES, M. T. C. P.; SANTOS, L.; GARCIA, J. A. D. Efeitos da própolis na proliferação de fibroblastos em lesões cutâneas de ratos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 3, 2014.

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, 2016.

DADA, A. O.; ADEKOLA, F. A.; DADA, F. E.; ADELANI-AKANDE, A. T.; BELLO, M. O., OKONKWO, C. R.; INYINBOR, A. A.; OLUYORI, A. P.; OLAYANJU, A.; AJANAKU, K. O.; ADETUNJI, C. O. silver nanoparticle synthesis by *acalypha wilkesiana* extract: phytochemical screening, characterization, influence of operational parameters, and preliminary antibacterial testing. **Heliyon**, 5, n.10, 2019.

DANAEI, M.; DEHGHANKHOLD, M.; ATAEI, S.; HASANZADEH DAVARANI, F.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M.R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 57, 2018.

DAS, P.; GHOSALB, K.; JANA, N. K.; MUKHERJEE, A.; BASAK, P. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using belladonna mother tincture and its efficacy as a potential antibacterial and anti-inflammatory agent. **Material Chemistry and Physics**, v.228, n.15, p. 310-317, 2019.

DAS, P.; HORTON, R. Antibiotics: Achieving the balance between access and excess. **Lancet**. v.387, n. 10014, p. 102–104, 2016.

DE MATTEIS, V.; CASCIONE, M.; TOMA, C.C.; LEPORATTI, S. Silver Nanoparticles: Synthetic Routes, In Vitro Toxicity and Theranostic Applications for Cancer Disease. **Nanomaterials**., v. 8, n. 5, p. 319. 2018.

DE SOUSA, J. M. B. SOUZA, E. L.; MARQUES, G.; BENASSI, M. T.; GULLÓN, B.; PINTADO, M. M.; MAGNANI, M. 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, 2016.

DEROUICHE, M. T. T, ABDENNOUR, S. HET-CAM test. Application to shampoos in developing countries. **Toxicol In Vitro**. v. 45, n. 3, p. 393-396, 2017.

DIAS, B. de P.; RIBEIRO, E. M. de C.; GONÇALVES, R. L.; OLIVEIRA, D. S.; FERREIRA, T. H.; SILVA, B. de M. A nanotecnologia no brasil e o desenvolvimento de produtos com atividade antimicrobiana. **Quim. Nova**, v. 44, n. 8, p.1084-1092, 2021.

DIAS, D. V. S.; ZANCANELLA, C. A.; BANDEIRA, D. M.; CORREA, J. M.; A PINTO, F. G. S. Síntese verde de nanopartículas de prata utilizando extrato metanólico de *Podocarpus lambertii* Klotzch ex Endl. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n. 4, p. 42062-42072, 2021.

DÍAZ-CRUZ, C.; ALONSO, G.; ESPINOZA-GÓMEZ, H.; FLORES-LÓPEZ, L. Z.; Effect of molecular weight of PEG or PVA as reducing-stabilizing agent in the green synthesis of silver-nanoparticles. **Eur. Polym. J.**, v. 83, p. 265-277. 2016.

DO KHAC, A.; JOURDAN, C.; FAZILLEAU, S.; PALAYER, C.; LAFFONT, I.; DUPEYRON, A.; VERDUN. S.; GELIS, A. mHealth App for Pressure Ulcer Wound Assessment in Patients with Spinal Cord Injury: Clinical Validation Study. **JMIR Mhealth Uhealth**, v. 9, n.2, 2021.

DOMINGOS, S. C. B. **Atividade antibacteriana dos méis de abelhas-sem-ferrão do gênero *melipona* da amazônia (Apidae: Meliponina)**. Dissertação em Sanidade e Produção Animal Sustentável na Amazônia Ocidental, mestrado em Ciência Animal, Rio Branco, Acre, 2019.

DOURADO, G. S; CARDOSO, AMARAL, J. C.; CARDOSO, I. F.; LIMA, A. K. O.; DA SILVA, S.K.R.; VASCONCELOS, A. A.; SOUSA JÚNIOR, J. J. V.; TAUBE JUNIOR, P. S. Avaliação da Capacidade Antimicrobiana de Nanopartículas de Prata Sintetizadas com Mel de Abelha. **Ensaio**, v. 24, n. 3, p. 305-309, 2020.

DUA, T. K.; GIRI, S.; NANDI, G.; SAHU, R.; SHAW, T. K.; PAUL, P. Green synthesis of silver nanoparticles using *Eupatorium adenophorum* leaf extract: characterizations, antioxidant, antibacterial and photocatalytic activities. **Chemical Papers**, v. 77, p. 2947-2956, 2023.

DURÁN, N.; ROLIM, W. R.; DURÁN, M., FÁVARO, W. J.; SEABRA, A. B. Nanotoxicologia de nanopartículas de prata: toxicidade em animais e humanos. **Quím. Nova**, v.42, n.2, 2019.

ECHEVERRY CHICA, J.; NARANJO DÍAZ, A.; ARAQUE MARÍN, P. Nanopartículas de prata funcionalizadas in situ con D-limoneno: efecto en la actividad antibacteriana. **Ion.**, v. 33, n.1, p. 79-92, 2020.

EL-DESOUKY, Tarek; AMMAR, Hala. Honey mediated silver nanoparticles and their inhibitory effect on aflatoxins and ochratoxin A. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. v. 6. p. 83-90, 2016.

EMING, S. A.; MARTIN, P.; TOMIC-CANIC, M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. **Sci. Transl. Med.**, v. 6, n. 265, 2014.

ERCAN, L. Investigação da Eficácia Antibacteriana e Antifúngica de Nanopartículas de Zinco e Prata Sintetizadas de *Nasturtium officinale*. **Journal of Agricultural Sciences**. v. 7, n. 7, 2023.

EREJUWA, O. O.; SULAIMAN, S. A.; WAHAB, M. S. A. Honey: A Novel Antioxidant. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 4400-4423, 2012.

ESCUREDO, O. MÍGUEZ, M.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M.; SEIJO, M. Carmen. Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. **Food Chemistry**. v. 138, p. 851-856, 2013.

ESCUREDO, O.; DOBRE, I.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. SEIJO, M. Carmen. Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. **Food Chemistry**, v. 149, n. 15, p. 84-90, 2014.

FARZAM, K.; NESSEL, T. A, QUICK, J. ERYTHROMYCIN. 2022 Dec 27. In: StatPearls. **Treasure Island (FL): StatPearls**, Publishing, jan., 2023.

FAVORETTO, S. M.; SEABRA, D.; OLIVATO, M. C. UNIFESP. **Guia de eutanásia para animais de ensino e pesquisa**. CEUA/UNIFESP. Universidade Federal de São Paulo. 1ª edição, 2019.

FEDERAL HAZARDOUS SUBSTANCES ACT. **As amended through Public Law 110-314**, Enacted August 14, 2008.

FERNANDES, R. S.; DIAS, L de C. P.; BARRETO, L. M. R. C. Identificação de fraudes em méis de abelhas sem ferrão comercializados em feiras na Cidade de Manaus-AM/ Identification of fraud in honey from stingless bees commercialized in fairs in the City of Manaus-AM. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n.6, p. 45003–45015, 2022.

FERNANDO, S.; GUNASEKARA, T.; HOLTON, J. Antimicrobial Nanoparticles: applications and mechanisms of action. **SriLankan Journal of Infectious Diseases**, v. 8, n.1, p. 2-11, 2018.

FERREIRA, I. C. F. R.; AIRES, E.; BARREIRA, J. C. M.; ESTEVINHO, L. M. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. **Food Chem.** v. 114, p. 1438-1443, 2009.

FINOLA, M. S., LASAGNO, M. C., e MARIOLI, J. M. Microbiological and chemical characterization of honeys from central Argentina. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1649-1653, 2007.

FIOROTTI, L. L. **Caracterização físico-química e potencial bioativo de mel de abelhas sem ferrão e africanizada ocorrentes no espírito Santo**. Universidade Vila Velha, 2021.

FOKOU, J. B. H.; MBOGBE, N. E.; MPONGE, P. N.; NKOUANKAM, M. J. C.; NSEGBE, A. C.; LOE, G. M. E.; KOUBE, J.; BERTIN, S. E.; MEVA, F. E. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.12, n.2, p. 48-55, 2023.

FRANCI, G.; FALANGA, A.; GALDIERO, S.; PALOMBA, L.; RAI, M.; MORELLI, G.; GALDIERO, M. Silver nanoparticles as potential antibacterial agentes. **Molecules**. v. 20. n. 5, p. 8856-8874, 2015.

FREITAS, E. P. B. de; CRAVEIRO, R. S.; ASSUNÇÃO, J. M. B. de; LOPES, Y. M. dos S.; MODESTO JUNIOR, E. N.; SOUZA, R. F. de. Physicochemical characterization of honey produced in the municipality of Cachoeira do Arari – Ilha de Marajó, Pará. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3, 2022.

FRYKBERG, R.G.; BANKS, J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. **Adv Wound Care (New Rochelle)**, v. 4, n. 9, p. 560–582, 2015.

GARROS, I. C.; CAMPO, S A. C. L; TÂMBARA, E. M.; TENÓRIO, S. B, TORRES OJM, AGULHAM MA, ARAÚJO ACF, SAINS-ISOLAN, P. M. B.; OLIVEIRA, E.M.; ARRUDA, E. C. M. Extrato de Passiflora Edulis na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. **Acta Cir Bras**. v. 21, v. 3, p. 55-65, 2006.

GEBEYEHU, H. R.; JALATA, D. D. Physicochemical and mineral contents of honey from Fitche and Addis Ababa districts in Ethiopia. **Food Chemistry Advances**, v.2, 2023.

GELA, A.; HORA, Z. A.; KEBEBE, D; GEBRESILASSIE, A. Physico-chemical characteristics of honey produced by stingless bees (*Meliponula beccarii*) from West Showa zone of Oromia Region, Ethiopia. **Heliyon**, v.7, n.1, 2021.

GENGAN, R. M.; ANAND, K.; PHULUKDAREE, A.; CHUTURGOON, A. A549 lung cell line activity of biosynthesized silver nanoparticles using Albizia adianthifolia leaf. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 105, p. 87-91, 2013.

GHAREEB, R.Y.; SHAMS EL-DIN, N.G.E.-D.; MAGHRABY, D.M.E.; IBRAHIM, D.S.; ABDEL-MEGEED, A.; ABDELSALAM, N.R. Nematicidal activity of seaweed-synthesized silver nanoparticles and extracts against *Meloidogyne incognita* on tomato plants. **Sci. Rep.** v. 12, n.1, 2022.

GHRAMH, H. A.; ALRUMMAN, S. A.; AHMAD, I.; KALAM, A.; ELBEHAIRI, S. E. I.; ALFAIFY, A. M.; MOHAMMED, M. E. A.; AL-SEHEMI, A. G.; ALFAIFI, M.; AL-SHEHRI, B. M.; ALSHAREEF, R. M. H.; ALAERJANI, W. M. A.; KHAN, K. A. Chemical Characterization of Honey and Its Effect (Alone as well as with Synthesized Silver Nanoparticles) on Microbial Pathogens' and Human Cancer Cell Lines' Growth. **Nutrients**, v.15, n. 3, p. 684, 2023.

GHRAMH, H. A.; IBRAHIM, E. H; KILANY, M. Study of anticancer, antimicrobial, immunomodulatory, and silver nanoparticles production by Sidr honey from three different sources. **Food Sci Nutr**. Dec. v.8, n.1, p. 445-455, 2020.

GOIS, G. C; LIMA, C. A. B; SILVA, L. T; EVANGELISTA-RODRIGUES, A. Composição do mel de *Apis mellifera*: requisitos de qualidade. **Acta Veterinária Brasileira**, v.7, n.2, p.137-147, 2013.

GOMES, B. G. A.; ANDRADE, R. O. de; LIMA, G. S. de; NUNES, J. S.; VIANA, V. R.; CARDOSO, R. L. Elaboração de Bebida à Base de Água de Coco Adicionado de Polpa de Kiwi. **Revista Semiárido De Visu**, v. 5, n. 3, p. 149-157, 2017.

GOMES, V. V.; BANDEIRA, A. M. P.; CORDOVIL, K. P. S.; BANDEIRA FILHO, J. dos R.; BRAGHINI, F.; BILUCA, F. C.; GONZAGA, L. V.; FETT, R.; COSTA, K. S.; AZEVEDO, M. M. R. de; TAUBE, P. S. Physicochemical characterization and antioxidant activity of honey samples of *Apis mellifera* and different species of Meliponinae subfamily from the Brazilian eastern Amazon region. **Food Sci. Technol, Campinas**, v. 42, 2022.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Atividade antimicrobiana do mel de abelha nativa sem ferrão *nannotrigona testaceicornis* (hymenoptera: apidae, meliponini). **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.4, p. 455-459, 2005.

GONTIJO, L. A. P.; RAPHAEL, E.; FERRARI, D. P. S.; JEFFERSON LUIS FERRARI, J. F.; LYON, J. P.; SCHIAVON, M. A. pH effect on the synthesis of different size silver nanoparticles evaluated by DLS and their size-dependent antimicrobial activity. **Articles Matéria (Rio J.)**, v. 25, n.4, 2020.

GONZALEZ, A. C.; COSTA, T. F.; ANDRADE, Z. A.; MEDRADO, A. R. Wound healing- a literature review. **An. Bras. Dermatol.** v. 91, n. 5, pp. 614-620, 2016.

GRZEGOZESKI, T. L. **Influência da espécie de abelha e da origem floral do mel sobre a atividade antimicrobiana frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. 2015. 41 f. Monografia em Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão, 2015.

GUO, S.; DIPIETRO L. A. Factors affecting wound healing. **J. Dent. Res.** v. 89, n.3, p. 219-229, 2010.

GURUNATHAN, S.; HAN, J. W.; KWON, D. N.; KIM, J. H. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Nanoscale Res. Lett**, n. 9, n.1, p. 373, 2014.

GURUVU, N. R.; NARAPOGU, V.; LALITHA, D. L.; BANDARU, B. N. R.; GOOTHY, S. S. K.; RAO, D. M. M. Synergistic antimicrobial activity of honey combined with silver nanoparticles topically applied in experimentally infected wounds in Wistar albino rats. **National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology**, v. 12, n.1, p. 1-1, 2022.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E **Tratado De Fisiologia Médica**. 12. Ed. RJ. Guanabara Koogan, 2011.

HADRUP, N.; SHARMA, A. K.; LOESCHNER, K. Toxicidade de íons de prata, prata metálica e materiais de nanopartículas de prata após exposição in vivo da superfície dérmica e mucosa: uma revisão. **Regul. Tóxico. Pharmacol.** v. 98, p. 257–267, 2018.

HAIZA, H.; AZIZAN, A.; MOHIDIN, A. H.; HALIN, D. S. C. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Local Honey. **Nano Hybrids**, v. 4, p. 87–98, 2013.

HAJIALYANI, M.; TEWARI, D.; SOBARZO-SÁNCHEZ, E.; NABAVI, S. M.; FARZAEI, M. H.; ABDOLLAHI, M. Natural product-based nanomedicines for wound healing purposes:

therapeutic targets and drug delivery systems. **International journal of nanomedicine**, p. 5023-5043, 2018.

HASALI, N. H. M.; ZAMRI, A. I., LANI, M. N., MUBARAK, A.; AHMAD, F.; CHILEK, T. Z. T. Physico-chemical analysis and antibacterial activity of raw honey of stingless bee farmed in coastal areas in kelantan and terengganu. **Malays. Appl. Biol.** v. 47, n. 4, p. 145–151, 2018.

HE, Y.; LI, X.; ZHENG, Y.; WANG, Z.; MA, Z.; YANG, Q.; YAO, B.; ZHAO, Y.; ZHANG, H. A green approach for synthesizing silver nanoparticles, and their antibacterial and cytotoxic activities. **New J. Chem**, v. 42, p. 2882-2888, 2018.

HICKS, A. L; GILBERTSON, Leanne M.; YAMAN, Jamila S. I; THEIS, Thomas L.; ZIMMERMAN, and Julie B. Life Cycle Payback Estimates of Nanosilver Enabled Textiles under Different Silver Loading, Release, And Laundering Scenarios Informed by Literature Review. **Environmental Science e Technology**, v. 49, 13, p. 7529-7542, 2015.

HILLEBRAND, G. G.; DIMITRIU, P.; MALIK, K.; PARK, Y.; QU, D.; MOHN, W. W.; KONG, R. Temporal variation of the facial skin microbiome: a 2-year longitudinal study in healthy adults. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 147, n. 1S-2, p. 50S-61S, 2021.

HIRO, M.E.; PIERPONT, Y. N.; KO, F.; WRIGHT, T. E.; ROBSON, M. C.; PAYNE, W. G. Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings on in vitro and in vivo processes of wound healing. **Eplasty**, v. 12, n. 48, 2012.

HOLANDA, C. A.; OLIVEIRA, A. R.; COSTA, M. C. P.; RIBEIRO, M. N. S.; SOUZA, J. L.; ARAÚJO, M. J. A. M. Qualidade dos méis produzidos por *Melipona fasciculata smith* da região do cerrado maranhense. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 55-58, 2012.

HOSEINZADEH, E.; MAKHDOUMI, P.; TAHA, P.; HOSSINI, H.; STELLING, J.; KAMAL, M. A.; ASHRAF, G. M. A. Review on Nano-Antimicrobials: Metal Nanoparticles, Methods and Mechanisms. **Curr Drug Metab.**, v., 18, n. 2, p. 120-128, 2017.

HOSNY, A.M.S.; KASHEF, M. T; RASMY, S. A; ABOUL-MAGD AND Z E EI-BAZZA, D. S. Antimicrobial activity of silver nanoparticles synthesized using honey and gamma radiation against silver-resistant bacteria from wounds and burns. **Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.**, v.8, n.4, 2017.

HOSSAIN, M. L.; LIM, L.Y.; HAMMER, K.; HETTIARACHCHI, D.; LOCHER, C. A Review of Commonly Used Methodologies for Assessing the Antibacterial Activity of Honey and Honey Products. **Antibiotics**, v. 11, p. 975, 2022.

HTWE, Y. Z.; CHOW, W. S.; SUDA, Y, MARIATTI, M. Effect of silver nitrate concentration on the production of silver nanoparticles by green method. **Mater. Today: Proceedings**, v. 17, pp. 568-73, 2019.

HUSAIN, S.; VERMA, S.K.; YASIN, D.; HEMLATA; RIZVI, M.M.A.; FATMA, T. Facile green bio-fabricated silver nanoparticles from *Microchaete* infer dose-dependent antioxidant and anti-proliferative activity to mediate cellular apoptosis. **Bioorganic Chem.** v. 107, 2021.

HUSSAIN, I.; SINGH, N.B.; SINGH, A.; SINGH, H.; SINGH, S.C. Green synthesis of nanoparticles and its potential application. **Biotechnol. Lett.**, v. 38, n. 4, p. 545-560, 2016.

ICCVAM. **Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of In Vitro Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Products.** NIH Publication No. 10-7553. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences, 2010.

IFTIKHAR, F.; ARSHAD, M.; RASHEED, F.; AMRAIZ, D.; ANWAR, P.; GULFRAZ, M. Effects of acacia honey on wound healing in various rat models. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 24, n. 4, p. 583-586, 2010.

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). **Métodos físicoquímicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** 4ª ed. Brasília (DF): ANVISA; 2005.

JAFFÉ, R.; POPE, N.; CARVALHO, A. T.; MAIA, U. M.; BLOCHTEIN, B.; CARVALHO, C. A. L. de; CARVALHO-ZILSE, G. A.; FREITAS, B. M.; MENEZES, C.; RIBEIRO, M. de F.; VENTURIERI, G. C.; IMPERATRIZ-FONSECA, V. L. Bees for Development: Brazilian Survey Reveals How to Optimize Stingless Beekeeping. **Plos One**. v. 10, n.3, 2015.

JALDIN-CRESPO, L., SILVA, N., MARTÍNEZ, J. Nanomateriais à Base de Mel e Própolis para Cicatrização de Feridas – Uma Mini-Revisão. **Nanomateriais**, v.12, n. 24, 4409, 2022.

JAMKHANDE, P. G.; GHULE, N. W.; BAMER, A., H.; KALASKAR, M. G. Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications”, **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.53, 2019.

JESUS, M. C. de; OLIVEIRA, D. C. de; RODRIGUEZ FIGUERO, A. L. E.; BRANDÃO, H. N.; KAMIDA, H. M.; SANTOS, F. de A. R. dos. Caracterização botânica e avaliação do potencial antimicrobiano do mel produzido por *Apis mellifera* L, *Melipona scutellaris* Latreille e *Tetragonisca angustula* Latreille (Hymenoptera: Apidae) em um fragmento de floresta ombrófila densa no estado da Bahia, Brasil. **Paubrasilia**, Porto Seguro, v. 3, n. 2, p. 37–50, 2020.

JIANG, Q.; LIN, Z., GU, B., PANG, C.; WANG, X. Green synthesis and immobilization of AgNPs by lumpy corn stalk as interlayer filling material for durable antibacterial. **Industrial Crops and Products**, v.158, n. 15, 2020.

KALANTARI, K.; MOSTAFAVI, E.; AFIFI, A.M.; IZADIYAN, Z.; JAHANGIRIAN, H.; RAFIEE-MOGHADDAM, R.; WEBSTER, T. J. Wound dressings functionalized with silver nanoparticles: Promises and pitfalls. **Nanoscale**. v. 12, n. 4, pp. 2268-2291, 2020.

KAMAL, M. A., KLEIN, P. Determination of sugars in honey by liquid chromatography. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 18, p. 17- 21, 2011.

KARABAGIAS, I. K.; BADEKA, A.; KONTAKOS, S.; KARABOURNIOTI, S.; KONTOMINAS, M. G. Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. **Food Chem.**, v.1, n.146, p. 548-57, 2014.

KARIMI, K.; ODHAV, A.; KOLLIPARA, R.; FIKE, J.; STANFORD, C.; HALL, J. C. Acute cutaneous necrosis: A guide to early diagnosis and treatment. **J. Cutan. Med. Surg.** v. 21, p. 425-437, 2017.

KHAN, Z.; MARSHALL, J. F. The role of integrins in TGF $\beta$  activation in the tumour stroma. **Cell and Tissue Research**, v. 365, n. 3, p. 657–673, 2016.

KHEZERLOU, A.; ALIZADEH-SANI, M.; AZIZI-LALABADI, M.; EHSANI, A. Nanoparticles and their antimicrobial properties against pathogens including bacteria, fungi, parasites and viruses. **Microb. Pathog.**, v. 123, p. 505-526, 2018.

KIM, H.S.; SUN, X.; LEE, J.H.; KIM, H.W.; FU, X. Leong, K.W. Advanced drug delivery systems and artificial skin grafts for skin wound healing. **Adv. Drug Deliv.** v. 146, p. 209-239, 2019.

KISHORE, R. K.; HALIM, A. S.; SYAZANA, M. S. H.; SIRAJUDEEN, K. N. S. Tualang honey has higher phenolic content and greater radical scavenging activity compared with other honey sources, **Nutrition Research**, v. 31, n. 4, p. 322-325, 2011.

KIVRAK, S.; KIVRAK, İ.; KARABABA, E. Characterization of Turkish honeys regarding of physicochemical properties, and their adulteration analysis. **Food Science and Technology**, 37, n. 1, p. 80-89, 2017.

KOOHI, M. K.; HEJAZY, M.; ASADI, F.; ASADIAN, P. Assessment of dermal exposure and histopathologic changes of different sized nano-silver in healthy adult rabbits. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 304, n. 1, p. 012028, 2011.

KORDESTANI, S.S. Wound Healing Process, in: S.S.B.T.-A. of W.H. Kordestani (Ed.), Atlas Wound Heal. **A Tissue Regen. Approach, Elsevier**, p. 11-22, 2019.

KRISHNASWAMY, V. R.; MANIKANDAN, M.; MUNIRAJAN, A. K.; D. Vijayaraghavan, and P. S. Korrapati, “Expression and integrity of dermatopontin in chronic cutaneous wounds: a crucial factor in impaired wound healing. **Cell and Tissue Research**, v. 358, n. 3, p. 833–841, 2014.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. **Robbins – Patologia Básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

KUROISHI, A. M.; QUEIROZ, M. B.; ALMEIDA, M. M. de; QUAIST, L. B. Avaliação da cristalização de mel utilizando parâmetros de cor e atividade de água. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 84-91, 2012.

KUŚ, P. M.; SZWEDA, P; JERKOVIĆ, I.; TUBEROSO, C. I. Activity of Polish unifloral honeys against pathogenic bacteria and its correlation with colour, phenolic content, antioxidant capacity and other parameters. **Lett Appl Microbiol.** v. 62, n.3, p. 269-76, 2016.

KWAKMAN, P. H. S.; TE VELDE, A. A., DE BOER, L.; SPEIJER, D.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C. M. J. E.; ZAAT, S. A. J. How honey kills bacteria. **FASEB J.**, v. 24, n. 7, 2010.

KWAKMAN, P. H.; ZAAT, S. A. Antibacterial components of honey. **IUBMB Life**. Jan. v.64, n. 1, pp. 48-55, 2012.

LAKSHMANAN, G.; SATHIYASEELAN, A.; KALAICHELVAN, P. T.; MURUGESAN, K. Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles using fruit extract of *Cleome viscosa* L.:

Assessment of their antibacterial and anticancer activity. **Karbala International Journal of Modern Science**, v.4, n.1, p.61–68, 2018.

LANI, M. N.; ZAINUDIN, A. H.; RAZAK, S. B. A.; MANSOR, A.; HASSAN, Z. Microbiological quality and pH changes of honey produced by stingless bees, heterotrigona itama and geniotrigona thoracica stored at ambient temperature. **Malays. Appl. Biol.** v.46, n.3, p. 89-96, 2017.

LAVINAS, F.C.; GOMES, B.A.; SILVA, M.V.T.; NUNES, R.M.; LEITÃO, S.G.; MOURA, M.R.L.; SIMAS, R.C.; CARNEIRO, C.S.; RODRIGUES, I.A. Discriminant Analysis of Brazilian Stingless Bee Honey Reveals an Iron-Based Biogeographical Origin. **Foods**, v.12, n. 180, 2023.

LIANG, Y.; ZHAO, X.; HU, T.; CHEN, B.; YIN, Z.; MA, P. X.; GUO, B. Adhesive Hemostatic Conducting Injectable Composite Hydrogels with Sustained Drug Release and Photothermal Antibacterial Activity to Promote Full-Thickness Skin Regeneration During Wound Healing. **Small**. v. 15, n. 12, 2019.

LIAO, C., Y.; Li, S.C. Tjong, Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles. **Int. J. Mol. Sci.** v. 20, n. 2, p. 449, 2019.

LIMA, A. K. O; VASCONCELOS, A. A; SOUSA JÚNIOR, J. J. V.; ESCHER, S. K. S.; NAKAZATO, G.; Taube Júnior, P. S. Green synthesis: characterization and biological activity of silver nanoparticles using aqueous extracts of plants from the Arecaceae family. **Acta Scientiarum. Technology**. v. 43, 2021.

LIMA, S. K. **Análise de caracteres físico-químicos do mel Tiúba (*Melipona compressipes fasciculada*)**. Monografia (graduação). Curso de agronomia. Universidade Federal do Maranhão. Chapadinha- MA, 2017.

LIN, P.C.; LIN, S.; WANG, P.C.; SRIDHAR, R. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. **Biotechnol. Adv.**, v. 32, n. 4, p. 711-726, 2014.

LIN, Y. H.; HSU, W. S.; CHUNG, W. Y.; KO, T. H.; LIN, J. H. Curativos à base de prata reduzem a carga bacteriana e promovem a cicatrização de feridas. **Int. Ferida J.**, v. 13, n.4, p. 505–511, 2016.

LIRA, A. F.; SOUSA, J. P. L. de M.; LORENZON, M. C. A.; VIANNA, C. A. F. J.; CASTRO, R. N. Estudo comparativo do mel de *Apis mellifera* com méis de meliponíneos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, n.3, p.169-178, 2014.

LOPES, A. E. P. **Caracterização físico-química e atividade antioxidante do mel da abelha jataí (*tetragonisca angustula*) proveniente de diferentes regiões do estado do paraná**. Dissertação de mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, LONDRINA, 2019.

LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A. T.; HERDEIRO, M. T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Rev. Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

LUZ, K. S. da S. **Produtos meliponícolas de abelha jandaíra (*Melipona subnitida*) do semiárido potiguar**. Dissertação de mestrado em ciência animal. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Mossoró, 2021.

MAKAROV, V.V.; LOVE, A. J., SINITSYNA, O.V.; MAKAROVA, S. S.; YAMINSKY, I. V.; TALIANSKY, M.E.; KALININA, N.O. "Green" nanotechnologies: synthesis of metal nanoparticles using plants. **Acta Naturae**. v.6, n.1, p. 35-44, 2014.

MALONE, M.; YGREN, E.; HAMBERG, T.; RADZIETA, M.; JENSEN, S. O. In vitro and in vivo evaluation of the antimicrobial effectiveness of non-medicated hydrophobic wound dressings. **International Wound Journal**, 2023.

MANKODI, H.; UTKARSHSINH, S.; PATEL, B. Characterization of Colloidal Solution for Wound Dressing using Honey. **International Journal of Engineering and Techniques**, v. 3, n. 6, 2017.

MANYI-LOH, C. E.; CLARKE, A. M.; MUNZHELELE, T.; GREEN, E.; MKWETSHANA, N. F.; NDIP, R. N. Selected South African honeys and their extracts possess in vitro anti-*Helicobacter pylori* activity. **Arch Med Res**. v. 41, n. 5, p. 324-31, 2010.

MARSUDI, M.A.M.; SARI, F. F.; WICAKSONO, P. M.; ASMORO. A.; BASUKI, A.; WIBOWO, A. Optimization of Green Synthesis Approach of Silver Nanoparticles Using Indonesian Wild Honey. **Key Engineering Materials**. v. 891, 2021.

MATAR, G. H.; AKYÜZ, G.; KAYMAZLAR, E.; ANDAC, M. An Investigation of Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Turkish Honey Against Pathogenic Bacterial Strains. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v.13, n. 2, 2023.

MATHUR, P.; JHA, S.; RAMTEKE, S.; JAIN, N. K. Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 46, n. 1, p. 115-126, 2018.

MATTER, F. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 8<sup>a</sup> ed, p. 1-120, 2015.

MCLOONE, P.; TABYS, D.; FYFE, L. Honey combination therapies for skin and wound infections: a systematic review of the literature. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, p. 875-888, 2020.

MEDEIROS, A. C.; DANTAS-FILHO, A. M. Cicatrização das feridas cirúrgicas. *Journal of surgical and clinical research*, v. 7, n. 2, p. 87-102, 2016.

MEDEIROS, V. D. F. L. P.; AZEVEDO, Í. M.; RÊGO, A. C. M.; EGITO, E. S. T. D.; ARAÚJO-FILHO, I.; MEDEIROS, A. C. Antibacterial properties and healing effects of *Melipona scutellaris* honey in MRSA-infected wounds of rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 31, p. 327-332, 2016.

MEHAR, M.; JOHN, C.; JONATHAN, R.; DAVID, C. **Antimicrobial compositions comprising DGLA and neomycin sulfate and methods of use thereof**. Dignity Sciences Limited, Dublin (IE), 2014.

- MEHLING, A.; KLEBER, M.; HENSEN, H. COMPARATIVE studies on the ocular and dermal irritation potential of surfactants. **Food Chem Toxicol.** v. 45, n. 5, p. 747-58, 2007.
- MEIKLE, T. G.; DYETT, B. P.; STRACHAN, J. B.; WHITE, J.; DRUMMOND, C. J.; CONN, C.E. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of cubosome encapsulated metal nanocrystals. **ACS applied materials e interfaces**, n.12, n. 6, p. 6944-6954, 2020.
- MELO JR, M.; SANTOS, L.S.S.; GONÇALVES, D. C.; NOGUEIRA, A. F. Preparação De Nanopartículas De Prata E Ouro: Um Método Simples Para A Introdução Da Nanociência Em Laboratório De Ensino. **Quím. Nova.** v. 35, n. 9. 2012.
- MELO, N. F. S. de; GRILLO, R, ROSA, A. H, FRACETO, L. F.; DIAS, FILHO, N. L.; PAULA, E.; ARAÚJO, D. R. Desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas de poli (L-lactídeo) contendo benzocaína. **Quím. Nova**, v. 33, n.1, pp. 65–9. 2010.
- MEO, S. A.; AL-ASIRI, S. A.; MAHESAR, A. L.; ANSARI, M. J. Role of honey in modern medicine. **Saudi J Biol Sci.** v. 24, n.5, p. 975-978, 2017.
- MIHAI, M.M.; HOLBAN, A.M.; GIURCĂNEANU, C.; POPA, L.G.; BUZEA, M.; FILIPOV, M.; LAZĂR, V.; CHIFIRIUC, M.C.; POPA, M.I. Identification and phenotypic characterization of the most frequent bacterial etiologies in chronic skin ulcers. **Rom. J. Morphol. Embryol.** v. 55, n. 4, p. 1401-1408, 2014.
- MISIRLI, G. M.; PATRICIO, B. F. C.; ABRANTES, S. M. P. Nanopartículas de Prata para uso Bactericida: Fatores Extrínsecos e Intrínsecos para Aumento da Estabilidade. **Virtual Quim**, v.14, n.5, p. 902-915, 2022.
- MISONO, T. Dynamic Light Scattering (DLS). **Measurement Techniques and Practices of Colloid and Interface Phenomena.** March, p. 65–69, 2019.
- MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles - A review. **Trop. J. Pharm. Res.** v. 5, n. 1, 2006.
- MOORE, J. C.; SPINK, J.; LIPP, M. Development and Application of a Database of Food Ingredient Fraud and Economically Motivated Adulteration from 1980 to 2010. **Journal Food Science**, v. 77, p. 118–126. 2012.
- MOURA, S. G. **Boas práticas apícolas e a qualidade do mel de abelhas *Apis mellifera Linnaeus, 1758***. 76 f. Tese de Doutorado- Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina. 2010.
- MUTIA, A. A. B.; CUMBA, R. M. T.; CAPANGPANGAN, R. Y.; ALGUNO, A. C. Controlling the Particle Size and Absorption Spectra of Honey Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles for Antibacterial Application. **Journal of Biomimetics, Biomaterials and Biomedical Engineering.** August, v. 58. 2022.
- NEGA, A.; MULUGETA, E.; ABEBAW, A. Physicochemical Analysis and Determination of the Levels of Some Heavy Metals in Honey Samples Collected from Three District Area of East Gojjam Zone of Amhara Region, Ethiopia. **J. AgriSci Food Res.**, v. 11, n. 4, 2020.
- NEGUT, I.; GRUMEZESCU, V.; GRUMEZESCU, A. M. Treatment Strategies for Infected Wounds. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2392, 2018.

NIRAIMATHI, K. L.; SUDHA, V, LAVANYA, R.; BRINDHA, P. Biointerfaces Biosynthesis of silver nanoparticles using *Alternanthera sessilis* (Linn.) extract and their antimicrobial, antioxidant activities. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 1, n. 102, p. 288-291, 2013.

NITANAN, T.; AKKARAMONGKOLPORN, P.; ROJANARATA, T.; NGAWHIRUNPAT, T.; OPANASOPIT, P. Neomycin-loaded poly (styrene sulfonic acid-co-maleic acid) (PSSA-MA) /polyvinyl alcohol (PVA) ion exchange nanofibers for wound dressing materials. **Int. J. Pharm.** v. 448, n.1, p. 71-8, 2013.

NOOR, N.; SARFRAZ, R. A.; ALI, S.; SHAHID, M. Antitumour e Potencial Antioxidante de alguns méis paquistaneses selecionados. **Food Chem.** v. 143, p. 362- 366, 2014.

NORDIN, A., SAINIK, N. Q. A. V., CHOWDHURY, S. R., SAIM, A. BIN, e IDRUS, R. B. H. Physicochemical properties of stingless bee honey from around the globe: A comprehensive review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.73, p. 91–102. 2018.

OECD. **Test No. 402: Acute Dermal Toxicity, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4**, OECD Publishing, Paris, 2017.

OJEH, N.; PASTAR, I.; TOMIC-CANIC, M.; STOJADINOVIC, O. Stem cells in skin regeneration, wound healing, and their clinical applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 25476–25501, 2015.

OLIVEIRA, F. de C.; MEDEIROS, C. A. C.; MORAES, Francisca Andreia de Sousa. Análise de mel de abelha coletado em comércio informal na cidade de Teresina, PI. **Higiene alimentar**, v. 31, n. 268/269, 2017.

OLIVEIRA, F. F. RICHERS, B. T. T.; SILVA, J. R.; FARIAS, R. C.; MATOS, T. A. L. **Guia ilustrado das abelhas “sem ferrão” das reservas de Amanã e Mamirauá, Amazonas, Brasil (Hymenoptera, Apidae, Meliponini)**. 267p. Tefé: IDSM, 2013.

OLIVEIRA, J. T L. B; LIMA, L. F; SILVA, K. J. S; VASCONCELLOS, A. A; JÚNIOR, P. S. T. **Avaliação da qualidade do mel de abelhas sem ferrão produzidos no município de Óbidos – Pará, Brasil. Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 71ª Reunião Anual da SBPC - 21 a 27 de julho de 2019 - UFMS - Campo Grande / MS, 2019.

OMOLO, C. A.; KALHAPURE, R. S.; JADHAV, M.; RAMBHAROSE, S.; MOCKTAR, C.; NDESENDO, V. M. K.; GOVENDER, T. Pegylated oleic acid: A promising amphiphilic polymer for nano-antibiotic delivery. **Eur. J. Pharm. Bipharm.**, v. 112, p.96-108, 2017.

ORYAN, A.; ALEMZADEH, E. Effects of insulin on wound healing: a review of animal and human evidence. **Life Sciences**, v. 174, p. 59-67, 2017.

OSKUEE, R. K. BANIKAMALI, A.; BAZZAZ, B. S. F.; HOSSEINI, A. A.; DARROUDI, M. Honey-based and ultrasonic-assisted synthesis of silver nanoparticles and their antibacterial activities. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 8, p. 7989–7993, 2016.

OSMAN MAHMUD, S.; HAMAD SHAREEF, S.; JABBAR, A. A.; HASSAN, R. R.; JALAL, H. K.; ABDULLA, M. A. Green synthesis of silver nanoparticles from aqueous extract of *tinospora crispa* stems accelerate wound healing in rats. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, 2022.

OTTONI, C. A. Ramos, C. E. D.; Souza, R. F. B. de; Silva, S. G. da; Spinace, E. V.; Neto, A. O. Glycerol and ethanol oxidation in alkaline medium using PtCu/C electrocatalysts. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 13, n. 2, p. 1893–1904, 2018.

PADILHA, F.A; **Microscopia Eletrônica de Transmissão Departamento de Engenharia Metalúrgica de Materiais - EPUSP**, 2014.

PADILLA-CAMBEROS, E.; JUÁREZ-NAVARRO, K. J.; SANCHEZ-HERNANDEZ, I. M.; TORRES-GONZALEZ, O. R.; FLORES-FERNANDEZ, J. M. Toxicological Evaluation of Silver Nanoparticles Synthesized with Peel Extract of *Stenocereus queretaroensis*. **Materials (Basel)**, v.15, n.6, p. 5700, 2022.

PARÁ. Portaria N°7554/2021. 22 de novembro de 2021. ADEPARÁ, 22 de novembro de 2021. **Regulamento técnico de identidade e qualidade do mel de abelhas nativas sem ferrão (hymenoptera, Apidae, meliponini) no estado do Pará**. Diário Oficial, Imprensa Oficial do estado do Pará, p. 51. Belém. 23 nov. 2021.

PAREEK, V.; BHARGAVA, A.; GUPTA, R.; JAIN, N.; PANWAR, J. Synthesis and Applications of Noble Metal Nanoparticles: A Review. **Advanced Science, Engineering and medicine**, v.9, n.7, p. 527-544, 2017.

PATHAKOTI, K.; MANUBOLU, M.; HWANG, H. Nanostructures: Current uses and future applications in food Science. **Journal of Food and Drug Analysis**, 25, 2, p. 245-253, 2017.

PATRA, J. K.; DAS, G.; FRACETO, L. F.; CAMPOS, E. V. R.; RODRIGUEZ-TORRES, M. P.; ACOSTA-TORRES, L. S.; DIAZ-TORRES, L. A.; GRILLO, R.; SWAMY, M. K.; SHARMA, S.; HABTEMARIAM, S.; SHIN, H. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **J. Nanobiotechnol**, v. 16, n. 1, p. 71, 2018.

PEDRO, S. R. de M. The stingless bee fauna in Brazil (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**. n. 61, n. 4, p. 348-354. 2014.

PERALTA-VIDEA, J. R.; HUANG, Y.; PARSONS, J. G.; ZHAO, L.; LOPEZ-MORENO, L.; HERNANDEZ-VIEZCAS, J. A.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Plant-based green synthesis of metallic nanoparticles: scientific curiosity or a realistic alternative to chemical synthesis? **Nanotechnology for Environmental Engineering**, v. 1, n. 4, p. 1-29, 2016.

PEREIRA, O. J. R.; REIS, J. M. Estudo Comparativo da Ação Bactericida do Mel sobre *Staphylococcus aureus*. **Ciências em saúde**, v. 5, n. 2, p. 117-121, 2015.

PIMENTEL, R. B. de Q. **Avaliação da atividade antibacteriana e identificação de compostos fenólicos do mel de abelhas sem ferrão (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae) *Melipona compressipes manaoenses* e *Melipona seminigra***. Dissertação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas – UEA. Manaus-AM, 2010.

PIRES, C. A.; DOS SANTOS, M. A. L.; OLIVEIRA, B. F. de; DE SOUZA, C. R.; BELARMINO, L. N. M.; MARTINS, M. F. Infecções bacterianas primárias da pele: perfil dos casos atendidos em um serviço de dermatologia na Região Amazônica, Brasil. **Pan-Amaz Saude**. v. 6. n.2, 2015.

PRABA, P. S.; V.; VASANTHA, V. S.; JEYASUNDARI, J.; Y. JACOB, Y. B. A. Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using *Ficus microcarpa* leaf extract and evaluation of their antibacterial activities. **European Chemical Bulletin**, v. 4, n. 3, p. 116–120, 2015.

PRABULA, S. S.; HENTRY, C.; ROSE, L. B.; PARVATHIRAJA, C.; MANI, A.; WABAIDUR, S. M.; ELDESOKY, G. E.; ISLÁ, M. A. Synthesis of Silver Nanoparticles by Using *Cassia auriculata* Flower Extract and Their Photocatalytic Behavior. **Chemical Engineering e Technology**, v. 45, n. 11, p. 1919-1925, 2022.

PRATHNA, T. C.; CHANDRASEKARAN, N.; RAICHUR, A. M.; MUKHERJEE, A. Biomimetic synthesis of silver nanoparticles by *Citrus limon* (lemon) aqueous extract and theoretical prediction of particle size. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, n. 1, p.152-159, 2011.

PRYSHCHEPA, O.; POMASTOWSKI, P.; BUSZEWSKI, B. Silver nanoparticles: Synthesis, investigation techniques, and properties, **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 284, 2020.

PUSCAS, A.; HOSU, C.; CIMPOIU, C. Application of a newly developed and validated high-performance thin-layer chromatographic method to control honey adulteration. **Journal of Chromatography A**. v. 1272, p. 132 – 135, 2013.

RADOVIC-MORENO, A. F.; LU, T. K.; PUSCASU, V. A.; YOON, C. J.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. Surface charge-switching polymeric nanoparticles for bacterial cell wall-targeted delivery of antibiotics. **ACS Nano**. v. 6, n. 5, p. 4279-4287, 2012.

RAI, M. K.; DESHMUKH, S. D.; INGLE, A. P.; GADE, A. K. Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. **J. Appl. Microbiol.** v. 112, n. 5, p. 841-52, 2012.

RAMOS, A. P. 4-Dynamic Light Scattering Applied to Nanoparticle Characterization. **In Micro and Nano Technologies, Nanocharacterization Techniques**, p. 99-110, 2017.

RANI, G. N.; RAO, B. N.; SHAMILI, M.; PADMAJA, I. J. Combined effect of silver nanoparticles and honey in experimental wound healing process in rats. **Biomedical Research (0970-938X)**, v. 29, n. 15, 2018.

RANI, P.; KUMAR, V.; SINGH, P. P.; MATHARU, A. S.; ZHANG, W.; KIM, K. H.; SINGH, J.; RAWAT, M. Highly stable AgNPs prepared via a novel green approach for catalytic and photocatalytic removal of biological and non-biological pollutants. **Environment International**, n.143, 2020.

RATNER, D. B.; HOFFMAN, A. S. ; SCHOEN, F. J. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine**. 3a ed., Academic Press. 2012.

REIRE, P. L.; STAMFORD, T. C.; ALBUQUERQUE, A. J.; SAMPAIO, F. C.; CAVALCANTE, H. M.; MACEDO, R. O.; GALEMBECK, A.; FLORES, M. A.; ROSENBLATT, A. Action of silver nanoparticles towards biological systems: cytotoxicity evaluation using hen's egg test and inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation. **Int. J. Antimicrob. Agents**. v. 45, n.2, p. 183-187, 2015.

RESCH, S.; FARINA, M. C.; Mapa do conhecimento em nanotecnologia no setor agroalimentar. **Adm. Mackenzie**, v. 16, n. 3, 2015.

RIBEIRO, F. D. A. Q.; DE CARVALHO, M. D. F. P.; PEREIRA, C. S. B.; TATENO, D. A. Análise da concentração de colágeno tipo I e III presente no reparo de feridas tratadas com Mitomicina C em ratos/Analysis of the concentration of collagen type I and III in the wound of rat's skin treated with Mitomycin C. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, p. 22-26, 2015.

RIBEIRO, J. G.; PIRES, P. S. S.; BRANDÃO, T. M. *et al.* Fenólicos Totais e Atividade Antioxidante de Méis de Abelha de Diferentes Floradas. **Eletrônica Nutritime**. v.12, n.1, p. 3903-3909, 2015.

RIBEIRO, R. de O. R.; MÁRSICO, E. T.; CARNEIRO, C. da S.; MONTEIRO, M. L. G.; CONTE JÚNIOR, C.; OLIVEIRA DE JESUS, E. F. Detection of honey adulteration of high fructose corn syrup by Low Field Nuclear Magnetic Resonance (LF <sup>1</sup>H NMR). **Journal of Food Engineering**, v. 135, p. 39-43. 2014.

RITTIÉ, L. Method for Picrosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. **Methods Mol Biol**. v. 1627, p. 395-407, 2017.

ROÓS, P. B.; SOARES, L. B.; RESMIM, C. M.; ROSA, F. P.; FARINA, J. B.; VIELMO, N. I C.; SISTI, J. N.; CAETANO, M. M.; TUSI, M.M. Avaliação de parâmetros físico-químicos e da atividade antimicrobiana *in vitro* de méis de jataí (*tetragonisca angustula*) provenientes do Rio Grande do Sul. **Perspectiva, Erechim**. v. 42, n.159, p. 97-107, 2018.

ROY, S.; DAS, A.; GANESH, K.; SEN, C. K. Wound inflammation: from initiation to RESOLUTION. In: AGGARWAL, B. B.; KRISHNAN, S.; GUHA, S. (Ed.). **Inflammation, lifestyle and chronic diseases: the silent link**. Boca Raton: CRC Press, p. 183-201, 2012.

RUDRAMURTHY, G., SWAMY, M., SINNIHAH, U., GHASEMZADEH, A., RUDRAMURTHY, G. R., SWAMY, M. K., GHASEMZADEH, A. Nanoparticles: Alternatives Against Drug-Resistant Pathogenic Microbes. **Molecules**, v. 21, n.7, p.836. 2016.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JARA PÉREZ-JIMÉNEZ, J. P.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)**. Embrapa Agroindústria Tropical, Cominidado técnico online, ISSN 1679-6535, 2006.

RUGGERI, M.; VIGANI, B.; BOSELLI, C.; A. ICARO CORNAGLIA, A.; COLOMBO, D.; SÀNCHEZ-ESPEJO, R.; DEL FAVERO, E.; MANDRAS, N.; ROANA, J.; CAVALLO, L.; CANTÙ, L.; VISERAS, C.; ROSSI, S.; SANDRI, G. Smart nano-in-microparticles to tackle bacterial infections in skin tissue engineering. **Materials Today Bio**, v. 16, 2022.

SALGUEIRO, F. B.; LIRA, A. F.; RUMJANEK, V. M.; CASTRO, R. N. Phenolic composition and antioxidant properties of brazilian honeys. **Quím. Nova**, Vol. 37, n. 5, p. 821-826, 2014.

SANGA, B.; KHAREL, M. K. Cloranfenicol. **Módulo de Referência em Ciências Biomédicas**, 2022.

SANT'ANA, L. D.'O.; SOUSA, J. P. M.; SALGUEIRO, F. B.; LORENZON, M. C. A.; CASTRO, R. Characterization of monofloral honeys with multivariate analysis of their

chemical profile and antioxidant activity. **Journal of food science**, v. 77, n. 1, pp. C135-C140, 2012.

SANTOS, K. R. P.; AGUIAR JUNIOR, F. C. A.; ANTONIO, E. A.; SILVA, F.R.; SILVA, K. T., MARINHO, K. S. N.; LIMA JUNIOR, N. R. P. S. **Manual de técnica histológica de rotina e de colorações - Universidade Federal de Pernambuco pró-reitoria de extensão e cultura centro acadêmico de vitória núcleo de ciências biológicas**. Vitória de Santo Antão, 2021.

SCHERRER, M. A. R.; ABREU, É. P.; ROCHA, V. B. Neomycin: sources of contact and sensitization evaluation in 1162 patients treated at a tertiary service. **Anais Brassieres de Dermatologia**, v. 98, p. 487-492, 2023.

SCHIEVANO, E.; STOCCHERO, M.; MORELATO, E.; FACCHIN, C.; MAMMI, S. An NMR based metabolomic approach to identify the botanical origin of honey. **Metabolomics**, v. 8. p. 679-690, 2012.

SEABRA, A.B.; DURÁN, N. Nanotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles. **Metals**, v. 5, n..2, p. 934-974. 2015.

SENGUPTA, M.; BANERJEE, P.; PAUL, S.; SENGUPTA, J.; GHOSH, M. Healing effect of phenytoin on excisional wound in experimental albino rats. **Muller J. Med. Sci. Res**, v. 6, n. 1, p. 27-30, 2015.

SERAGLIO, S. K. T.; SILVA, B.; BERGAMO, G.; BRUGNEROTTO, P.; GONZAGA, L. V.; FETT, R.; COSTA, A. C. O. An overview of physicochemical characteristics and health-promoting properties of honeydew honey. **Food Research International**. v. 119, p. 44-66, 2019.

SERENA, T. E.; BOWLER, P. G.; SCHULTZ, G.S.; D'SOUZA, A.; RENNIE, M. Y. Are Semi-Quantitative Clinical Cultures Inadequate? Comparison to Quantitative Analysis of 1053 Bacterial Isolates from 350 Wounds. **Diagnostics**, v. 11, n. 7, p. 1239, 2021.

SHENOY, E. S.; MACY, E.; ROWE, T. BLUMENTHAL KG. Avaliação e Manejo da Alergia à Penicilina: **Uma Revisão**. **JAMA**. v. 321, n. 2, pp. 188-199, 2019.

SHU, G.; XU, D.; XIE, S.; CHANG, L.-J.; LIU, X.; YANG, J.; LI, Y.; WANG, X. The antioxidant, antibacterial, and infected wound healing effects of zno quantum dots-chitosan biocomposite. **Appl. Surf. Sci**. v. 611, 2023.

SIDDIQUI, M.H.; AL-WHAIBI, M.H.; FIROZ, M.; AL-KHAISHANY, M.Y. Role of Nanoparticles in Plants. **Nanotechnology and Plant Sciences**. Springer, Cham. p. 19-35, 2015.

SILVA, A. dos S.; ALVES, C. N.; FERNANDES, K. das G.; MÜLLER, R. C. S. Classification of Honeys from Pará State (Amazon Region, Brazil) Produced by Three Different Species of Bees using Chemometric Methods. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 24, n. 7, p. 1135-1145, 2013.

SILVA, B. L. da. **A influência do tamanho das nanopartículas na atividade antibacteriana do ZnO**. 192 f. Dissertação de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP. ARARAQUARA – SP. 2017.

SILVA, K. D. C. **Síntese e caracterização de nanopartículas estabilizadas com goma de cajueiro: atividade catalítica, atividade antibacteriana e avaliação da toxicidade.** Doctoral dissertation, Universidade Federal do Piauí. 2020.

SILVA, M. M. **Capacidade antioxidante dos méis de *melipona Fasciculada* Smith coletados na região da Amazônia Maranhense.** Doutorado em Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia. Universidade Federal de São Luís, São Luís, 2021.

SILVA, M. T. **Análise da cicatrização após o uso de três diferentes agentes para a limpeza de feridas infectadas. Estudo experimental.** Dissertação /curso de graduação em ciências médicas da Universidade Federal de Santa Catarina, mestrado em ciências médica, Florianópolis, 2004.

SILVA, P. de L. M. da; LIMA, Liliane Schier de; CAETANO, Ísis Kaminski. Comparative analysis of the volatile composition of honeys from Brazilian stingless bees by static headspace GC–MS. **Food Research International.** v. 102, p. 536-543, 2017.

SILVA, P. L. da. **Nanopartículas de prata para utilização como agente antimicrobiano em blendas de amido e poli (álcool vinílico).** 2016. 120 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

SILVANO, M. F., VARELA, M. S., PALACIO, M. A., RUFFINENGO, S, YAMIL, D. K. Physicochemical parameters and sensory properties of honeys from Buenos Aires region. **Food Chemistry.** v.152, v.1, p. 500-507, 2014

SINGH, H.; DU, J.; SINGH, P.; HY, T. H. Role of green silver nanoparticles synthesized from *Symphytum officinale* leaf extract in protection against UVB-induced photoaging. **J. Nanostruct Chem,** v. 8, p. 359-368, 2018.

SINGH, J., DUTTA, T., KIM, K. H., RAWAT, M., SAMDDAR, P., KUMAR, P. “Green” synthesis of metals and their oxide nanoparticles: Applications for environmental remediation. **Journal of Nanobiotechnology,** v.16, n. 84, 2018.

SOHAIMY El, S.A.; MASRY, S.H.D.; SHEHATA, M.G. Physicochemical characteristics of honey from different origins, **Ann. Agric. Sci.,** v. 60, n. 2, p. 279-287, 2015.

SOUSA, A.; RAMALHO, A.; FERNANDES, E.; FREITAS, M. Nanopartículas de prata, **Ciência Elem.,** v. 10, n. 3, p. 40, 2022.

SOUZA, I. C. C. de.; MORÁS, E. H.; TEIXEIRA, I. R. D. V. Uma revisão de literatura: atividade antimicrobiana do mel derivado de abelhas sem ferrão. **Revista Multidisciplinar De Educação E Meio Ambiente,** v. 2, n.2, p. 88, 2021.

SRIDHARAN, K.; ENDO, T.; CHO, S.-G.; KIM, J.; PARK, T. J.; PHILIP, R. Single step synthesis and optical limiting properties of Ni–Ag and Fe–Ag bimetallic nanoparticles. **Optical Materials,** v.35, n. 5, p. 860-867, 2013.

STOJKOVSKA, J.; PETROVIC, P.; JANCIC, I.; MILENKOVIC, T. M.; OBRADOVIC, B. Novel nano-composite hydrogels with honey effective against multi-resistant clinical strains of

*Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 8529–8543, 2019.

SU, Y.; RICHMOND, A. Chemokine regulation of neutrophil infiltration of skin wounds. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 11, p. 631–640, 2015.

SUBRAMANIAM, S.; KUMARASAMY, S.; NARAYANAN, M.; RANGANATHAN, M.; RATHINAVEL, T.; CHINNATHAMBI, A.; ALAHMADI, T.A.; KARUPPUSAMY, I.; PUGAZHENDHI, A.; WHANGCHAI, K. Spectral and structure characterization of *Ferula assafoetida* fabricated silver nanoparticles and evaluation of its cytotoxic, and photocatalytic competence. **Environ. Res.** v. 204, 2022.

SUHAG, Y.; NAYIK, G. A.; NANDA, V. Effect of gum arabic concentration and inlet temperature during spray drying on physical and antioxidant properties of honey powder. **Food Measure**, v. 10, n. 2, p. 350-356, 2016.

SZWEDA, P. Antimicrobial Activity of Honey. **Journals IntechOpen**. March 15 th, 2017.

TAN, M. K.; HASAN ADLI, D. S.; TUMIRAN, M. A.; ABDULLA, M. A.; YUSOFF, K. M. The efficacy of Gelam honey dressing towards excisional wound healing. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, n. 1, p. 805932, 2012.

TANG, S.; ZHENG, J.; Antibacterial activity of silver nanoparticles: Structural effects. **Advanced Healthcare Materials**, jul., v.7, n.13, 2018.

TAYLOR, T. A.; UNAKAL, C. G. *Staphylococcus aureus* Infection. 2022. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**, 2023.

TEJIRAM, S.; KAVALUKAS, S. L.; SHUPP, J. W.; BARBUL, A. Wound healing, in: M.S.B.T. W.H.B. Ågren (Ed.), *Wound Heal. Biomater.* **Woodhead Publishing**, p. 3-39, 2016.

TESFAYE, B.; BEGNA, D.; ESHETU, M. Evaluation of physico-chemical properties of honey produced in Bale Natural Forest, Southeastern Ethiopia. **IJASFT**. v. 2, n. 1, p. 21-27, 2016.

THOMAS, R.; JANARDHANAN, A.; VARGHESE, R.T.; SONIYA, E. V.; MATHEW, J.; RADHAKRISHNAN, E. K. Antibacterial properties of silver nanoparticles synthesized by marine *Ochrobactrum* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1221-1227, 2014.

TORNUK, F.; KARAMAN, S.; OZTURK, I.; TOKER O.S.; TASTEMUR B.; SAGDIC O. DOGAN, M.; KAYACIER, A. Quality characterization of artisanal and retail Turkish blossom honeys: Determination of physicochemical, microbiological, bioactive properties and aroma profile. **Industrial Crops and Products**, v. 46, p. 124-131, 2013.

TREFRY, J. C. **The Development of Silver Nanoparticles as Antiviral Agents"** **Browse all Theses**. Dissertations, 2011.

TSOURDI, E.; BARTHEL, A.; RIETZSCH, H.; REICHEL, A; BORNSTEIN, S. R. Current aspects in the pathophysiology and treatment of chronic wounds in diabetes mellitus. **Biomed Res. Int.** v. 2013, 2013.

TUKSITHA, L.; CHEN, Y. S.; CHEN, Y.; WONG, K.; PENG, C. Antioxidant and antibacterial capacity of stingless bee honey from Borneo (Sarawak). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 21, n. 2, p. 563-570, 2018.

UMOREN, S. A.; OBOT, I. B.; GASEM, Z. M. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using red apple (*Malus domestica*) fruit extract at room temperature. **J. Mater. Environ. Sci.** v.5, n.3, p. 907-914, 2014.

VALLIANOU, N. G.; GOUNARI, P.; SKOURTIS, A.; PANAGOS, J.; KAZAZIS, C. Honey and its Anti-Inflammatory, Anti-Bacterial and Antioxidant Properties. **Gen Med (Los Angel)**, v. 2, n. 2, 2014.

VAN LOO, P. L.; KUIN, N.; SOMMER, R.; AVSAROGLU, H.; PHAM, T.; BAUMANS, V. Impact of 'living apart together' on postoperative recovery of mice compared with social and individual housing. **Lab Anim.** v. 41, n.4, p. 441-55, 2007.

VANLALVENI, C.; RAJKUMARI, K.; BISWAS, A.; ADHIKARI, P. P.; LALFAKZUALA, R.; ROKHUM, L. Green synthesis of silver nanoparticles using *Nostoc linckia* and its antimicrobial activity: a novel biological approach. **BioNanoScience**, v. 8, n. 2, p. 624-631, 2018.

VENU, R.; RAMULU, T. S.; ANANDAKUMAR, S.; RANI, V.S., KIM, C.G. Bio-directed synthesis of platinum nanoparticles using aqueous honey solutions and their catalytic applications. **Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.**, v. 384, n. 1-3, p.733-738, 2011.

VIANA, A. V.; VIANA, D. dos S. F.; FIGUEIRÊDO, G. S. de; BRITO, J. E. de; VIANA, V. G. F.; VIANA JUNIOR, V. G. F. Antimicrobial potential of silver nanoparticles stabilized in curcumin and cashew leaf extract (*Anacardium occidentale* L.). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, 2021.

VIJAYAKUMAR, V.; SAMAL, S. K.; MOHANTY, S.; NAYAK, S. K. Recentes avanços em biopolímeros e materiais à base de nanopartículas metálicas no gerenciamento de cicatrização de feridas diabéticas. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 122, pp. 137–148, 2019.

VILLAS-BÔAS, J. **Manual tecnológico de aproveitamento integral dos produtores das abelhas nativas sem ferrão**. 2. ed. Brasília, DF: Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN), 2018.

VILLAS-BÔAS, J. **Manual Tecnológico Mel de Abelhas sem Ferrão- (1ª edição)**. Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN), p.96. 2012.

VIT, P.; VARGAS, O.; ZTRINY, L.; VALLE, F. Meliponini biodiversity and medicinal uses of pot-honey from el oro province in Ecuador. **Emirates Journal, of Food and Agriculture**, v. 27, n. 6, p. 502-506, 2015.

WAHEED, M.; HUSSAIN, M. B.; JAVED, A.; MUSHTAQ, Z.; HASSAN, S.; SHARIATI, M. A.; KHAN, M. U.; MAJEED, M.; NIGAM, M.; MISHRA, A. B.; HEYDARI, M. Honey and cancer: A mechanistic review. **Clinical Nutrition**, v. 38, n.6, p. 2499-2503, 2019.

WANG, J.; LI, Q. X. Chemical composition, characterization, and differentiation of honey botanical and geographical origins. **Advances in food and nutrition research**, v. 62, p. 89-137, 2011.

WANG, W.; LU, K. J.; YU, C. H.; HUANG, Q. L.; DU, Y. Z. Nano-drug delivery systems in wound treatment and skin regeneration. **J. Nanobiotechnol.** v. 17, n. 82, p. 1–15, 2019.

WARD, J.; HOLDEN, J.; GROB, M.; SOLDIN, M. Management of wounds in the community: Five principles. **Br. J. Community Nurs.** n. 24, n. 6, pp. 20- 23. 2019.

WEI, L.; LU, J.; XU, H.; PATEL, A.; CHEN, Z. S.; CHEN, G. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. **Drug Discov Today.** v. 20, n. 5, p. 595-601, 2015.

WONG, P.; LING, H. S.; CHUNG, K. C.; YAU, THOMAS, M, S.; GINDI, S. R. A. Chemical Analysis on the Honey of *Heterotrigena itama* and *Tetrigona binghami* from Sarawak, Malaysia (Analisis Kimia pada Madu *Heterotrigena itama* dan *Tetrigona binghami* dari Sarawak, Malaysia). **Sains Malaysiana**, v. 48, n. 8, p. 1635-1642, 2019.

XUE, B.; HE, D.; GAO, S.; WANG, D.; YOKOYAMA, K., WANG, L. Biosynthesis of silver nanoparticles by the fungus *Arthroderma fulvum* and its antifungal activity against genera of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium*. **Int. J. Nanomedicine**, v. 4, n.11, p.1899-906, 2016.

YAACOB, M.; RAJAB, N. F.; SHAHAR, S.; SHARIF, R. Stingless bee honey and its potential value: a systematic review, **Food Res.**, v. 2, n. 2, p. 124–133, 2017.

YAMAMOTO, L.; ASSIS, A.; MORAIS, H.; SOUZA, FÁBIO.; MIOTTO, L.; SATO, A.; SOUZA, R.; ROBERTO, S. Ripening evolution of 'BRS Clara' grape under protected cultivation during out of season crop. **Bragantia**, v. 70, p. 825-831, 2010.

YILMAZ, A. C. e AYGIN, D. Curativo de mel no tratamento de feridas: uma revisão sistemática. **Terapias complementares em medicina**, v. 51, 2020.

YOU, C.; LI Q.; WANG, X.; WU P.; HO, J. K.; JIN, R.; ZHANG, L.; SHAO, H.; HAN, C. Estruturas de colágeno/quitosana carregadas com nanopartículas de prata promovem a cicatrização de feridas através da regulação da migração de fibroblastos e ativação de macrófagos. **Ciência Rep.**, v. 7, v.1, p.10489, 2017.

YOUNIS, P. H. M.; SEBAIE, A. E. M. E.; WAKED, I. S.; BAYOUMI, M. B. I. Validity and Reliability of a Smartphone Application in Measuring Surface Area of Lower Limb Chronic Wounds. **The Egyptian Journal, of Hospital Medicine**, v. 89, n. 2, p. 6612- 6616, 2022.

YOUSSEF, G. A.; EL-BORAEY, A. M.; ABDEL-TAWAB, M. M. Eco-Friendly Green Synthesis of Silver Nanoparticles from Egyptian Honey: Evaluating its Antibacterial Activities. **Egyptian Journal of Botany**. v. 59, n. 3, p. 709-721, 2019.

YOUSUF, F. A.; MEHMOOD, M. H.; MALIK, A.; SIDDIQUI, R.; KHAN, N. A. Antiacanthamoebic properties of natural and marketed honey in Pakistan. **Asian Pac. J. Trop. Biomed.** v. 6, n. 11, p. 967–972, 2016.

YUPANQUI MIELES, J.; VYAS, C.; ASLAN, E.; HUMPHREYS, G., DIVER, C.; BARTOLO, P. Honey: An advanced antimicrobial and wound healing biomaterial for tissue engineering applications. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 8, p.1663, 2022.

ZHANG, D.; HAMAUZU, Y. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. **Food Chem**, v. 88, n. 503, 2004

ZHANG, X. F.; LIU, Z.-G.; SHEN, W.; GURUNATHAN, S; Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, n.9, p.1534. 2016.

ZHAO, X.; ZHOU, L.; RIAZ RAJOKA, M. S.; YAN, L.; JIANG, C.; SHAO, D.; ZHU, J.; SHI, J.; HUANG, Q.; YANG, H.; JIN, M. Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 6, p. 817-835, 2018.

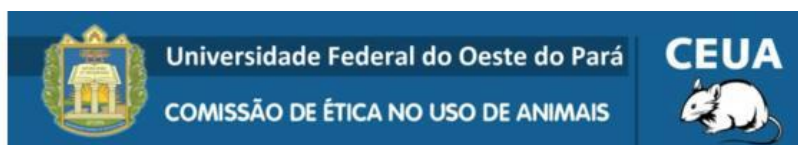
ZHENG, Y.; FU, L.; HAN, F.; WANG, A.; CAI, W.; YU, J.; YANG, J.; FENG, P. Green biosynthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using *Corymbia citriodora* leaf extract and their photocatalytic activity, **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 8, n. 2, p. 59-63, 2015.

ZHOU, Y.; KONG, Y.; KUNDU, S.; CIRILLO, D; LIANG, H. Antibacterial activities of gold and silver nanoparticles against *Escherichia coli* and bacillus Calmette-Guerin. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 10, n. 19, 2012.

ZHU, S.; GONG, L.; LI, Y.; XU, H.; GU, Z.; ZHAO, Y. Safety Assessment of Nanomaterials to Eyes: An Important but Neglected Issue. **Advanced Science**. v. 6, 2019.

ZHU, Z.; LIU, Y.; XUE, Y.; CHENG, X.; ZHAO, W.; WANG, J.; HE, R.; WAN, Q.; PEI, X. Tazarotene Released from Aligned Electrospun Membrane Facilitates Cutaneous Wound Healing by Promoting Angiogenesis. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, n. 11, n. 39, p. 36141-36153, 2019.

ZORRAQUÍN-PEÑA, I. CUEVA, C.; BARTOLOMÉ, B. ; MORENO-ARRIBAS, M. V. Silver Nanoparticles against Foodborne Bacteria, Effects at Intestinal Level and Health Limitations. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 132, 2020.

**ANEXO****ANEXO 1: Certificado de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)**

## CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo N° **1220220235**, intitulado **MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO ASSOCIADO A NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AGNPS) NO REPARO TECIDUAL DE FERIDAS CUTÂNEAS INFECTADAS EM RATOS WISTAR.**, sob a responsabilidade de **Ana Claudia Souza Abreu**, está de acordo com os Princípios éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA.

## CERTIFICATE

We certify that the protocol N° **1220220235**, entitled "**MÉIS DE ABELHAS SEM FERRÃO ASSOCIADO A NANOPARTÍCULAS DE PRATA (AGNPS) NO REPARO TECIDUAL DE FERIDAS CUTÂNEAS INFECTADAS EM RATOS WISTAR.**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Commission for Ethics in the Use of Animals of Universidade Federal do Oeste do Pará.

Santarém-PA, 26/05/2023