



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

KÁRITA JULIANA SOUSA SILVA

**MÉIS DE ABELHAS (*Melipona scutellaris* e *Apis Mellifera*) NO REPARO TECIDUAL
DE FERIDAS CUTÂNEAS INFECTADAS EM RATOS *WISTAR* (*Rattus norvegicus*
albinus)**

SANTARÉM - PA
2022

KÁRITA JULIANA SOUSA SILVA

**MÉIS DE ABELHAS (*Melipona scutellaris* e *Apis Mellifera*) 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 requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Sérgio Taube Junior

Co-orientadora: Profa. Dra. Márcia Mourão Ramos Azevedo

Área de concentração: Fisiologia ambiental

SANTARÉM - PA
2022

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

S586m Silva, Kárita Juliana Sousa
Méis de abelha (*Melipona Scutellaris* e *Apis Mellifera*) no reparo tecidual de feridas cutâneas infectadas em ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*). / Kárita Juliana Sousa Silva. – Santarém, 2022.
64 p. : il.
Inchi bibliografias.

Orientador: Paulo Sérgio Taube Júnior.

Coorientadora: Márcia Mourão Ramos Azevedo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Biociências.

1. Mel. 2. Ação Terapêutica. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Cicatrização. 5. Staphylococcus aureus. I. Taube Júnior, Paulo Sérgio, *orient.* II. Azevedo, Márcia Mourão Ramos, *coorient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 638.1

Bibliotecária - Documentalista: Cátia Alvarez – CRB/2 843

KÁRITA JULIANA SOUSA SILVA

**MÉIS DE ABELHAS (*Melipona scutellaris* e *Apis Mellifera*) 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 requisito para obtenção do título de Mestre em Biociências.
Área de concentração: Fisiologia ambiental

Conceito:

Data de aprovação: 15/07/2022

Banca examinadora:

(Assinado digitalmente em 19/07/2022 15:47)
PAULO SERGIO TAUBE JUNIOR
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
IBEF (11.01.06)
Matrícula: 1770373

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

(Assinado digitalmente em 20/07/2022 15:28)
JUAREZ DE SOUZA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 007.076.599-57

Prof. Dr. Juarez de Souza.
Universidade do Estado do Pará

(Assinado digitalmente em 19/07/2022 16:00)
HUGO DE CAMPOS BRAGA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 009.702.350-70

Prof. Dr. Hugo de Campos Braga
Universidade Federal de São Paulo – Campus São José dos Campos

(Assinado digitalmente em 19/07/2022 14:45)
ADRIANA CAROPREZO MORINI
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
IBEF (11.01.06)
Matrícula: 1967452

Profa. Dra. Adriana Caroprezo Morini.
Universidade Federal do Oeste do Pará

Dedico este trabalho a Deus, minha família e aos que sempre seguraram minhas mãos nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTO

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por seu infinito amor que me sustentou e fortaleceu durante toda essa caminhada. Por ser minha fonte de luz nos momentos de dificuldade, por me guiar e cuidar tão bem de mim e dos meus sonhos.

Agradeço à minha família que sempre foi a base da minha formação acadêmica e profissional. Obrigada por me apoiarem e me ajudarem nessa jornada.

Aos amigos que fiz durante o mestrado: Obrigada, por todas as palavras de incentivo, pelas conversas e pelos conselhos trocados.

Meus sinceros agradecimentos aos colegas do grupo de pesquisa pela ajuda. Em especial, Aldo, Igor Cardoso e Jéssica, sem vocês isso não seria possível. E, à minha parceira de pesquisa, colega de mestrado e amiga que ganhei para vida, Sorrel Godinho, você foi incansável até nos dias árduos e estressantes, nem tenho palavras para expressar minha gratidão.

Herman, Arilda e Lenize, obrigada pela ajuda durante todos os meses que passei no Biotério, por cuidarem tão bem dos meus animais, e por me auxiliarem inúmeras vezes no decorrer da pesquisa. Vocês foram essenciais no processo.

Agradeço também ao Jeosafá de Sousa, por me ajudar em toda parte microbiológica e pela paciência em me explicar muitas coisas que eu não entendia. Aprendi muito com você.

À Alessandra Camargo, minha amiga e parceira de pesquisa desde a graduação, pela ajuda e pelos conselhos desde à minha entrada no mestrado.

Agradeço a todos os professores que contribuíram com minha formação. Assim como diz Max Haetinger em sua canção *“A base de toda conquista é o professor. A fonte de sabedoria, um bom professor. Em cada descoberta cada invenção. Todo bom começo tem um bom professor”*. Obrigada, Mestres!

Agradeço imensamente à minha co-orientadora, que foi espetacular, profa. Dra. Márcia Mourão Azevedo, digo que foi Deus que lhe colocou no meu caminho quando eu achava que não conseguiria chegar até o fim desse processo. Obrigada pela calma, pela sabedoria, pelos conselhos e pelos ensinamentos. Se não fosse você, não teria terminado essa pesquisa.

E, por fim, agradeço ao meu orientador prof. Dr. Paulo Sérgio Taube Junior. Eu não poderia ter escolhido orientador melhor. Obrigada por ter aceito esse desafio, pela paciência e confiança, mesmo nos meus momentos de dúvidas e na minha ansiedade constante. Obrigada por me direcionar, ensinar, ajudar e por exercer com maestria seu papel de orientador. Agradeço mais ainda por ter sido perseverante diante de tantos obstáculos durante essa caminhada.

À todos que de certa forma colaboraram para a concretização dessa dissertação, muito obrigada.

“Não é digno de saborear o mel aquele que se afasta da colmeia com medo das picadas das abelhas”.

William Shakespeare

RESUMO

Nas últimas décadas iniciaram estudos para analisar as propriedades terapêuticas do mel, especificamente na cicatrização. O mel é um produto de baixo custo, o que facilita o acesso para população. O objetivo desta pesquisa foi investigar o processo de reparo tecidual de feridas cutâneas infectadas com *Staphylococcus aureus* em ratos *Wistar* através da aplicação do mel de abelha. Tratou-se de um estudo experimental, intervencional, quantitativo, analítico, controlado e aleatorizado. A amostra foi formada por 30 ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus* da linhagem *Wistar*, machos, alocados em 3 grupos de 10 animais cada, divididos em 6 subgrupos de 5 animais cada: sendo quatro subgrupos experimentais e dois subgrupos controles. Os grupos tiveram feridas cutâneas infectadas com inoculação de 0,5 mL de suspensão de uma cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), padronizada em laboratório de acordo com a escala de Mc Farland, em uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. O grupo experimental foi subdividido para aplicação a dois tipos de mel: *Melipona scutellaris*, nomeado para o estudo como (M01) e a outra amostra de *Apis mellifera* (A01). Foram realizadas análises físico-químicas, bioquímicas e ação antimicrobiana in vitro nos méis para seleção das duas amostras. Foram coletados swabs estéreis das lesões, sendo o material semeado em placas de Petri para observação da infecção induzida através da inoculação da suspensão de *S. aureus*. Após a eutanásia dos animais os tecidos foram corados com *Picro-sirius-red* e Hematoxilina-eosina para análise histológica. Na análise antibacteriana os resultados foram satisfatórios com a redução das bactérias nas placas de Petri. Na análise macroscópica houve redução da área da ferida em todos os grupos, mas os grupos tratados com mel apresentaram diferenças significativas melhores em relação ao grupo controle. Na avaliação da média de intensidade do infiltrado inflamatório, houve redução do infiltrado em todos os grupos, porém não houve diferença significativa. Na avaliação do colágeno, os grupos que receberam o tratamento com os méis de *Apis* e *Melipona* apresentaram uma maior deposição de feixes de fibras de colágeno, tendo diferença significativa em relação ao grupo controle. Conclui-se que os grupos tratados com mel apresentaram melhores resultados quanto a avaliação da área de contração da ferida e da deposição de fibras de colágeno.

Palavras-Chave: Ação Terapêutica. Atividade antimicrobiana. Cicatrização. Mel. *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

In recent decades, studies have begun to analyze the therapeutic properties of honey, specifically in healing. Honey is a low-cost product, which facilitates access for the population. The objective of this research was to investigate the process of tissue repair of cutaneous wounds infected with *Staphylococcus aureus* in Wistar rats through the application of honey. This was an experimental, interventional, quantitative, analytical, controlled and randomized study. The sample consisted of 30 rats of the species *Rattus norvegicus albinus* of the Wistar lineage, male, allocated in 3 groups of 10 animals each, divided into 6 subgroups of 5 animals each: four experimental subgroups and two control subgroups. The groups had infected skin wounds with inoculation of 0.5 mL of suspension of a standard strain of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), standardized in the laboratory according to the Mc Farland scale, at a concentration of 1.5×10^8 CFU/mL. The experimental group was subdivided for application to two types of honey: *Melipona scutellaris*, named for the study as (M01) and the other sample of *Apis mellifera* (A01). Physical-chemical, biochemical and in vitro antimicrobial action analyzes were carried out on the honeys for the selection of the two samples. Sterile swabs were collected from the lesions, and the material was sown in Petri dishes to observe the infection induced by inoculation of the *S. aureus* suspension. After the euthanasia of the animals, the tissues were stained with Picro-sirius-red and Hematoxylin-eosin for histological analysis. In the antibacterial analysis, the results were satisfactory with the reduction of bacteria in the Petri dishes. In the macroscopic analysis, there was a reduction in the wound area in all groups, but the groups treated with honey showed significantly better differences in relation to the control group. In the evaluation of the mean intensity of the inflammatory infiltrate, there was a reduction in the infiltrate in all groups, but there was no significant difference. In the collagen evaluation, the groups that received treatment with *Apis* and *Melipona* honeys showed a greater deposition of collagen fiber bundles, with a significant difference in relation to the control group. It is concluded that the groups treated with honey showed better results regarding the evaluation of the wound contraction area and the deposition of collagen fibers.

Keywords: Therapeutic Action. Antimicrobial activity. Healing. Honey. *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ferida operatória	29
Figura 2 - Amostras de méis e solução fisiológica aplicadas nos grupos experimentais e controle	30
Figura 3 - Utilização do <i>Image J</i> para seleção dos arquivos de imagens	31
Figura 4 - Escolha do parâmetro de análise: Área.	31
Figura 5 - Calibração da imagem com auxílio da régua e transformação de valores de pixels para cm.	32
Figura 6 - Demarcação da ferida e análise da área.	32
Figura 7 - Halos de inibição formados pela amostra de mel contra o microrganismo <i>S. aureus</i>	43
Figura 8 - Crescimento em placas de Petri das amostras coletadas na 0h, antes da indução da infecção com a suspensão padronizada de <i>S. aureus</i>	44
Figura 9 - Crescimento de microrganismos em placas de Petri após indução da infecção	45
Figura 10 - Placas de Petri semeadas com material coletado após 72 horas do início do tratamento	46
Figura 11 - Placas de Petri semeadas após 7 dias do início do tratamento	47
Figura 12 - Evolução da contração da ferida nos dias: 0, 3, 7 e 14 dias	48
Figura 13 - Fotomicrografia da área da ferida dos cortes histológicos realizados nos grupos do dia 7.....	53
Figura 14 - Fotomicrografia da área da ferida dos cortes histológicos realizados nos grupos do dia 14	54
Figura 15 Fotomicrografia da área da ferida mostrando a quantificação das fibras colágenas no tecido	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Subgrupos definidos e parâmetros adotados	23
Quadro 2 - Tipos de mel, localização e espécies	25
Quadro 3 - Identificação das Placas de Petri de acordo com a coleta dos swabs estéreis.	33
Quadro 4 - Valores obtidos nas análises das 8 amostras selecionadas previamente (PH, Acidez total mEq kg ⁻¹ , Açúcares redutores %, Umidade % e Cinzas)	37
Quadro 5 - Valores obtidos nas análises das 8 amostras selecionadas previamente (°Brix)	40
Quadro 6 - Valores obtidos nas análises bioquímicas das 8 amostras selecionadas previamente (Fenóis totais mgGA 100g ⁻¹ , DPPH % e FRAP)	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Demonstração da média da atividade antimicrobiana dos méis de abelha, de acordo com a amostra indicada, com formação de halos de inibição contra microrganismos testes listados em colunas e com o resultado dado em milímetros.	42
Tabela 2 - Análise de variância das medidas das lesões em ratos <i>Wistar</i> tratadas com méis de Apis, Melipona e soro fisiológico com 0, 3, 7 e 14 dias após a realização da lesão.	49
Tabela 3 - Área de cicatrização das feridas nos dias que foram realizadas as medições ...	49
Tabela 4 - Comparação das médias de intensidade do infiltrado inflamatório dos grupos com a coloração de hematoxilina eosina.	51
Tabela 5 - Resultado da média da gradação das fibras de Colágeno com 7 e 14 dias de tratamento.	56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Gráfico de Regressão demonstrando a evolução diária da área da ferida de cada grupo dia zero ao 14º dia de observação	51
--	----

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

°Brix	teor de sólidos solúveis
A01	Amostra de <i>Apis mellífera</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ceua	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DBCA	Diretriz Brasileira de prática para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
FRAP	poder antioxidante redutor de ferro
FIOCRUZ	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Osvaldo Cruz
GC	grupo controle
GEA	grupo tratado com o mel de <i>Apis mellífera</i>
GEM	grupo tratado com o mel de <i>Melipona scutellaris</i>
M01	Amostra de <i>Melipona scutellaris</i>
MEC	Matrix extracelular
MHA	Ágar Mueller-Hinton
NaCl	Cloreto de sódio
Ph	Potencial hidrogeniônico
S. aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
SBCA	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
Uepa	Universidade do Estado do Pará
UFC	Unidades formadoras de colônias
Ufopa	Universidade Federal do Oeste do Pará

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1 O MEL DE ABELHA.....	18
3.2 O MEL E SUA AÇÃO ANTIMICROBIANA.....	18
3.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E BIOQUÍMICAS DO MEL...	19
3.4 REPARO TECIDUAL.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	22
4.2 LOCAL E PERÍODO.....	22
4.3 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA.....	22
4.4 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	22
4.4.1 <i>Grupos da pesquisa</i>	23
4.5 PROCEDIMENTOS DA PESQUISA	24
4.5.1 <i>Preparo do inóculo bacteriano</i>	24
4.5.2 <i>Determinação do mel utilizado na pesquisa: Análise físico-química, bioquímica e Ação antimicrobiana in vitro</i>	24
4.5.3 <i>Anestesia e ato operatório</i>	28
4.5.4 <i>Pós-operatório</i>	29
4.5.5 <i>Avaliação macroscópica</i>	30
4.5.6 <i>Eutanásia dos animais</i>	32
4.5.7 <i>Avaliação microbiológica em placas de Petri</i>	33
4.5.8 <i>Avaliação microscópica</i>	34
5 ANÁLISE DOS DADOS.....	36
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
6.1 ANÁLISE FÍSICO QUÍMICA.....	37
6.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	41
6.3 AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DO MEL IN VITRO.....	42
6.4 AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA EM PLACAS DE PETRI.....	43

6.5 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA.....	47
6.6 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA.....	51
6.6.1 <i>Análise histológica do infiltrado inflamatório</i>	51
6.6.2 <i>Análise da densidade do Colágeno</i>	55
7 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO	64

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano, composta por uma complexa estrutura de tecidos, sendo formada por três camadas, sendo a epiderme a camada mais externa constituída por tecido epitelial estratificado pavimentoso; a derme a camada intermediária, formada por tecido conjuntivo; e, a hipoderme (tecido subcutâneo), camada mais interna, compõe-se por tecido adiposo. O tecido epitelial possui uma grande coesão celular, porém quando sofre uma lesão pode expor o tecido conjuntivo subjacente. A reparação dos tecidos lesados pode acontecer de duas formas: cicatrização por primeira intenção (espontaneamente) ou por segunda intenção, quando a lesão é mais extensa, apresenta grande destruição tecidual, as bordas mantêm-se separadas e podem apresentar infecção (RIVITTI, 2018; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; NITZ et al., 2006).

Conforme a Resolução nº12 de 1978, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o mel pode ser definido como um produto natural produzido pelas abelhas por meio do néctar de flores ou exsudatos sacarínicos de plantas (BRASIL, 1978). Deste modo, o mel é denominado como um produto elaborado por abelhas melíferas, sendo formado por diversos elementos, como pelo néctar das flores, excreções de insetos ou secreções de plantas, os quais são recolhidos pelas abelhas que os transformam através da combinação com substâncias específicas próprias, e armazenam nos favos até sua maturação (BRASIL, 2000). Vários fatores influenciam na qualidade do mel, por esse motivo existe grande variação na sua composição físico-química, entre esses fatores estão: o clima, espécie da abelha, maturação, processamento, local de armazenamento e tipo de flora de cada região (SILVA; QUEIROZ; FIGUEIRÊDO, 2004).

O mel apesar de ser aparentemente simples, possui uma combinação complexa de muitas substâncias, como proteínas, minerais, aminoácidos, vitaminas, flavonóides, enzimas, ácidos orgânicos, ácidos fenólicos e muitos outros nutrientes (PEREIRA, 2008).

A utilização do mel de abelha como forma de tratamento pode apresentar bons resultados, pois indica atividade cicatrizante e antibacteriana quando usado em feridas e queimaduras, atuando como uma barreira viscosa, que impede a entrada de substâncias e a perda de fluidos para o meio externo (ALVES et al., 2008).

Foi a partir do final da segunda guerra mundial que começaram a surgir estudos sobre cicatrização e foram se desenvolvendo ao longo dos anos com o surgimento de novas técnicas de tratamento. Na indústria farmacêutica existem muitos produtos e medicamentos cicatrizantes, no entanto ainda são de difícil acesso para uma parte da população, o que

evidencia a necessidade de realização de novos estudos utilizando matérias primas de cada região e tecnologias de baixo custo (MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003).

O mel vindo sendo utilizado para tratar feridas de forma empírica há muito tempo, contudo somente nos últimos anos começaram a desenvolver estudos para analisar suas propriedades e sua ação terapêutica na cicatrização de forma mais específica. O mel é um produto natural e de baixo custo, o que facilita o acesso para população.

Assim sendo, é importante a realização de um estudo mais detalhado, para investigar o potencial cicatrizante do mel, sua ação antimicrobiana e todo o processo de reparo tecidual após sua aplicação.

Deste modo, devido a carência de estudos que evidenciem o potencial de cicatrização de feridas, principalmente infectadas, através da aplicação do mel, o presente estudo torna-se importante na intenção de avaliar qual o efeito do mel no reparo tecidual, e se o mel além de ser cicatrizante pode atuar como antimicrobiano em feridas infectadas.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Investigar o processo de reparo tecidual de feridas cutâneas infectadas com *Staphylococcus aureus* em ratos *Wistar* através da aplicação do mel de abelha.

2.2 ESPECÍFICOS

- Analisar as características físico-químicas e bioquímicas de amostras de méis de abelhas da região e selecionar as melhores amostras para serem utilizadas na pesquisa;
- Realizar análise morfométrica da área das feridas dos animais;
- Verificar a ação antimicrobiana do mel nas feridas infectadas através da avaliação de placas de petri;
- Comparar a evolução do reparo tecidual entre os grupos experimentais tratados com as amostras de méis e grupo controle;
- Realizar análise histológica das amostras e identificar suas características;
- Verificar as diferenças histológicas entre as amostras dos grupos experimentais e controle.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O MEL DE ABELHA

O mel é um alimento natural produzido pelas abelhas derivado do néctar das flores, ou das secreções de componentes vivos das plantas ou ainda de excreções de insetos sugadores de plantas. Ele é composto de açúcares, principalmente D-frutose e D-glicose, ácidos orgânicos, enzimas, fragmentos sólidos colhidos pelas abelhas. O mel pode ser fluido, viscoso ou sólido, sua coloração varia quase incolor a marrom escuro, sendo que o sabor e o aroma variam de acordo com a florada (SILVA et al., 2006).

As características físico-químicas do mel variam de acordo com a região, pois sua composição depende de vários fatores, tais como, fontes vegetais, condições climáticas e solo, por esse motivo dois méis nunca são iguais (SILVA et al., 2006).

Atualmente, há duas linhas de estudo na criação de abelhas, a apicultura e a meliponicultura. A apicultura compreende abelhas exóticas oriundo de uma única espécie, a *Apis melífera*, responsáveis pela quase totalidade do mel comercializado no mundo. Já na meliponicultura encontram-se as abelhas sociais, de fácil manejo, sem ferrão ou meliponíneos. Existem mais de 400 espécies de meliponíneos, sendo o gênero *Melipona* o mais diverso e abriga as espécies mais produtoras de mel. O mel de meliponíneos se distingue da *Apis mellifera*, sobretudo no sabor e aroma característicos, chegando a altos preços no mercado. (OLIVEIRA et al., 2012).

Na região oeste paraense cerca de 68% das abelhas criada pelos produtores é a sem ferrão, como as jandaíras (*Melipona interrupta*), juparás (*Compressipes manaosensis*) e canudos (*Scaptotrigona depilis*). Essa escolha deve-se ao fato destas abelhas não serem agressivas e de fácil manejo, podendo ser executada facilmente por jovens, mulheres e idosos. A meliponicultura é uma prática tradicional, realizada há vários séculos por nativos da região (RAYOL; MAIA, 2013).

3.2 O MEL E SUA AÇÃO ANTIMICROBIANA

Segundo Silva et al. (2006), as propriedades do mel apresentam atividade antimicrobiana, esta atividade deve-se, principalmente, ao peróxido de hidrogênio produzido pela ação da enzima glicose oxidase. Além disso, há outros fatores que podem apresentar propriedade antimicrobiana: baixa atividade de água, baixo teor de proteína, baixo potencial redox em função dos altos teores de açúcares redutores, elevada pressão osmótica e baixo pH (potencial hidrogeniônico).

O mel não oferece condições favoráveis para o crescimento de bactérias por ser uma solução supersaturada de açúcares apresentando uma baixa atividade de água. Ademais, a acidificação natural do meio pode impedir a proliferação de microrganismos patogênicos (SILVA et al., 2006).

A excreção da enzima glicose-oxidase pelas abelhas, catalisa a conversão dos reagentes: glicose, água e oxigênio, nos produtos: ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. Estes produtos são apontados como potentes agentes antioxidantes por agredir o envoltório dos microrganismos, mantendo e preservando a esterilidade do mel no período de sua maturação. Dados de pesquisas têm confirmado a atividade antimicrobiana do mel para muitas bactérias patogênicas e alguns tipos de fungos (SILVA et al., 2006).

3.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E BIOQUÍMICAS DO MEL

Para a determinação da qualidade do mel as análises físico-químicas, bioquímicas, grau de pureza e nível de deterioração são dados importantes para a sua caracterização. Dentre os requisitos de qualidade do mel estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento destacam-se: maturidade (teor de açúcares redutores, umidade, sacarose aparente); pureza (sólidos insolúveis em água, cinzas, grãos de pólen); deterioração (fermentação, acidez, atividade diastásica, hidroximetilfurfural) (BRASIL, 2000).

A umidade corresponde a água presente em um alimento, o seu teor pode afetar consideravelmente as características do mel, principalmente quanto ao processo de estocagem e de desenvolvimento de microrganismos (GOIS et al., 2013). Segundo BRASIL (2000), para os méis de *Apis*, o valor máximo para este parâmetro é de 20%. E para os méis de *Melipona* é de 35% (VILLAS-BÔAS; MALASPINA, 2005).

Quanto aos teores de açúcares do mel, a sua quantificação é importante para avaliar o seu grau de doçura, já que é constituído de uma solução concentrada de, principalmente, dois açúcares redutores, frutose e glicose. A glicose é uma aldose, relativamente insolúvel, responsável pela granulação do mel e, sua precipitação ocasiona o aumento do teor de umidade propiciando que leveduras osmofílicas se multipliquem e provoquem fermentação. A frutose é uma cetose, apresenta alta higroscopicidade, contribuindo para a permanência do mel no estado líquido por maiores períodos (GOIS et al., 2013).

O teor de cinzas do mel expressa o seu conteúdo em minerais e está relacionado principalmente com a sua origem botânica e geográfica. Enquanto o pH e a acidez são fatores que promovem maior estabilidade ao mel quanto ao desenvolvimento de microrganismos. Os diferentes ácidos orgânicos que se encontram dissolvidos produzem íons de hidrogênio que

promovem acidez ativa a qual permite indicar as condições de armazenamento e o processo de fermentação (GOIS et al., 2013).

Os compostos fenólicos presentes nos méis configuram-se como uma boa fonte antioxidante por combater os radicais livres que são agentes causadores de vários problemas de saúde, tais como: doença de Parkinson, distúrbios gastrointestinais, isquemias cerebrais e cardíacas, envelhecimento, entre outros, além de apresentar atividade antibacteriana, anti-inflamatória e antiviral. As vitaminas C e E, β -caroteno e muitos tipos de compostos fenólicos, incluindo ácidos fenólicos e flavonoides, são antioxidantes naturais e, consideram-se que a ingestão dos compostos supracitados pode melhorar a proteção e as funções das células (OLIVEIRA et al., 2012).

Segundo Barth (2005), a qualidade do mel depende da sua composição química (tipos de açúcares, sais minerais, compostos fenólicos, proteínas e água) e dos grãos de pólen, que são provenientes das plantas fornecedoras de néctar. Além disso, as características físico-químicas e bioquímicas dos méis podem variar de acordo com o estágio de maturação do produto, das condições climáticas, das espécies de abelhas e do tipo de florada, daí a necessidade da realização da caracterização desses produtos na região que foram produzidas (PEREIRA, 2010).

3.4 REPARO TECIDUAL

O reparo tecidual é o processo de recuperação das lesões teciduais após perda de um fragmento de pele, se caracteriza primeiramente por um infiltrado inflamatório, em seguida pela formação de um tecido de granulação. O reparo de tecidos lesados pode acontecer por duas formas: regeneração e cicatrização (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A regeneração é o processo pelo qual há substituição do tecido morto por tecidos do mesmo tipo, com função e morfologia iguais ao tecido perdido. Acontece nos casos de lesões leve, que causam danos no epitélio, mas não no tecido subjacente, então as células que sobrevivem a lesão conseguem se proliferar. Enquanto na cicatrização o tecido formado não é igual ao tecido lesionado, ocorrendo substituição do tecido perdido por tecido conjuntivo (fibroso) (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

Durante o reparo tecidual há proliferação de diversos tipos de células, incluindo o tecido lesado que restou, as células endoteliais vasculares e os fibroblastos. Essa proliferação celular é controlada pelos sinais promovidos pelos fatores de crescimento (produzidos por

células próximas ao local, como os macrófagos, células epiteliais e estromais) e pela matriz extracelular (MEC) (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

A de cicatrização pode ser dividida em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelagem. Na fase inflamatória, logo após a lesão ter acontecido, vai ter início o extravasamento sanguíneo preenchendo a lesão com plasma e elementos celulares, sobretudo plaquetas. Essa agregação plaquetária e coagulação geram um tampão, rico em fibrina, que retoma a hemostasia e cria uma barreira impedindo a entrada de microrganismos, também organiza a matriz celular preliminar que será utilizada como reservatório de citocinas e fatores de crescimento liberados durante as outras fases da cicatrização (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO, 2009; BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A fase proliferativa, é responsável pelo fechamento da lesão, nela ocorre a formação do tecido de granulação, este composto por tecido conjuntivo, células inflamatórias, fibroblastos e vasos sanguíneos. Também ocorre a reepitelização, com migração celular das células da epiderme para fechar a lesão; e a angiogênese com a formação de novos vasos sanguíneos a partir dos pré-existentes, fornecendo oxigênio e nutrientes necessários para o reparo tecidual (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; MANDELBAUM, DI SANTIS, MANDELBAUM, 2003).

Na fase de remodelagem: há contração tecidual, redistribuição dos tecidos neoformados, ação dos microfibriloblastos e mastócitos, e recuperação das propriedades mecânicas teciduais. Nela, a reorganização do tecido conjuntivo, que aumenta no tecido de granulação, forma uma cicatriz. O equilíbrio entre a síntese e a degradação de proteínas da matriz extracelular, principalmente o colágeno, influencia o resultado do reparo tecidual (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016).

Alguns fatores podem influenciar no reparo tecidual, dentre esses, a localização da ferida, tamanho da lesão, tipo de pele, presença de infecções ou de corpos estranhos, perfusão tecidual, temperatura local, desnutrição, presença de outras doenças como diabetes, entre outros (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2016; MANDELBAUM; DI SANTIS; MANDELBAUM, 2003)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Tratou-se de um estudo experimental, intervencional, quantitativo, analítico, controlado e aleatorizado.

4.2 LOCAL E PERÍODO

A pesquisa foi realizada através do Biotério da Universidade do Estado do Pará (Uepa) – Campus XII - Santarém, nos laboratórios da Universidade Federal do Oeste do Pará (Ufopa): Laboratório de Estudos Bioquímicos e Químicos do Núcleo Tecnológico de Bioativos, Laboratório de Microbiologia, Laboratório de Geologia e Microscopia, campus Santarém - e, em parceria com a empresa Histotec Serviços para laboratório, em Belém. As etapas que abrangeram a pesquisa foram realizadas no período de 24 meses.

4.3 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Os animais foram manejados segundo as normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCA) e os procedimentos experimentais estiveram de acordo com a Lei nº 11794, 8 de outubro de 2008, e com a Diretriz Brasileira de prática para o cuidado e utilização de animais para fins científicos e didáticos (DBCA).

A pesquisa foi submetida à Comissão de Ética no Uso de Animais (Ceua) da Universidade Federal do Oeste do Pará (Ufopa) e aprovada através do Protocolo Nº 052019001-2019, intitulado “**Mel no reparo tecidual de feridas cutâneas infectadas e não infectadas em ratos *wistar***” (ANEXO 1).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi formada por 30 ratos da espécie *Rattus norvegicus albinus* da linhagem *Wistar*, machos, adultos, idade superior a 90 dias e peso entre 250 e 300 gramas. Os animais foram procedentes do Biotério da Uepa, campus XII - Santarém.

No decorrer da pesquisa, os animais foram conservados em gaiolas de polipropileno com medidas de 41cmx34cmx16cm, revestidas com maravalha, separados em cinco animais em cada uma. Como recomendado em caso de cirurgia, os animais em experimento foram mantidos isolados em gaiolas individuais, estas revestidas com papel do tipo picado.

O laboratório do experimento foi de acesso limitado aos participantes do estudo e demais membros do laboratório, tendo as condições ambientais controladas (12 horas

claro/escuro, ambiente higienizado; ventilação adequada e temperatura média de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com oferta de ração industrial própria para ratos e água *ad libitum*.

Os animais foram monitorados diariamente durante todo o período da pesquisa, e avaliados durante todas as fases do experimento.

4.4.1 Grupos da pesquisa

Os animais foram separados aleatoriamente por sorteio em 3 grupos de 10 animais: Grupo tratado com o mel de *Melipona scutellaris* (GEM); Grupo tratado com o mel de *Apis mellífera* (GEA) e Grupo controle (GC), este último recebeu solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% (NaCl 0,9%). Cada grupo foi subdividido em 2 subgrupos de 5 animais cada, nomeados de acordo com o período de acompanhamento antes da eutanásia. Totalizando assim, 6 subgrupos de cinco animais: sendo 4 subgrupos experimentais e 2 subgrupos controles (Quadro 1)

Quadro 1. Subgrupos definidos e parâmetros adotados.

Nº subgrupos	Definição	Aplicação	Nº de dias de observação
1	GEM-7	<i>Melipona scutellaris</i>	7 dias
2	GEM-14	<i>Melipona scutellaris</i>	14 dias
3	GEA-7	<i>Apis mellífera</i>	7 dias
4	GEA-14	<i>Apis mellífera</i>	14 dias
5	GC-7	NaCl 0,9%	7 dias
6	GC-14	NaCl 0,9%	14 dias

Grupo GEM (grupo tratado com o mel de *Melipona scutellaris* (GEM); Grupo GEA (grupo tratado com o mel de *Apis mellífera* (GEA) e Grupo GC (grupo controle (GC) que recebeu solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% (NaCl 0,9%).

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

A quantidade de animais estabelecido em cada grupo está conforme as recomendações da Diretriz Brasileira de prática para o cuidado e utilização de animais para fins científicos e didáticos, que orienta minimizar o número de animais utilizados nos experimentos sem afetar os objetivos do estudo. Assim, grupos de cinco animais são suficientes para alcançar resultados significantes estatisticamente quando são comparados grupo controle e grupo experimental (DAMY et al., 2010).

As amostras de mel utilizadas no experimento foram submetidas à análise de características físico-químicas e bioquímicas para testar se enquadravam dentro dos padrões de

qualidade, se apresentavam níveis toleráveis de contaminantes inorgânicos e para identificar e quantificar a presença dos componentes que podem influenciar na cicatrização e possuem ação antimicrobiana. Assim, como cepa de *Staphylococcus aureus* utilizada para indução da infecção foi previamente padronizada em laboratório de Microbiologia da Ufopa.

Os animais desta pesquisa foram acompanhados por períodos diferentes, conforme os dias definidos para cada subgrupo (7 e 14 dias), do início do tratamento até a data da eutanásia.

4.5 PROCEDIMENTOS DA PESQUISA

4.5.1 Preparo do inóculo bacteriano

A cepa – padrão (ATCC 25923) de *Staphylococcus aureus*, foi proveniente do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Osvaldo Cruz (FIOCRUZ), e a padronização do inóculo utilizado na pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia, vinculado ao Instituto de saúde coletiva, da Ufopa.

Após ativação da cepa - padrão, foi preparada uma suspensão, ajustada a 0,5 de acordo com a escala de Mc Farland, em solução salina estéril (NaCl a 0,85%), o ajuste foi realizado através do espectrofotômetro para leitura da absorbância no comprimento de onda de 600 nm com densidade óptica de 0.8 – 1.0, correspondendo a concentração $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/ml.

4.5.2 Determinação do mel utilizado na pesquisa: Análise físico-química, bioquímica e Ação antimicrobiana in vitro.

Para seleção dos méis utilizados na pesquisa foram analisadas 4 amostras de méis de *Melipona scutellaris* e 4 amostras de méis de *Apis mellifera* oriundas de diferentes propriedades rurais de municípios da região Oeste do Pará. Essas amostras foram analisadas no Laboratório de Estudos Bioquímicos e Químicos do Núcleo Tecnológico de Bioativos da Universidade Federal do Oeste do Pará (Ufopa) (Quadro 2).

O material foi coletado no final do período de chuvas na Amazônia, entre os meses de maio e julho (2018 e 2019). As amostras foram fornecidas pelos produtores, que retiraram diretamente das caixas, com o auxílio de seringas descartáveis e acondicionaram em recipientes plásticos previamente limpos em água corrente, sendo enviados para análise logo após a coleta.

Quadro 2. Tipos de mel, localização e espécies.

Amostra	Local	Coordenadas	Espécie
M01	Juruti	02°09'07" S e 56°05'31" O	<i>Melipona scutellaris</i>
M02	Óbidos	01°43'59" S e 55°23'04" O	<i>Melipona scutellaris</i>
M03	Óbidos	01°99'87" S e 55°71'31" O	<i>Melipona scutellaris</i>
M04	Santarém (Arapuins)	3°07'17" S e 56°63'47" O	<i>Melipona scutellaris</i>
A01	Alenquer	1°56'31" S e 54°44'6" O	<i>Apis mellifera</i>
A02	Alenquer	1°56'31" S e 54°44'6" O	<i>Apis mellifera</i>
A03	Óbidos	01°39'45" S e 55°29'48" O	<i>Apis mellifera</i>
A04	Alenquer	1°56'31" S e 54°44'6" O	<i>Apis mellifera</i>

M01, M02, M03, M04: *Melipona scutellaris*; A01, A02, A03, A04: *Apis mellifera*.

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

As análises físico-químicas e bioquímicas realizados nos méis foram: pH e acidez livre (meqkg^{-1}), teor de açúcares redutores (%), umidade (%), teor de cinzas (%), teor de sólidos solúveis ($^{\circ}\text{Brix}$), compostos fenólicos totais (mgGA100g^{-1}), atividade antioxidante (% de Inibição DPPH) e o poder antioxidante redutor de ferro – FRAP (μmolL^{-1} de Fe^{+2} em 10% de solução de mel). As amostras foram analisadas em triplicata em cada um dos procedimentos analíticos realizados.

4.5.2.1 Teor de acidez livre

A determinação da Acidez livre dos méis foi feita pelo método potenciométrico conforme descrito por Brasil (2014). Foram utilizadas uma solução de hidróxido de sódio 0,1 N e uma solução indicadora de fenolftaleína 1% para neutralização da solução ácida do mel (10 g de mel em 75 mL de água destilada). O volume de hidróxido de sódio gasto na titulação, até a obtenção da cor rosa, foi registrado.

A solução de hidróxido de sódio ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foi padronizada por titulação com biftalato de potássio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{HO}_4$) (0,5g diluídos em 75 mL de água deionizada), adicionadas 2 gotas da solução de fenolftaleína 1 % (m/v). O fator de correção foi calculado pela equação:

$$f = \frac{m}{0,2042xVxN}$$

Em que:

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 expresso em meqkg⁻¹ empregando a equação:

$$meqkg^{-1} = V \times f \times 10$$

Em que:

V = Volume de solução titulante gasto na titulação (mL);

f = fator de correção da solução titulante.

4.5.2.2 Teor de cinzas

Aproximadamente 2.0 g de mel foram medidos em cadinho de porcelana e previamente secos à 100 °C durante 4 h em estufa. Após retornar a temperatura ambiente, a massa das amostras foi medida e posteriormente levada para incineração à 600 °C em forno tipo mufla durante 3h. Após retornar a temperatura ambiente a massa de cinzas foi medida em relação à massa úmida e massa seca de mel (AOAC, 2006).

4.5.2.3 Teor de umidade

O teor de umidade foi obtido por meio do método indicado pelo Instituto Adolfo Lutz (2005), com algumas modificações. Foi pesado 2,0 g de mel e aquecido em estufa à 60 °C até obtenção da massa constante. O teor de umidade foi calculado de acordo com a equação:

$$Umidade = 100 - \left(\frac{M_{seca}}{M_{inicial}} \right) \times 100$$

4.5.2.4 Teor de sólidos solúveis (°Brix)

Os teores de sólidos solúveis (°Brix) dos méis foram determinados por meio de leituras em refratômetro manual modelo RHB-90ATC (Megabrix, São Paulo, Brasil), com correção da temperatura e teor de água (BRASIL, 2000).

4.5.2.5 Teor de açúcares redutores

Para determinação do teor de açúcares redutores utilizou-se 2,0 mL de solução de glicose liquiform (Labteste, Minas Gerais, Brasil) e 200 µL de solução aquosa de mel (1:2500, v/v). A mistura ficou em repouso por 30 min e a absorbância foi lida em 555 nm em

espectrômetro UV/Vis (Nova 3300, Piracicaba, São Paulo, Brasil). A quantificação foi realizada utilizando uma curva de calibração externa com glicose (Synth, Rio de Janeiro, Brasil) concentrações: 0,0; 1,3; 2,5; 3,8 e 5,0 mg mL⁻¹ (GOMES et al., 2017).

4.5.2.6 Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais em solução aquosa de mel foi determinado empregando o método de Folin-Ciocalteu, e os resultados expressos em miligramas de ácido gálico por kg de mel (mgGA.100g⁻¹). Uma alíquota de 0,5 mL de uma solução aquosa de mel (1:10 m/v) foi misturada com 0,3 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 2,0 mL de solução 15% de carbonato de sódio. Depois foi adicionado água destilada até completar volume final de 5,0 mL. A mistura ficou em repouso por 2 horas a temperatura ambiente e posteriormente a absorbância foi lida a 798 nm. Foi preparada uma curva de calibração utilizando ácido gálico em concentrações entre 7,0 x 10⁻⁴ e 7,8 x 10⁻³ mg mL⁻¹ (FERREIRA et al., 2009).

4.5.2.7 Atividade antioxidante (DPPH %)

Uma alíquota de 0,4 ml da solução mel com água deionizada (1:5, v/v) foi misturada com 1,6 mL de etanol e 0,2 mL de solução 1,2 mmol L⁻¹ de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). As misturas ficaram em temperatura ambiente por 30 minutos. A seguir, a absorbância foi medida a 555 nm em espectrofotômetro UV/Vis. (NOVA 3300, Piracicaba, São Paulo, Brasil) contra as misturas de referência que foram preparadas de forma semelhante, substituindo a solução de DPPH por etanol. Foi preparada uma curva de calibração com α -Tocoferol (vitamina E) em solução etanólica de 0,2 mmol L⁻¹, com concentrações variando entre 0 e 2,50 mg L⁻¹ (ZHANG; HAMAUZU, 2004).

4.5.2.8 Poder antioxidante redutor de ferro (FRAP – Ferric Reducing Antioxidant Power)

A atividade antioxidante do mel foi realizada segundo metodologia adaptada de Sant'Ana et al. (2012). O princípio dessa metodologia é baseado na capacidade do mel de reduzir o Fe³⁺-TPTZ a Fe²⁺-TPTz, em pH ácido. Inicialmente, uma alíquota de 400 μ l de uma solução de mel 0,02 g mL⁻¹ foi adicionada a 3,6 mL de uma solução recém preparada de reagente FRAP (2,5 mL de solução 10 mmol L⁻¹ de TPTZ, 2,5 ml de solução 20 mmol.L⁻¹ de FeCl₃ e 25 mL de 0,3 mol L⁻¹ de tampão acetato, pH=3,6) e após a solução foi incubada a 37 °C por 10 min. Após, a absorbância foi lida a 593 nm. Uma curva de calibração foi preparada

utilizando soluções de FeSO_4 (1 mol.L^{-1} , com incrementos de $0,2 \text{ mmol.L}^{-1}$). Os resultados são expressos como $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de Fe^{2+} em 10% de solução de mel (m/v).

4.5.2.9 Avaliação antimicrobiana do mel in vitro

A cepa do microrganismo *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foi conservada em meio Nutriente estéril (NM – 3,0 g de peptona bacteriológica, 5,0 g de extrato de carne, 5,0 g NaCl em 1000 mL de solução aquosa, pH inicial 7,2 - 7,4) até a preparação da suspensão.

Para os testes de atividade antimicrobiana in vitro utilizou-se o método de difusão em poço, em triplicata. Uma alíquota de 100 μL da suspensão do microrganismo, ajustada a 0,5 da Escala de McFarland (correspondendo a 10^8 UFC mL^{-1} de bactéria), foi semeada em placas de Petri estéreis contendo Ágar Mueller-Hinton (MHA - Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) com o auxílio de swab estéril. Posteriormente, foram realizados poços de 6 mm de diâmetro no meio de cultura com o auxílio de um molde. Em seguida cada orifício foi preenchido com 100 μL de mel in natura e incubado a 35°C por 24 h. Os halos de inibição do crescimento microbiano foram medidos em milímetros com auxílio de régua (TAUBE JUNIOR et al., 2020).

4.5.3 Anestesia e ato operatório

Os animais foram anestesiados através do método de injeção intraperitoneal de cloridrato de quetamina (100mg/kg^{-1}) e cloridrato de xilazina (10mg/kg^{-1}), assim como sugerido pelo protocolo do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (2016). Depois de anestesiados, os ratos foram posicionados em decúbito ventral e imobilizados para a epilação na região dorsocostalis.

Em seguida, foram realizadas lesões cutâneas padronizadas em todos os animais, ainda anestesiados, utilizando-se um *punch* metálico de 8 mm^2 , que contém uma lâmina cortante na sua borda, retirando-se a pele e tela, expondo-se a fáscia muscular dorsal (Figura 1).

A anestesia e a cirurgia foram realizadas por pessoas treinadas e capacitadas, e os animais monitorados durante o andamento de todo procedimento.

Figura 1. Ferida operatória



Fonte: elaborada pelo autor

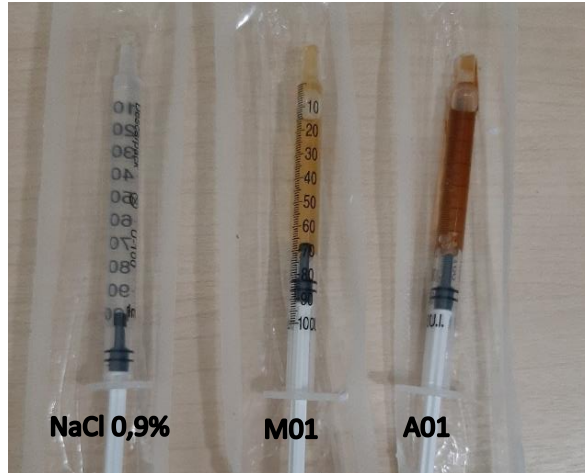
4.5.4 Pós-operatório

Após a realização da lesão, foram coletados swabs estéreis nos animais de todos os grupos, em sequência, todos os animais foram infectados, com 0,5 mL/por animal da suspensão ajustada a $1,5 \times 10^8$ células/ml de *Staphylococcus aureus*, através do método de gotejamento sob a área lesada com uma seringa estéril de 1 mL, assim como no trabalho de Brito Junior e Ferreira (2015), que utilizaram a mesma técnica de gotejamento, em um volume de 1 ml, uma vez que o ferimento cirúrgico era mais extenso que neste trabalho. Logo após, os animais foram recondicionados nas gaiolas individuais, e divididos de acordo com os seus respectivos grupos através da identificação com etiquetas fixadas nas gaiolas.

Em paralelo a isto, no laboratório de microbiologia foi realizada a confecção de uma placa de controle para acompanhar o crescimento de *S. aureus*, utilizando a mesma suspensão padronizada empregada nos animais. Nesta placa notou-se que após 24 horas não apresentava um crescimento microbiano suficiente para desencadear uma infecção satisfatória nos animais. Então, optou-se por esperar 36 horas após indução da infecção para iniciar o tratamento.

Passada às 36 horas após indução da infecção, foi coletado um novo swab estéril de cada ferida para análise microbiológica, em seguida realizada a primeira aplicação de duas gotas de mel nos grupos experimentais (tratados com *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris*). O procedimento foi repetido diariamente por 7 e 14 dias, de acordo com cada subgrupo do experimento. Como mencionado anteriormente, no grupo controle foi realizado diariamente a aplicação tópica de solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%, até a data da eutanásia.

Figura 2. Amostras de méis e solução fisiológica aplicadas nos grupos experimentais e controle.



NaCl 0,9% (solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%); M01 (*Melipona scutellaris*) e A01 (*Apis mellifera*).

Fonte: elaborada pelo autor.

Foram realizados o tratamento dos grupos com feridas infectadas, submetidos as amostras de *Melipona scutellaris* (M01) e *Apis mellifera* (A01), compreendendo o número de 20 animais submetidos ao tratamento diário com 2 gotas de mel. Simultaneamente realizou-se o ensaio nos 10 animais do grupo controle com feridas infectadas totalizando 30 animais no experimento.

Foram coletados novos swabs estéreis com 72 horas do início do tratamento, no 7º dia e no 14º dia, antes da eutanásia dos animais.

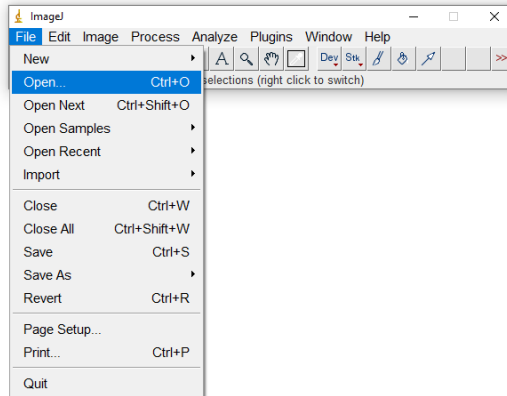
4.5.5 Avaliação macroscópica

Foram realizados registros fotográficos, para avaliação da área da lesão, utilizando uma câmera digital da marca Samsung, com 16.2 megapixels de resolução. Para padronização da captura das imagens, a câmera foi posicionada em um tripé a distância fixa de 15cm, e foi utilizada uma régua esterilizada posicionada próxima à ferida para futura calibração do *software Image J* e mensuração da área das feridas. Em todos os grupos foram feitas imagens das feridas logo depois da cirurgia, e depois três, sete e 14 dias de tratamento.

O *software Image J* possui vários parâmetros para mensurações de medidas. Para avaliar as imagens obtidas nesse estudo foi utilizado o parâmetro morfométrico de área, visto que vem sendo utilizado em vários estudos como uma forma da avaliação de feridas. Para realização das análises das áreas das feridas através do aplicativo utilizou-se a metodologia baseada no estudo de Silva (2019), seguindo-se em sequência as seguintes etapas:

Após o início da execução do programa, realizou-se a busca dos arquivos clicando em “File” e em seguida em “Open” (Figura 3).

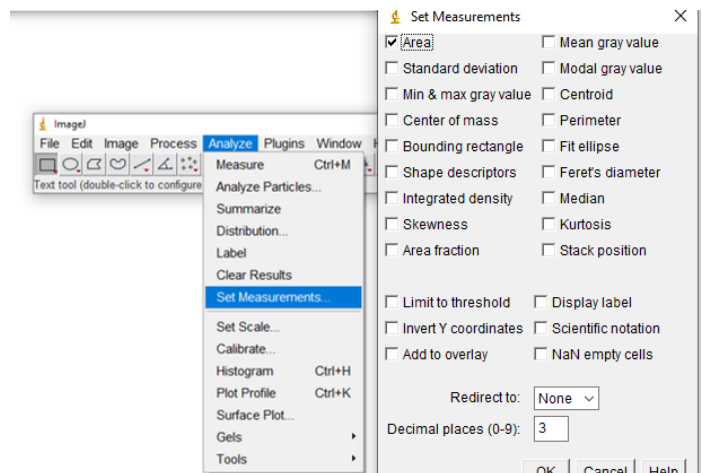
Figura 3. Utilização do *Image J* para seleção dos arquivos de imagens.



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Após o processamento da imagem, foi selecionado o parâmetro (área) para ser analisado pelo *software*, da seguinte forma: “Analyze” > “Set Measurements...”, exibindo uma nova janela para seleção do parâmetro escolhido (Figura 4).

Figura 4. Escolha do parâmetro de análise: Área.



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Utilizou-se uma régua enquadrada próxima a cada imagem para uma medida com precisão, servindo como referência para calibração de cada imagem. Nesta análise foi demarcada uma linha proporcional a um centímetro sobre a imagem da régua e em seguida utilizou-se os seguintes comandos: “Analyze” > “Set Scale”. Exibindo uma nova janela, sendo digitado no espaço “*Known Distance*” o valor “1” e no espaço “*Unit of Length*” a unidade de

medida “cm”. Assim as medidas numéricas realizadas nas imagens utilizavam a medida obtida por meio da régua como parâmetro (Figura 5).

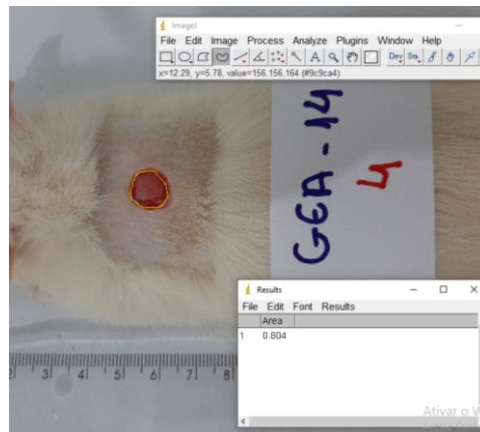
Figura 5. Calibração da imagem com auxílio da régua e transformação de valores de pixels para cm.



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Após a padronização dos valores foi realizada análise da área da ferida empregando a ferramenta “*freehand selections*”, utilizando o mouse para fazer o contorno das bordas da ferida de forma manual. Em seguida, utilizou-se o comando “*Analyze*” > “*Measure*”, mostrando uma nova janela com os valores medidos da área das lesões (Figura 6).

Figura 6. Demarcação da ferida e análise da área.



Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Apenas um avaliador treinado realizou os procedimentos de mensurações, mantendo os mesmos critérios para a avaliação de todas as imagens.

4.5.6 Eutanásia dos animais

A eutanásia foi realizada nos dias definidos previamente para cada grupo (7 e 14 dias), utilizando a aplicação de uma superdose da associação de quetamina e xilazina (três vezes

a dose utilizada para anestésiar) por via intraperitoneal, de acordo com as Diretrizes da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2018).

A confirmação da morte dos animais foi realizada por profissionais qualificados e ocorreu através da verificação dos seguintes sinais: ausência de movimento respiratório e de batimentos cardíacos com auxílio de um estetoscópio. Após a confirmação da morte, realizou-se a retirada das amostras de tecidos, que foram identificadas e acondicionadas individualmente em tubos contendo solução de formalina a 10% e posteriormente foram enviadas ao laboratório para preparação das lâminas para análise microscópica.

O descarte das carcaças dos animais foi realizado de acordo com a rotina do biotério e seguindo as normas vigentes de biossegurança e proteção ambiental.

4.5.7 Avaliação microbiológica em placas de Petri

Após o procedimento cirúrgico foram coletados swabs estéreis nos animais de todos os grupos, antes da indução da infecção com a suspensão previamente ajustada de *S. aureus*. Passada as 36 horas após indução foram coletados novos swabs de cada ferida, assim esse processo se repetiu após 72 horas e sete dias após início do tratamento (Quadro 3).

Quadro 3. Identificação das Placas de Petri de acordo com a coleta dos swabs estéreis.

Identificação das Placas de Petri	
0h	Swab coletado após ato operatório
36h	Swab coletado 36 horas após indução da infecção
72h	Swab coletado após 72 horas do início do tratamento
7d	Swab coletado após sete dias do início do tratamento

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

O material coletado através dos swabs estéreis foram acondicionados em tubos contendo solução salina estéril (NaCl a 0,85%), e encaminhados no mesmo dia ao Laboratório de Microbiologia, onde foram semeados com auxílio da alça calibrada de 10 µl, utilizando o método Spread Plate, sobre a superfície das placas de Petri estéreis (90x15mm) contendo Ágar Mueller-Hinton (MHA - Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA).

As placas foram incubadas invertidas a uma temperatura de 37°C por 24 horas, quando então foi feita a observação das placas para identificar as bactérias com aspecto de colônias típicas do crescimento de *S. aureus*. O método utilizado foi qualitativo, sendo observado o crescimento de *S. aureus* e a presença de outros microrganismos nas amostras

coletadas das feridas dos animais dos grupos experimentais e controle, tratados com mel de abelha e solução fisiológica de cloreto de sódio à 0,9%.

4.5.8 Avaliação microscópica

4.5.8.1. Análise por Hematoxilina e Eosina

As lâminas foram confeccionadas utilizando a técnica histológica de rotina. Assim, após as amostras serem fixadas em formol, passaram pelos processos de desidratação gradativa em álcool, clarificação em xilol, infiltração em parafina a 60°C e confecção dos blocos de parafina. Os blocos foram submetidos a cortes histológicos em micrótomo (5µm). Em seguida, as lâminas foram desparafinadas e hidratadas, sendo então coradas em Hematoxilina de Mayer, e depois em Eosina-Floxina. Após a coloração, as lâminas foram novamente desidratadas em álcool e clarificadas em xilol. Após esses procedimentos, as lâminas montadas ficaram prontas para serem analisadas (NUNES; CINSA, 2016).

Esses cortes corados pela hematoxilina e eosina foram avaliados microscopicamente e a característica analisada (intensidade do infiltrado inflamatório) foi registrada de forma quantitativa em 10 campos de grande aumento (100x) e os resultados demonstrados em número por campo microscópico de grande aumento.

Foi utilizado na avaliação o microscópio LEICA DM750 P acoplado a uma câmera fotográfica, em lente ocular de 10x e objetiva de 5x totalizando um aumento de 50x para a transição da ferida e em lente ocular de 10x e objetiva de 10x totalizando um aumento de 100x para o leito da ferida, foram analisados 10 campos de grande aumento e os resultados demonstrados qualitativamente, por meio da classificação: ausente (0), leve (1), moderado (2) ou intenso (3).

0 ponto: Ausência de células inflamatórias ou em número insignificante;

1 ponto: Infiltrado inflamatório leve;

2 pontos: Infiltrado inflamatório moderado;

3 pontos: Infiltrado inflamatório intenso.

4.5.8.2. Coloração por Picro-Sirius Red

Após a desparafinação das lâminas em xilol, foi realizada a reidratação em concentrações decrescentes de álcool, a seguir os cortes histológicos foram incubados em solução de *Picro-Sirius Red* por 60 minutos, depois lavados e contra corados em Hematoxilina de Harris, em seguida as lâminas foram novamente desidratadas e clarificadas, após esses

procedimentos foram montadas para análise. Foi utilizada a coloração de *Picro-sirius red* para quantificação de fibras de colágeno.

A avaliação foi realizada com a utilização do microscópio LEICA DM750 P com uso de luz polarizada acoplado a uma câmera fotográfica, em lente ocular de 10x e objetiva de 5x totalizando um aumento de 50x para a transição da ferida e em lente ocular de 10x e objetiva de 10x totalizando um aumento de 100x para o leito da ferida, sendo analisado 10 campos de grande aumento.

Para análise do colágeno total, as fotomicrografias foram analisadas pelo software *Image J*, após calibração das imagens pelo comando *Color Thershold* (Image > Adjust > Colar Thershold). Depois as imagens foram transformadas para escala de cor 8-bits (Image > Type > 8-bit), binarizadas (Process > Binary > Make binary) e medido a porcentagem de área de colágeno (Analyse> Analyses Particles). Os resultados então expressos em porcentagem de área total ocupada pelas fibras colágenas (NASCIMENTO, 2017).

5 ANÁLISE DOS DADOS

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com esquema fatorial de 3 x 4 (M01 – animais com feridas tratadas com mel de melípona; A01 – animais com feridas tratadas com mel de Apis; GC – grupo controle, animais com feridas não tratadas, avaliados nos dias 0, 3, 7 e 14 pós-operatório), com 10 repetições para cada período, exceto para o período de 14 dias que foram 5 repetições, sendo 5 animais por grupo. Com os dados resultantes do experimento foi realizada análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, quando significativos, empregando-se o pacote estatístico SISVAR 5.6.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dos fatores importantes no processo de cicatrização de uma ferida é o método de tratamento escolhido, neste estudo optou-se pelo uso do mel de abelha, um produto de origem natural, com valores padronizados pelas legislações nacionais e internacionais, sendo assim necessário uma análise físico-química e bioquímica para escolher amostras de qualidades, que estão dentro das normas especificadas, e que possam atuar como agentes cicatrizante e antibacteriano, sendo facilitadoras da cicatrização no tratamentos de feridas.

6.1 ANÁLISE FÍSICO QUÍMICA

As amostras analisadas expressaram valores de pH ácidos (Quadro 4). Estes valores baixos são devido aos ácidos orgânicos presentes que colaboram para o sabor do mel e seu efeito antimicrobiano (SCHLABITZ et al., 2010). Para Campos et al. (2010) o pH do néctar e as substâncias mandibulares que são adicionadas ao néctar, podem influenciar o pH do mel.

Quadro 4. Valores obtidos nas análises das 8 amostras selecionadas previamente (PH, Acidez livre mEq kg⁻¹, Açúcares redutores %, Umidade % e Cinzas).

Amostra	Ph	Acidez livre mEq kg ⁻¹	Açúcares redutores %	Umidade %	Cinzas
M01	3,41±0,03	52,9±3,49	58,00±0,54	27	0,238±0,026
M02	3,33±0,02	106,1±4,26	56,34±15,60	25,3	0,046±0,015
M03	3,84±0,02	66,2±3,87	53,62±1,28	25,2	0,035±0,021
M04	3,41±0,07	52,9±3,63	48,31±2,43	29	0,037±0,019
A01	3,18±0,01	44,87±5,67	74,46±2,82	19,1	0,170±0,080
A02	3,53±0,02	62,6±3,65	62,03±5,17	20,1	0,073±0,049
A03	4,13±0,11	72,4±4,21	42,02±1,14	20,2	0,501±0,106
A04	3,67±0,04	71,6±28,45	42,61±3,42	21,2	0,043±0,009

M01, M02, M03, M04: *Melipona scutellaris*; A01, A02, A03, A04: *Apis mellifera*.

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Nas amostras selecionadas o valor encontrado de pH foi de $3,41 \pm 0,03$ para M01 e $3,18 \pm 0,01$ para A01.

É importante ressaltar que os valores de pH não estão padronizados pela legislação nacional ou internacional (NASCIMENTO, 2014). Entretanto, Arruda (2003) afirma que os valores de pH dos méis podem variar entre 2,3 e 7,23. Sato e Miyata (2000) e Saxena et al. (2010) corroboram que o pH do mel se apresenta naturalmente ácido entre 3,2 e 4,5,

independente de sua origem botânica. Para Carvalho et al. (2005) quando os valores de pH se apresentam fora destes valores citados, isto pode indicar a ocorrência de fermentação ou adulteração do produto.

Em trabalho realizado com méis de meliponíneos, Nascimento (2014) encontrou valores médios de pH variando de 2,93 a 4,94. Bandeira (2016) obteve valores de pH entre 3,65 e 4,32 para amostras de mel de *Apis Mellifera* comercializadas no oeste do Pará, analisadas no período seco, e 3,25 e 3,56 para amostras analisadas no período chuvoso. Já, Campos et al. (2010) obtiveram variações de pH de 3,71 a 4,46 para méis de *Melipona scutellaris* produzidos no estado da Paraíba. Monte et al. (2013) obtiveram variações de pH entre 2,51 e 3,69 para méis de abelha tíuba (*Melipona compressipes* Fabricius), jandaíra (*Melipona subnitida*, Ducke) e uruçú (*Melipona scutellaris*, Latreille), no estado do Piauí.

Quanto à acidez livre, entre as amostras analisadas, o maior valor encontrado foi de $106,1 \text{ meq.kg}^{-1} \pm 4,26$ e o menor valor obtido foi de $44,87 \text{ meq.kg}^{-1} \pm 5,67$ (Quadro 4). Os valores obtidos das amostras selecionadas foram $52,9 \pm 3,49$ para M01 e para A01 foi $44,87 \pm 5,67$. Destaca-se que os méis de meliponíneos apresentam maiores valores de acidez (NASCIMENTO, 2014), se comparados aos méis de *Apis* que devem apresentar valores máximos de acidez em torno de 50 meq.kg^{-1} (BRASIL, 2000). O máximo sugerido por Villas-Bôas e Malaspina (2005) para este parâmetro é de 85 meq.kg^{-1} .

Pereira (2010) encontrou valores de acidez livre em méis de *T. angustula*, *M. quadrifasciata* e *M. subnitida* superiores a 50 meq.kg^{-1} , assim como Monte et al. (2013) em análises de méis de abelha tíuba, jandaíra e uruçú.

Já Nascimento (2014) encontrou valores de acidez livre para méis de meliponíneos dentro da faixa de 6,83 a $48,58 \text{ meq.kg}^{-1}$, que é abaixo do limite máximo permitido pela legislação (BRASIL, 2000), e da mesma forma, Stramm (2011), obteve valor médio de acidez para méis de abelhas Jandaíra de $22,49 \text{ meq.kg}^{-1}$.

Os teores de açúcares redutores mínimos permitidos pela legislação são de 65% para méis florais e de 60% para méis de Melato (BRASIL, 2000). Os valores obtidos neste trabalho para as amostras escolhidas variaram entre $58\% \pm 0,54$ (M01) e $74,46\% \pm 2,82$ (A01). Os valores encontrados estavam em desacordo com a legislação. Estes teores baixos podem ter ocorrido por erros experimentais ou por adulterações nos produtos.

Villas-Bôas e Malaspina (2005) sugerem em seu trabalho o teor de açúcares redutores para méis de meliponíneos brasileiros de 50%. Já, Nascimento (2014) encontrou teores de açúcares redutores nos méis analisados dentro dos padrões estabelecidos por Villas-Bôas e Malaspina (2005) (entre 65,01% e 75,21%), bem como para os padrões da legislação. E

Montenegro (2018) também constatou teores de açúcares dentro do permitido, de $58,89\% \pm 3,26$ a $64,70\% \pm 6,47$ em méis de *Tetragonisca angustula*.

Campos et al. (2010) constataram conteúdo de açúcares redutores variando entre 54,85% e 66,49% para méis de *M. scutellaris* na região do Brejo e 43,66% e 65,07% para a região do Litoral do estado da Paraíba.

Quanto aos teores de umidade, conforme o quadro 4, os valores obtidos variaram de 19,1% a 29%. Os valores das amostras selecionadas foram 27% (M01) e 19,1% (A01), neste parâmetro, exceto o valor obtido da amostra A01, todos os demais valores foram acima de 20% de umidade, que é o máximo permitido pela legislação brasileira (BRASIL, 2000). Entretanto, assim como resultado nesta pesquisa, méis de meliponíneos costumam apresentar valores mais elevados de umidade (NASCIMENTO, 2014). A umidade mais elevada nestes méis exige mais atenção no manuseio para evitar contaminação com microrganismos que venham a degradá-lo mais rapidamente, entretanto, esta característica também se apresenta como uma vantagem, pois torna o sabor do produto menos doce e enjoativo, o que faz com que seja muito apreciado (VILLAS-BÔAS; MALASPINA, 2005).

Villas-Bôas e Malaspina (2005) sugerem em seu trabalho o valor máximo de 35% de umidade para os méis de abelhas nativas do Brasil. Comparando os dados obtidos no presente trabalho com este valor, observa-se que todos os méis se encontram dentro do limite sugerido de umidade. Valores dentro desta faixa indicam adequada maturidade do mel, isto é, que o produto foi colhido no momento adequado em que os favos estavam operculados (SANTOS; OLIVEIRA, 2013). Stramm (2011) no seu trabalho, obteve o valor médio de 24,80% de umidade para méis de Jandaíra. Já Nascimento (2014) obteve valores de umidade variando dentro da faixa de 25,99% a 36,89% para méis de meliponíneos.

Campos et al. (2010) obtiveram variação de 22,05% a 22,75% nos teores de umidade de méis de *M. scutellaris* na região do Brejo e 23,32% a 23,82% na região do Litoral, no estado da Paraíba. Monte et al. (2013), obtiveram valores de umidade de 25,1% a 26,4% em 21 amostras avaliadas, de méis de urucu, tiúba e jandaíra, no estado do Piauí. Suas análises demonstraram que, embora o clima seco da região, o teor de umidade dos méis continuou elevado, acima de 20%, valor estabelecido pela legislação.

A maior parte das amostras analisadas revelaram teores de cinzas dentro do permitido pela legislação brasileira, cujo valor máximo estipulado é de 0,6% (BRASIL, 2000). Os teores variaram de $0,238\% \pm 0,026$ (M01) e $0,17\% \pm 0,08$ (A01). De acordo com Pereira (2010), o mel puro quando manejado de forma correta possui baixos teores de cinzas. Logo,

quando há irregularidades no mel como insetos, resíduos de tinta, pedaços de madeira e cera, é possível de se identificar por meio deste parâmetro (PEREIRA, 2010).

Segundo Nascimento (2014) o teor de cinzas é um critério que indica a quantidade de minerais presentes no mel e está diretamente relacionado com sua origem botânica. Méis florais apresentam menores teores de cinzas que méis de honeydew (melato), além disso, méis mais escuros também apresentam conteúdo mais elevado de cinzas, logo, os méis de meliponíneos devem apresentar um menor teor de cinzas, já que possuem coloração clara.

Corroborando com este estudo, Pereira (2010) encontrou conteúdos de cinzas dentro do permitido na legislação brasileira (inferior a 0,6%) em análises de méis de *Apis* e *Melipona*. O maior valor encontrado pelo autor foi no mel da espécie *T. angustula* com 0,506% de cinzas. Já no trabalho de Campos *et al.* (2010) obteve-se valor mínimo de cinzas de 0,17% e máximo de 0,32% para méis de *Melipona Scutellaris*.

Quadro 5. Valores obtidos nas análises das 8 amostras selecionadas previamente (°Brix).

Amostra	°Brix
M01	71,00±0,20
M02	72,00±0,50
M03	72,30±0,60
M04	69,00±0,40
A01	77,00±0,20
A02	77,30±0,30
A03	77,50±0,50
A04	77,4±0,30

M01, M02, M03, M04: *Melipona scutellaris*; A01, A02, A03, A04: *Apis mellifera*.
Fonte: elaborado pelo próprio autor.

O teor de sólidos solúveis (°Brix) aponta a quantidade dos sólidos (em gramas) dissolvidos na água de um alimento (CAMPOS *et al.*, 2010). É constituído principalmente por açúcares e no mel seu valor se aproxima bastante do teor de açúcares totais (GOIS *et al.*, 2013).

Os valores identificados nas amostras analisadas variaram de $69 \pm 0,40$ a $77,50 \pm 0,50$ °Brix (Quadro 5). Nas amostras escolhidas foram $71 \pm 0,20$ (M01) e $77 \pm 0,20$ (A01). Destaca-se que não há uma recomendação de valores para este parâmetro na legislação (OLIVEIRA; RIBEIRO; OLIVEIRA, 2013).

Campos *et al.* (2010) encontraram valores de sólidos solúveis entre 73,27 e 72,35 °Brix para méis de *M. scutellares*. Já Oliveira, Ribeiro e Oliveira (2013) encontraram teores de sólidos solúveis variando de 68 a 72 °Brix para méis de abelhas canudo (*Scaptotrigona depilis*)

e jataí (*Tetragonisca angustula*). Os açúcares no mel são responsáveis por manter uma baixa atividade de água tornando o meio desfavorável para o crescimento bacteriano (BANDEIRA, 2016). Dentre estes, os principais são a frutose, que é predominante e contribui para a doçura do mel e a glicose que determina a tendência de cristalização (GOIS et al., 2013; BANDEIRA, 2016).

6.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Os compostos fenólicos presentes no mel são oriundos do metabolismo secundário das plantas e apresentam atividade antioxidante (SILVA, 2011). Entre eles, se incluem ácidos fenólicos, flavonóides e tocoferóis que são eficientes em capturar radicais peroxil e reduzir o íon quelato férrico. Estas propriedades se devem a sua estrutura molecular que é caracterizada pela presença de anel benzênico e grupamentos hidroxila (SILVA et al., 2006; DUARTE, 2009).

A análise bioquímica do teor de compostos fenólicos totais apresentou valores entre 50,59 mgEAG.100g⁻¹ ± 4,16 (M01) e 73,44 ± 2,37 mgEAG.100g⁻¹ (A01) (Quadro 6). Montenegro (2018) obteve teores muito maiores de compostos fenólicos para méis de *T. angustula*, variando de 514,00 mgEAG.100g⁻¹ ± 130,66 a 685,60 mgEAG.100g⁻¹ ± 209,50.

Quadro 6. Valores obtidos nas análises bioquímicas das 8 amostras selecionadas previamente (Fenóis totais mgEAG.100g⁻¹, DPPH % e FRAP).

Amostra	Fenóis totais mgEAG.100g⁻¹	DPPH %	FRAP mM de Fe(II)em solução 10% de mel
M01	50,59±4,16	63,45±3,21	802,87±290,40
M02	98,60±3,18	66,95±1,00	4697,31±853,58
M03	41,40±1,69	78,57±1,04	642,69±287,37
M04	41,50±3,22	56,23±2,42	398,24±85,18
A01	73,44±2,37	81,11±1,34	1128,76±517,42
A02	42,56±4,06	69,83±2,71	1683,43±669,24
A03	46,80±2,12	58,74±3,58	5732,50±215,51
A04	71,60±28,45	59,26±2,69	2622,31±479,84

M01, M02, M03, M04: *Melipona scutellaris*; A01, A02, A03, A04: *Apis mellifera*.

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Silva (2011) obteve valores de 110 a 130 mgEAG.100g⁻¹ para méis puros de jandaíra. Silva et al. (2013) também obtiveram teores semelhantes a estes (120 a 130 mgEAG.100g⁻¹) em méis puros de jandaíra.

Quanto à atividade antioxidante os valores obtidos em porcentagem de inibição do radical DPPH para as amostras escolhidas estiveram entre 63,45% ± 3,21 (M01) e 81,11 ± 1,34 (A01). Gomes et al. (2016) encontraram valores menores que estes em análises de méis de abelha jandaíra, com variações de 24,26% ± 0,54 a 64,63 ± 1,01.

Nas análises de poder antioxidante de redução do ferro, para as amostras selecionadas foram obtidos valores entre 802,87 µmol.L⁻¹ de Fe(II) em 10% de solução de mel ± 290,40 (M01) e 1128,76 µmol.L⁻¹ de Fe(II) em 10% de solução de mel ± 517,42 (A01). Šarić et al. (2012) obtiveram valores de 39,53 a 173,46 µM de Fe(II) em 10% de solução de mel para méis de acácia e valores de 106,32 a 453,90 µM de Fe(II) em 10% de solução de mel para méis multiflorais. Já Duarte (2009) obteve variação de 4,67 a 52,56 eq. mg de ácido gálico.100g⁻¹ para méis de *M. scutellaris*.

Após a análise físico química e bioquímicas, dos méis retratados anteriormente (Quadro 2), foram selecionadas duas amostras, M01 (*Melipona scutellaris*) e A01 (*Apis mellifera*).

6.3 AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DO MEL IN VITRO

Na tabela 1, encontram-se os resultados da atividade antimicrobiana, obtidos pelo método de difusão em poços, para as amostras de mel produzidas pelas espécies de *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris*. Na avaliação antimicrobiana, além do microrganismo utilizado nesta pesquisa, foram testados outros patógenos. As duas amostras apresentaram atividade inibitória satisfatória frente a *S. aureus*, assim como aos demais microrganismos testados.

Tabela 1. Demonstração da média da atividade antimicrobiana dos méis de abelha, de acordo com a amostra indicada, com formação de halos de inibição contra microrganismos testes listados em colunas e com o resultado dado em milímetros.

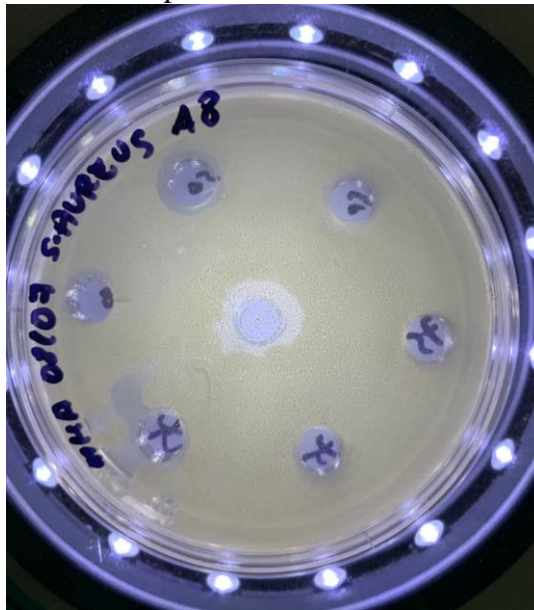
Amostras	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. krusei</i>
M01	21,1 ± 0,0	17,3 ± 0,58	19,3 ± 0,58	20,0 ± 0,0	23,3 ± 0,58
A01	15,0 ± 0,0	15,7 ± 0,58	12,0 ± 0,0	12,0 ± 0,0	14,0 ± 0,0

M01 – amostra de *Melipona scultellaris*; A01 - amostra de *Apis mellifera*. Microrganismos testados: *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Escherichia coli*; *Candida krusei*.

Fonte: elaborado pelo próprio autor.

Cruz et al. (2014) analisaram a atividade antimicrobiana de amostras de méis de abelhas com e sem ferrão, oriundas do estado do Amazonas contra *S. aureus*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Chromobacterium violaceum* e *Candida albicans*. Verificaram que todas as amostras expressaram atividade antimicrobiana para todos os patógenos testados. Na figura 7, observa-se os halos formados pela amostra de mel de *Apis mellifera* contra o microrganismo *S. aureus*, com média de 15,0 mm.

Figura 7. Halos de inibição formados pela amostra de mel contra o microrganismo *S. aureus*.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

6.4 AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA EM PLACAS DE PETRI

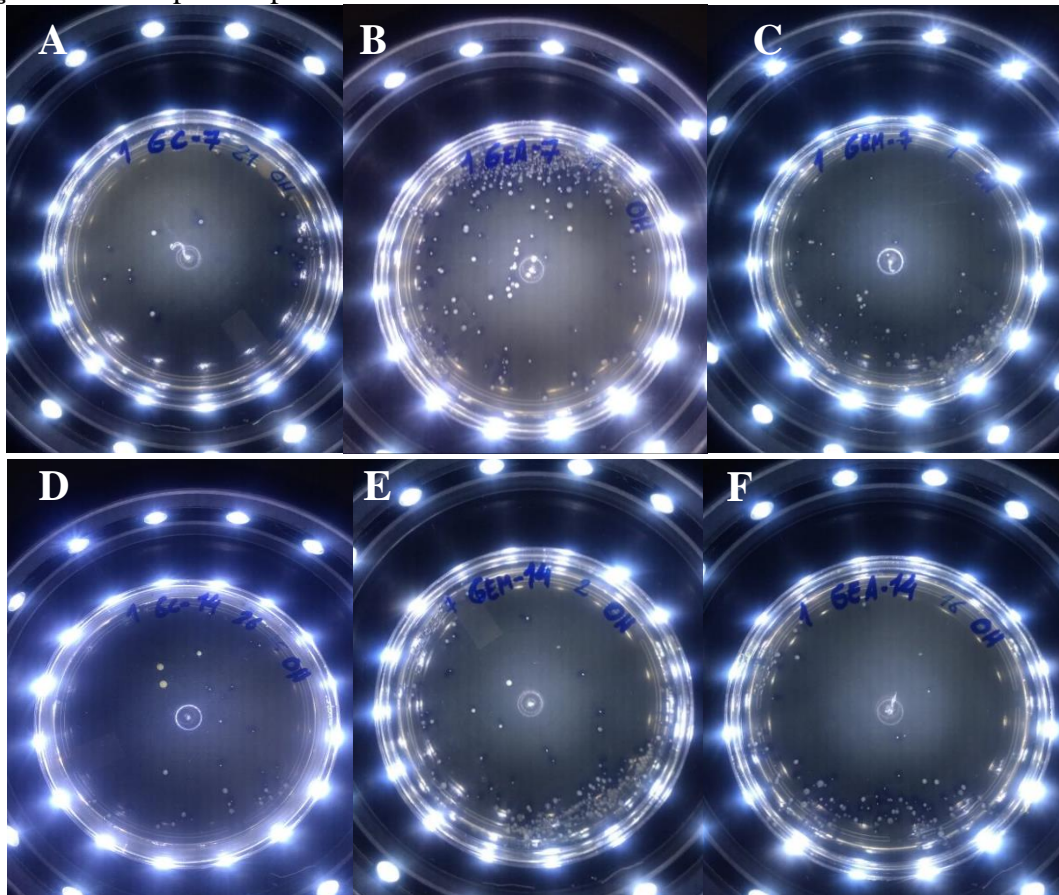
De acordo com Santos et al. (2007), o *S. aureus*, bactéria do grupo dos cocos gram-positivos, presente na microbiota humana, contudo pode gerar diversas doenças. Com a descoberta dos antibióticos a bactéria *S. aureus* foi uma das primeiras a ser controladas, no entanto, devido a sua resistência e grande capacidade de adaptação, atualmente é uma das principais espécies que ocasionam infecções hospitalares e comunitárias.

Na análise das Placas de Petri coletadas antes da indução da infecção, intitulado como 0h, foi observado que as amostras já apresentavam um mínimo crescimento de microrganismos nas placas (figura 8), mesmo utilizando-se a técnica de assepsia correta no momento da coleta. Isso explica-se pelo fato da amostra estudada trata-se de células vivas da ferida cutânea gerada nos ratos, onde há presença de microrganismos próprios da microbiota da pele desses animais, podendo considerar que as bactérias já existentes na pele podem colonizar essas lesões, não gerando necessariamente uma infecção.

Yamamoto e Gacek (2012) em um estudo analisando a microbiota oral de ratos e camundongos, observaram a prevalência de bactérias gram-positivas, entre as quais se destacaram: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus lentus*.

Segundo Andrade, Pinto e Oliveira (2002), o microrganismo frequentemente mais encontrado nas lesões de pele de ocorrência natural em ratos, é o *S. aureus*. Essa bactéria faz parte da microbiota de seres humanos e animais, é uma das mais resistentes e pode ser encontrada na pele, trato gastrointestinal, trato respiratório dos ratos de laboratório e no ambiente (Yamamoto e Gacek, 2012).

Figura 8. Crescimento em Placas de Petri das amostras coletadas na 0h, antes da indução da infecção com a suspensão padronizada de *S. aureus*.

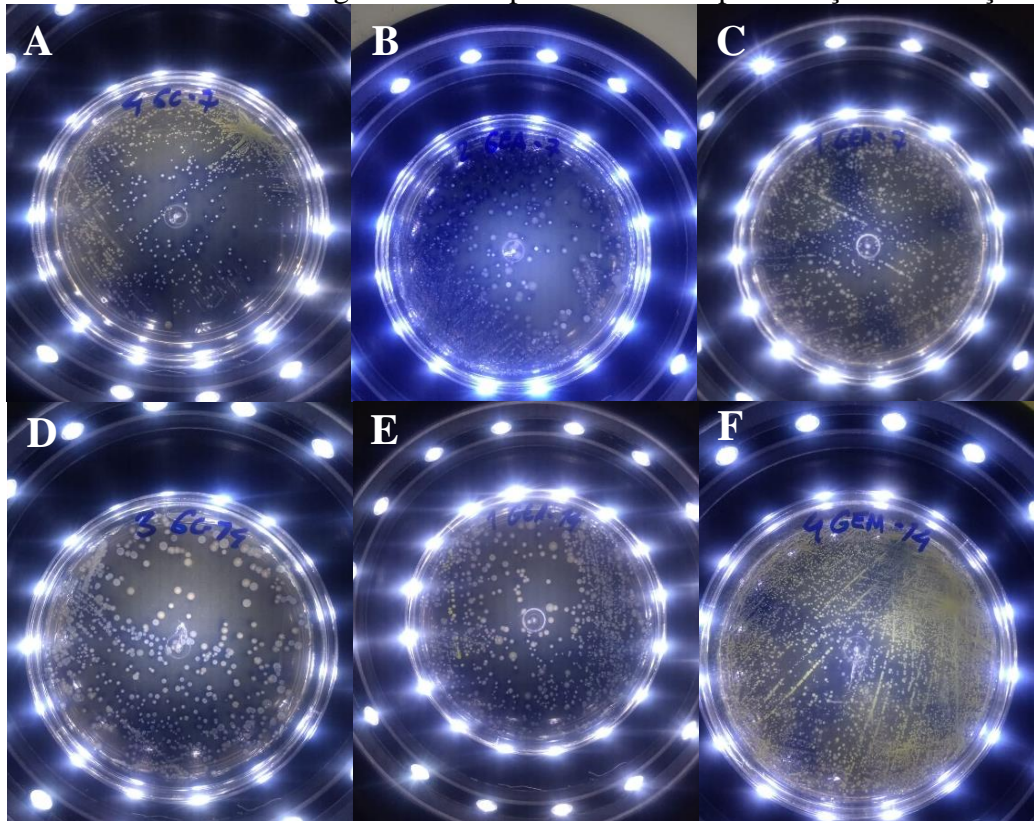


Amostras coletadas em swabs estéreis - A: subgrupo GC-7; B: subgrupo GEA-7; C: subgrupo GEM-7; D: subgrupo GC-14; E: subgrupo GEM-14; e F: subgrupo GEA-14.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

As placas coletadas após 36h da indução da infecção com inoculação da suspensão de *S.aureus*, antes do início do tratamento, evidenciaram o crescimento acentuado das bactérias, desencadeando uma infecção satisfatória nos animais (Figura 9).

Figura 9. Crescimento de microrganismos em placas de Petri após indução da infecção.



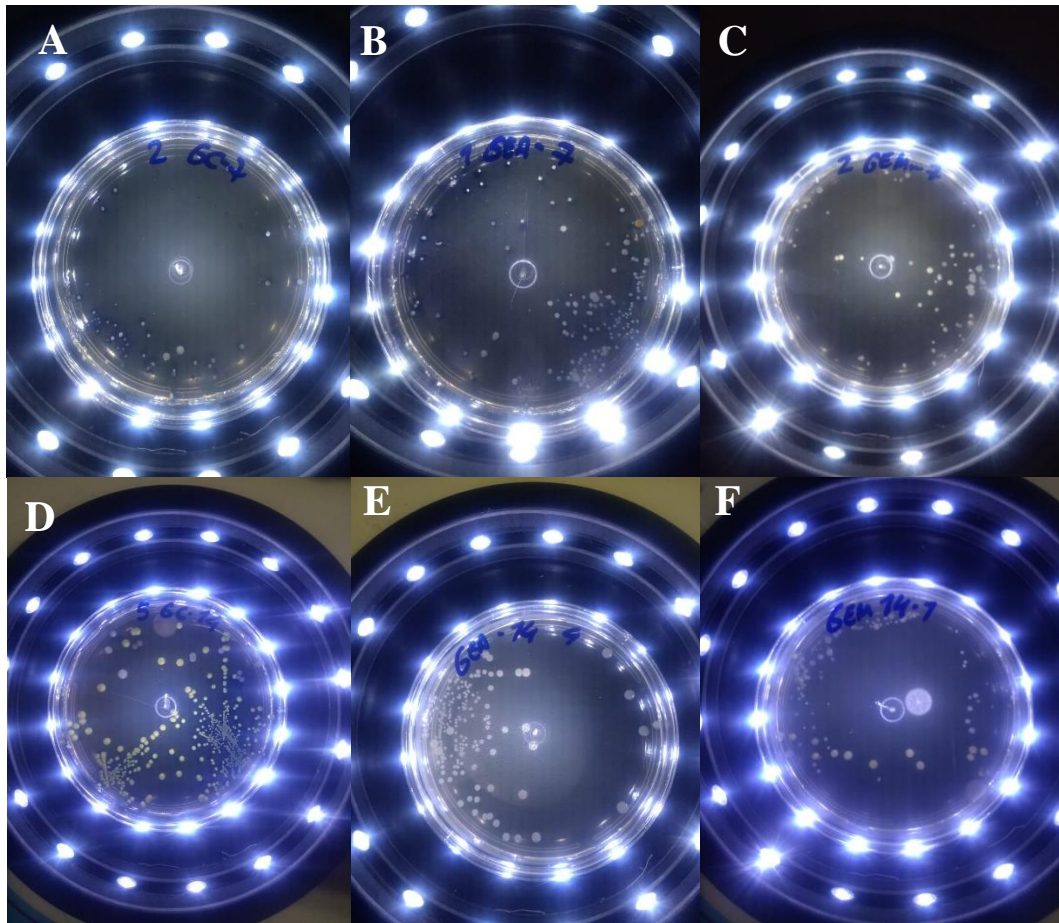
Amostras coletadas em swabs estéreis - A: subgrupo GC-7; B: subgrupo GEA-7; C: subgrupo GEM-7; D: subgrupo GC-14; E: subgrupo GEA-14; e F: subgrupo GEM-14.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Após o início do tratamento, 72h (figura 10) e 7 dias (figura 11) do começo das aplicações, observou-se a redução dos números de bactérias presentes nas Placas de Petri analisadas, tanto no grupo controle (solução fisiológica a 0,9%) quanto nos grupos experimentais (tratados com mel de *Apis mellifera* e *Melipona scutellaris*).

No entanto, em algumas placas apareceu crescimento anormal de outros microrganismos que podem estar associados à própria contaminação do animal no local de convívio.

Figura 10. Placas de Petri semeadas com material coletado após 72 horas do início do tratamento.

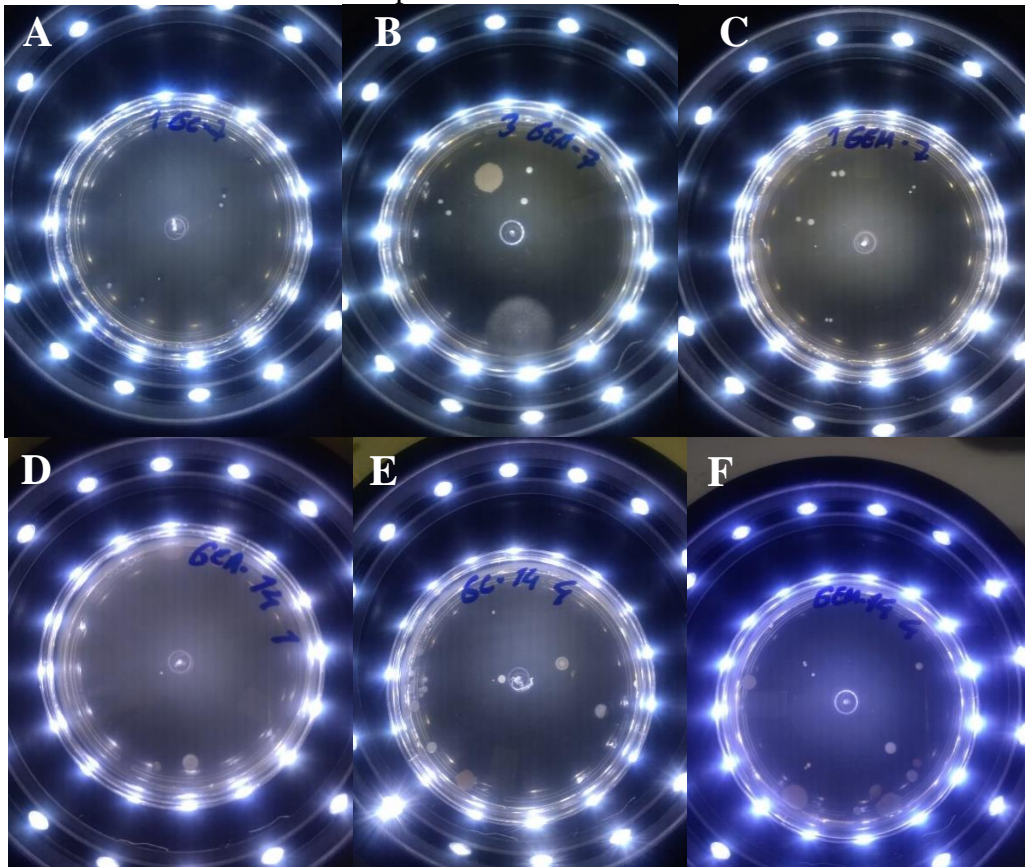


Amostras coletadas em swabs estéreis - A: subgrupo GC-7; B: subgrupo GEA-7; C: subgrupo GEM-7; D: subgrupo GC-14; E: subgrupo GEA-14; e F: subgrupo GEM-14.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Nas placas dos swabs coletados após 7 dias do início do tratamento, pode-se observar que além da redução das bactérias, houve aparecimento de microrganismos compatíveis com fungos em algumas placas do grupo experimental, o que já se era esperado, uma vez que o mel de abelha utilizado na pesquisa não passou pelo processo de esterilização ou pasteurização, afim de não perder suas propriedades físico-químicas naturais que podem influenciar na ação antimicrobiana e cicatrizante do mel (figura 11).

Figura 11. Placas de Petri semeadas após 7 dias do início do tratamento.



Amostras coletadas em swabs estéreis - A: subgrupo GC-7; B: subgrupo GEA-7; C: subgrupo GEM-7; D: subgrupo GEA-14; E: subgrupo GC-14; e F: subgrupo GEM-14.

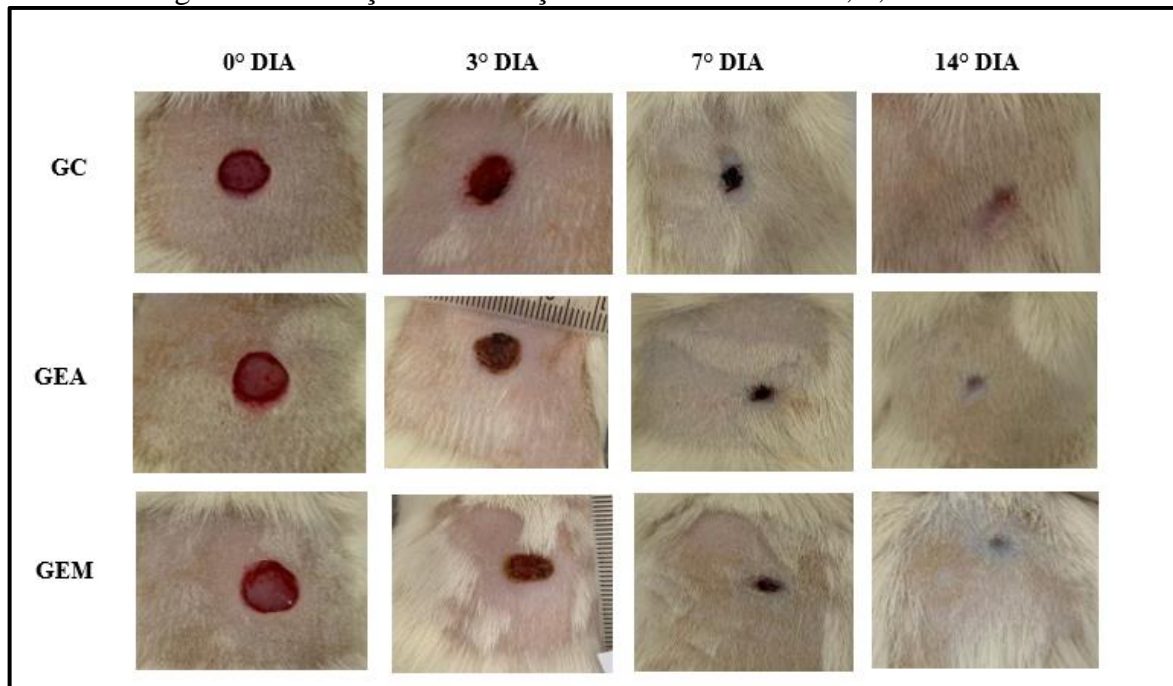
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

No estudo de Alves et al. (2008), por meio da análise microbiológica das feridas infectadas dos animais verificou-se que o uso do mel de *Melipona subnitida* mostrou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas e positivas.

6.5 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

A avaliação da cicatrização das feridas através do parâmetro de mensuração da área mostrou que todos os grupos obtiveram diminuição da ferida no decorrer do processo de cicatrização. Na figura 12 é possível observar a evolução da contração da ferida em um animal de cada grupo nos dias designados para fotografar as lesões.

Figura 12. Evolução da contração da ferida nos dias: 0, 3, 7 e 14 dias.



GC = grupo controle aplicado soro fisiológico; GEA = grupo experimental tratado com mel de mel de Apis; e GEM = grupo experimental tratado com mel de Melipona.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Segundo diversos estudos, múltiplos fatores podem influenciar no reparo tecidual de uma ferida, como estresse, estado nutricional, idade, presença de infecções, traumas repetitivos, localização e extensão da lesão (SILVA; FIGUEIREDO; MEIRELES, 2007; JORGE; DANTAS, 2005). Precisa-se controlar essas variáveis que afetam o processo de cicatrização. Neste estudo, todos os grupos foram realizados simultaneamente evitando-se que fossem expostos a fatores divergentes. Assim, os animais foram mantidos no mesmo local e sob as mesmas condições, todos tinham idade e pesos aproximados, as feridas foram realizadas no mesmo local e tiveram o mesmo tamanho padrão através do uso de *punch* de 8mm². Todo o tratamento, inclusive a aplicação de NaCl a 0,9 % no grupo controle, aconteceram da mesma forma, afim de evitar estresse diferenciado aos grupos.

Foi realizada a análise de variância e como é possível observar na tabela 2, houve diferença significativa entre os méis, os dias de cicatrização e houve também uma interação do mel com os dias de cicatrização, tendo o efeito significativo ($p < 0,05$).

Tabela 2. Análise de variância das medidas das lesões em ratos *Wistar* tratadas com méis de Apis, Melipona e soro fisiológico com 0, 3, 7 e 14 dias após a realização da lesão.

F.V	G.L	S.Q	Q.M	F
Mel (M)	2	0,024317	0,012158	0,0000*
Dias (D)	3	9,315992	3,105331	0,0000*
M x D	6	0,026966	0,004494	0,0000*
Resíduo	93	0,059581	0,000641	
Total	104	9,426856		

* significativo a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$);

ns= não significativo ($p \geq 0,05$)

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Na análise morfométrica da área da ferida logo após o procedimento cirúrgico, no dia zero (0), verificou-se a padronização do tamanho das lesões, de tal maneira que, estatisticamente pode-se observar (Tabela 3) que na avaliação da área inicial das feridas, a média do tempo/dia zero (0) não apresenta diferença significativa ($p > 0,05$).

Tabela 3. Área de cicatrização das feridas nos dias que foram realizadas as medições.

Tratamento	Tempo (dia)			
	0	3	7	14
Controle	0,80±0,013 Aa	0,42±0,033 Ab	0,18±0,045 Ac	0,00±0,02 Ad
<i>Apis</i>	0,80±0,011 Aa	0,39±0,014 Ab	0,10±0,025 Bc	0,00±0,000 Ad
<i>Melipona</i>	0,80±0,012 Aa	0,36±0,036 Bb	0,12±0,031 Bc	0,00±0,001Ad

CV (%) = 6.67

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Na tabela 3, ao observar os resultados das comparações da média de redução da área de ferida de acordo com o mel utilizado ou NaCl 0,9%, houve diferenças significativas entre todos os grupos nos dias 3 e 7 ($p < 0,05$), já nos animais acompanhados até o 14º dia, não houve diferença significativa ($p > 0,05$), uma vez que quase todos os animais de ambos os grupos tiveram a área da lesão cicatrizada.

Em contrapartida, no trabalho de Santos, Maurício Júnior e Cunha (2019), utilizou-se barbatimão no tratamento de feridas cutâneas onde se avaliou a cicatrização por segunda intenção, em 15 ratos wistar machos. A análise macroscópica das feridas ao 3º dia, não

apresentou alterações significativas estatisticamente. Verificou-se que o início da diminuição significativa da área da ferida deu-se por volta do 7º dia.

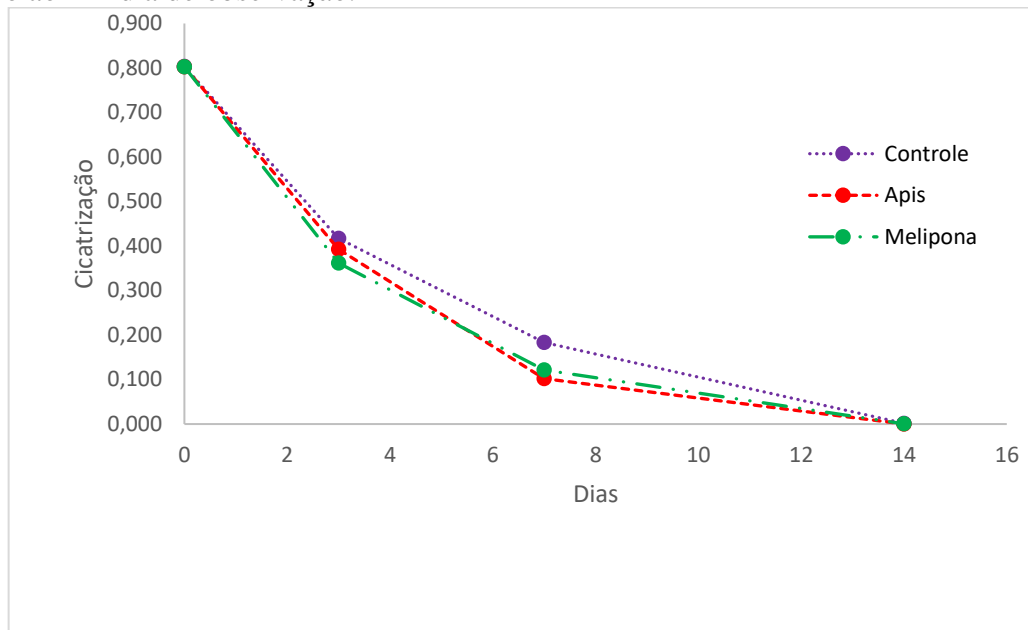
Comparando os resultados dentro da variável Tempo (dia), não houve diferença significativa no Tempo 0, já no dia 3, o grupo de Melipona foi melhor em relação aos grupos Apis e Controle. No dia 7, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (Apis e Melipona), estatisticamente ambos foram iguais, diferindo-se em relação ao controle, onde verificou-se que estatisticamente os grupos experimentais foram melhores que o grupo controle (Tabela 3).

Quanto a evolução da ferida intragrupos conforme os períodos de avaliação, notou-se que todos os grupos apresentaram redução média significativa entre os dias, no entanto ($p < 0,05$), o grupo tratado com a amostra de Melipona apresentou um resultado melhor, uma vez que no dia 3, apresentou uma redução da área da ferida maior, apresentando uma diferença estatística em comparação aos outros dois grupos, e no dia 7 permaneceu em relação ao grupo controle. Já o grupo tratado com a amostra de Apis apresentou diferença significativa em relação ao controle apenas no sétimo dia. No décimo quarto dia não houve diferença significativa estatisticamente entre os grupos, uma vez que as feridas estavam cicatrizadas ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Assim como, no estudo desenvolvimento por Alves et al. (2008), utilizando 24 ratos machos Wistar, divididos em grupos (infectados/e não infectados) tratados com solução salina e mel de Melipona, onde verificou-se que o Tempo (dias) médio de cicatrização no grupo infectado tratado com mel de Melipona foi menor do que nos outros grupos. Constatou-se também que a densidade de colágeno, número de fibroblastos, leucócitos e dosagem de citocinas, foi maior no grupo infectado que utilizou o mel, além da redução significativa das bactérias gram-positivas e negativas após o tratamento. Alves et al. (2008), concluíram que o uso do mel de Melipona nas feridas infectadas dos ratos, estimulou a resposta imunológica, diminuiu o tempo de cicatrização e a infecção.

Todos os animais foram observados diariamente, onde constatou-se que a maioria apresentou a área da ferida fechada em torno do 11º e 13º dia, apenas cinco animais não ficaram com a pele íntegra nesse período, sendo destes, três indivíduos do grupo controle, um do grupo tratado com a amostra de mel de Melipona, e um outro tratado com mel de Apis. O gráfico de regressão demonstra o comportamento diário da cicatrização do dia 0h ao 14º dia (Gráfico 1).

Gráfico 1. Gráfico de Regressão demonstrando a evolução diária da área da ferida de cada grupo dia zero ao 14º dia de observação.



Controle – GC: grupo tratado com soro fisiológico; Apis – GEA: grupo tratado com mel de Apis; Melipona – GEM: grupo tratado com mel de Melipona.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

6.6 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

6.6.1 Análise histológica do infiltrado inflamatório

A fase inflamatória consiste na primeira fase do reparo tecidual, e tem grande importância no processo de cicatrização.

Tabela 4. Comparação das médias de intensidade do infiltrado inflamatório dos grupos com a coloração de hematoxilina eosina.

Grupo	Média da intensidade do infiltrado inflamatório		p-valor
	07 dias	14 dias	
Controle	2,6±0,3	1,4±0,3	<0,0085*
Apis	2,8±0,2	1,0±0,0	<0,0000*
Melipona	2,2±0,7	1,2±0,2	<0,0462*
p-valor	0,3443	0,3349	-

* significativo a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$);

ns= não significativo ($p \geq 0,05$)

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Na tabela 4, observa-se a média dos escores atribuídos após a avaliação do infiltrado inflamatório, através da classificação em ausente, leve, moderado ou intenso, correspondente a pontuação 0: 1, 2 e 3 pontos.

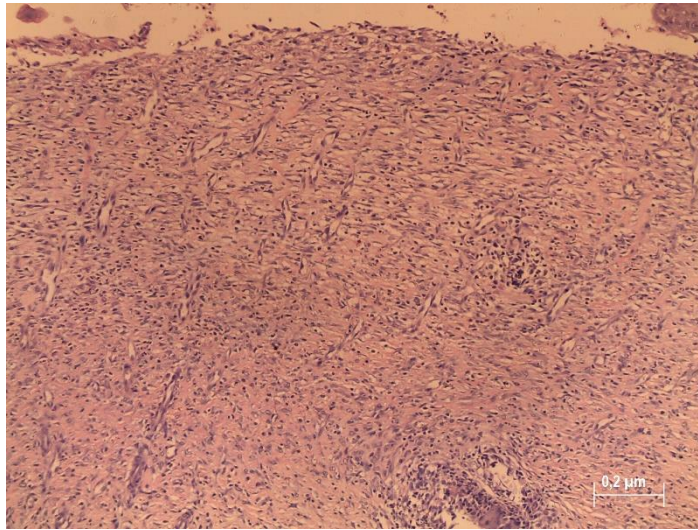
Pode-se notar que em todos os grupos houve redução significativa do infiltrado inflamatório. Os grupos experimentais reduziram significativamente o infiltrado inflamatório comparando as amostras nos períodos de 7 e 14 dias (Figura 13 e Figura 14).

Entretanto, na avaliação estatística intragrupos, apesar do grupo tratado com mel de Apis apresentar valores maiores no dia 7, e o grupo controle no dia 14, não houve diferença significativa estatisticamente entre os grupos experimentais e controle ($p > 0,05$).

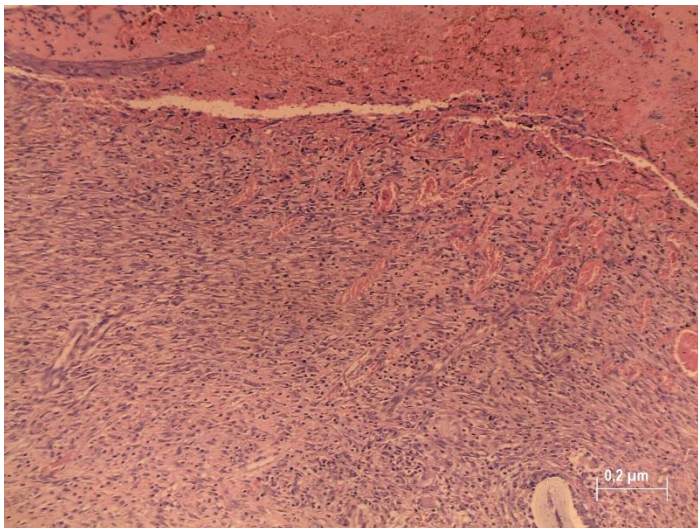
No trabalho de Rahal et al. (2003), usando própolis, mel e solução fisiológica (controle), no grupo utilizando o mel como forma de tratamento, no 7º dia verificou-se espessamento da epiderme nas bordas da ferida, proliferação vascular acentuada, redução do infiltrado inflamatório com células mononucleares predominantes e pequena quantidade de feixes de fibras colágenas. Apesar das feridas no 14º dia não se encontrarem totalmente reepitelizadas, foi notável neovascularização, a proliferação fibroblástica e a deposição de colágeno. Já no 7º dia, as lesões dos animais do grupo controle apresentaram infiltrado inflamatório mais acentuado do que nos demais grupos.

Figura 13. Fotomicrografia da área da ferida dos cortes histológicos realizados nos grupos do dia 7.

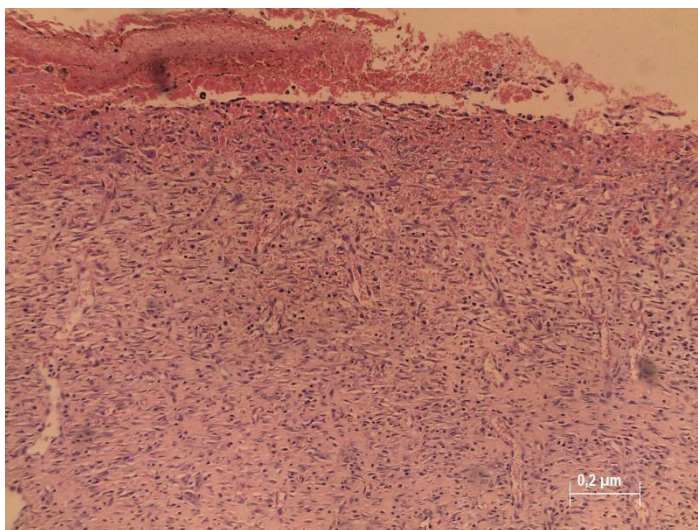
GC-7



GEA-7



GEM-7

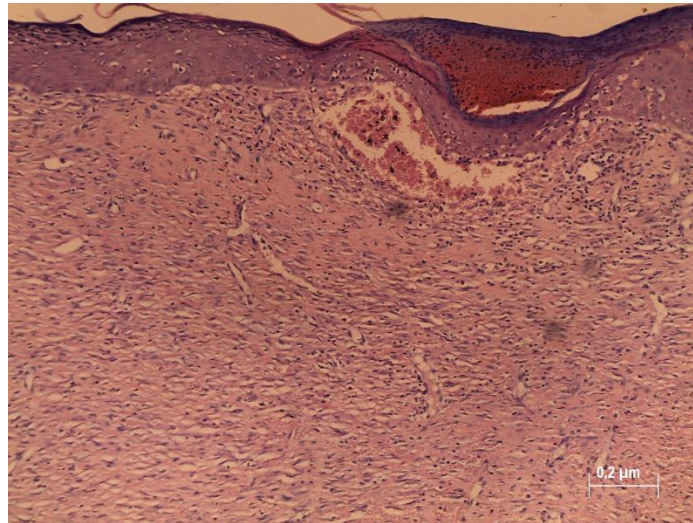


Aspectos histológicos quanto a presença de infiltrado inflamatório nas lâminas do dia 7, nos grupos tratados com a amostra de mel de Apis (GEA-7), grupo tratados com mel de melipona (GEM-7) e grupo que recebeu NaCl a 0,9% (GC-7). Coloração com **hematoxilina eosina**.

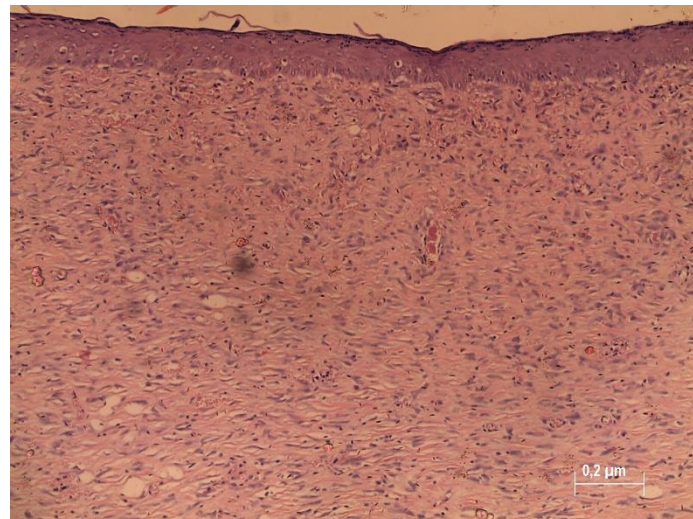
Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Figura 14. Fotomicrografia da área da ferida dos cortes histológicos realizados nos grupos do dia 14.

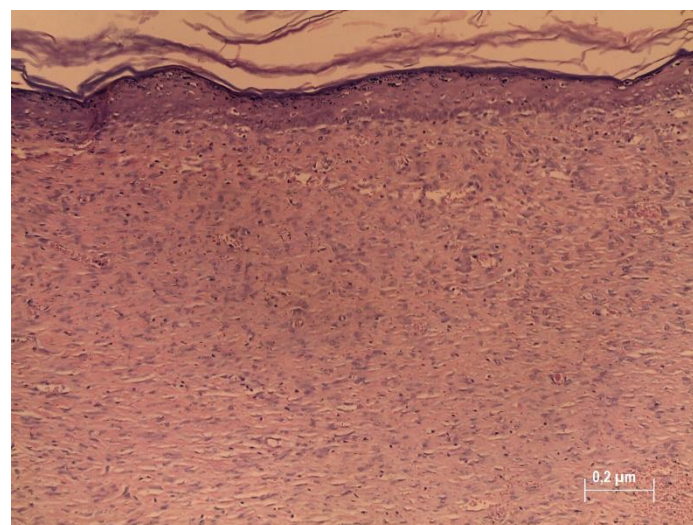
GC-14



GEA-14



GEM-14



Aspectos histológicos quanto a presença de infiltrado inflamatório nas lâminas do dia 14, nos grupos tratados com a amostra de mel de Apis (GEA-14), grupo tratados com mel de melipona (GEM-14) e grupo que recebeu NaCl a 0,9% (GC-14). Coloração com **hematoxilina eosina**.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

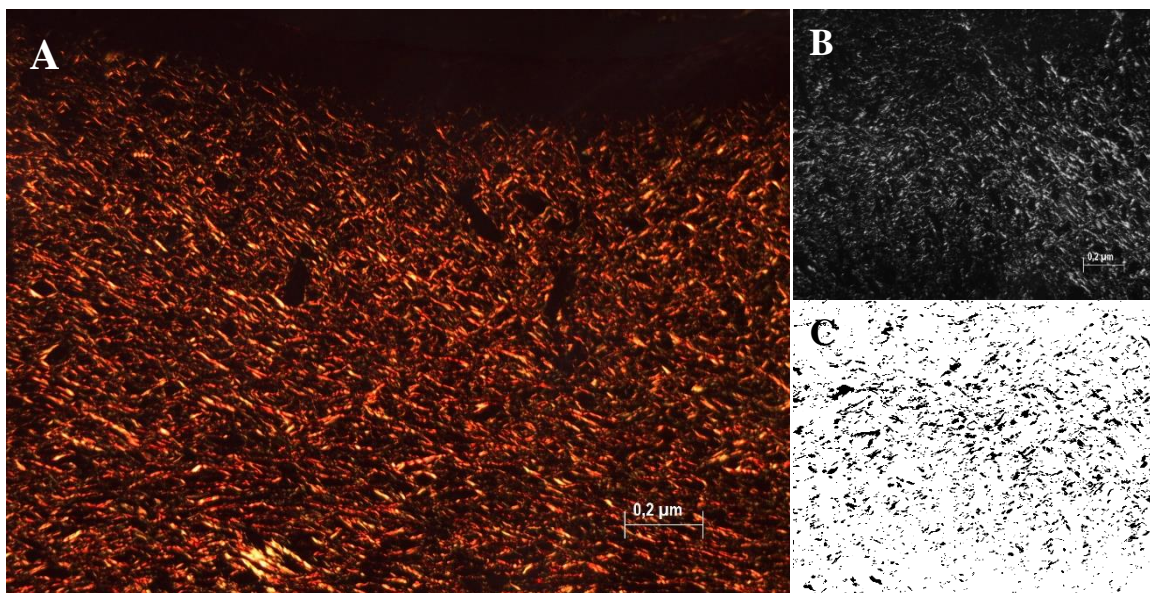
6.6.2 Análise da densidade do Colágeno

O colágeno, é um importante componente na derme e exerce um importante papel na elasticidade e resistência da pele. As fibras de colágenos constituem 90% das fibras dérmicas e 80% da matriz extracelular da derme, sendo os colágenos dos tipos I, III e V os mais predominantes (VERHAEGEN et al., 2012; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

Segundo alguns estudos, o colágeno é a proteína que se apresenta em maior quantidade no tecido conjuntivo em fase de cicatrização, sendo que sua síntese começa em poucas horas após a lesão, se tornando mais expressiva por volta de uma semana, no entanto, a cicatrização se torna mais resistente após o colágeno sofrer maturação (OLIVEIRA et al., 2010; BARROS et al., 2014; MORESKI; LEITE-MELLO; BUENO, 2018).

As áreas de tecido conjuntivo da lesão foram submetidas a coloração de *Picro-Sirius-Red* para a quantificação de fibras colágenas (Figura 15). Essa técnica atribui uma coloração avermelhada para áreas com colágeno e através de polarização de luz indica uma possível diferenciação entres os tipos de colágeno por meio da birrefringência vermelho amarelada e verde-esbranquiçada (KLINGE; FARMAN; FIEBELER, 2010).

Figura 15. Fotomicrografia da área da ferida mostrando a quantificação das fibras colágenas no tecido.



Área da ferida mostrando a quantificação das fibras colágenas no tecido, mensurada com o software Image J utilizando o plug-in Threshold Colour. A) Imagem analisada com luz polarizada. B) e C) Área selecionada para mensuração de colágeno pelo software. Coloração de *Picrosirius*.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Como pode ser observado (Tabela 5) os grupos de tratamento apresentaram maiores depósitos de colágeno em comparação ao grupo controle, tal resultado foi significativo ($p < 0,05$).

Tabela 5. Resultado da média da gradação das fibras de Colágeno com 7 e 14 dias de tratamento.

Tratamento	Tempo (dia)	
	7	14
Controle	7,34±0,701 Bb	8,80±0,599 Ba
<i>Apis</i>	9,23±0,689 Ab	10,99±0,897 Aa
<i>Melipona</i>	8,80±0,210 Ab	11,09±0,874 Aa
CV (%) = 7.46		

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborado pelo próprio autor.

Na análise do resultado da média da gradação das fibras de colágeno, observou-se que existiu diferença entre os tipos de méis (*Apis* e *Melipona*) e o controle, e também diferença estatística entre os dias, mas não houve na interação entre o Tempo dia (dia) e o tipo de tratamento utilizado. Não houve interferência de um fator dentro do outro fator (tratamento x tempo), ambos atuaram de forma isolada.

Como demonstra a tabela 4, os grupos que receberam o tratamento com os méis de *Apis* e *Melipona* apresentaram uma maior deposição de feixes de fibras de colágeno, tendo diferença significativa em relação ao grupo controle, os grupos experimentais foram estatisticamente melhores. Com 14 dias havia regeneração total da epiderme na maioria dos animais, havendo maior quantidade de formação de fibras de colágeno.

Assim como, nos trabalhos de Alves et al. (2008) e Rahal et al. (2003), onde os grupos tratados com mel apresentaram uma maior deposição de colágeno do que os grupos controles que receberam solução fisiológica.

Ao comparar os resultados já descritos anteriormente no presente estudo, os resultados obtidos na análise da deposição dos feixes de fibras de colágeno reforçam os resultados observados na análise da contração da ferida, onde os grupos experimentais apresentaram uma diferença significativa com uma maior redução da área da ferida em relação ao grupo controle.

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, com base nos resultados obtidos, constatou-se que o mel quando dentro das normas adequadas e padronizadas, é um excelente recurso terapêutico para o tratamento de feridas infectadas, apresentando resultados satisfatórios quanto a redução do número de bactérias no decorrer do tratamento, contudo em algumas placas semeadas ocorreu o aparecimento de microrganismos compatíveis com fungos, o que se explica pelo fato do mel ser um produto de origem natural, que não pode passar pelo processo de esterilização e pasteurização, afim de não perder suas propriedades físico-químicas e bioquímicas naturais, que podem influenciar em sua ação antimicrobiana e cicatrizante.

Verificou-se na avaliação macroscópica que os grupos tratados com mel apresentaram resultados melhores, apresentando uma diferença estatística significativa quando comparados ao grupo controle, no dia 3 o mel de *Melipona* apresentou diferença significativa em relação ao grupo tratado com mel de *Apis* e o grupo controle que recebeu solução fisiológica, no dia 7 os grupos experimentais estatisticamente foram melhores que o controle. No 14º não houve diferença significativa, uma vez que quase todas as feridas estavam cicatrizadas.

Na avaliação da intensidade do infiltrado inflamatório notou-se que em todos os grupos houve redução significativa do infiltrado inflamatório, comparando as amostras no período de 7 e 14 dias, contudo na avaliação intragrupos não houve diferença estatística. Na avaliação da densidade de colágeno, os grupos que receberam o tratamento com os méis de *Apis* e *Melipona* apresentaram uma maior deposição de feixes de fibras de colágeno, tendo diferença significativa em relação ao grupo controle, os grupos experimentais foram estatisticamente melhores. Com 14 dias havia regeneração total da epiderme na maioria dos animais, havendo maior quantidade de formação de fibras de colágeno.

Assim sendo, nota-se que a pesquisa apresentou aspectos positivos quanto a cicatrização de feridas infectadas utilizando o mel como recurso terapêutico, mas há a necessidade de realização de mais estudos utilizando o mel como recurso terapêutico avaliando mais aspectos afim de obter resultados melhores.

REFERÊNCIAS

- ALVES, D. F. S, et al. Efeitos da aplicação tópica do mel de *Melipona subnitida* em feridas infectadas de ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 35, n. 3, p. 188-193, 2008. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rcbc/a/KN4MvdshHskhpnRsscDySZQ/?format=pdf&lang=pt>>. Acesso em: 10 jun. 2020.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (Org.). **Animais de Laboratório: criação e experimentação** [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. Disponível em: <<https://static.scielo.org/scielobooks/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2020.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 18 ed. Gaithersburgs: AOAC International, 2006.
- ARRUDA, C. M. F. Características físico-químicas e polínicas de amostras de méis de *Apis mellifera* L., 1958 (Hymenoptera, Apidae) da região da Chapada do Araripe, município de Santana do Cariri, estado do Ceará, Dissertação (Mestrado em Ciência), ESALQ, Piracicaba, São Paulo, 2003.
- BANDEIRA, A. M. P. **Caracterização Físico-Química e Bioatividades do Mel de Abelha Produzido na Região Oeste do Estado do Pará**. 2016. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biociências), Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, 2016.
- BARROS, E. M. L. et al. Estudo do creme de buriti (*Mauritia flexuosa* L.) no processo de cicatrização. **ConScientiae Saúde**, v.13, n.4, p.603-610, 2014. Disponível em: <<https://periodicos.uninove.br/saude/article/view/5175/2866>>. Acesso em: 12 maio 2019.
- BARTH, O. M. Análise Polínica De Mel: Avaliação De Dados E Seu Significado. **Mensagem Doce**, n. 81, 2005. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/81/artigo.htm>>. Acesso em: 12 maio 2019.
- BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. **Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 41, n. 1, 2005. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbcf/a/HXZMLDrTL5B7mrRRqSsbtmh/?format=pdf>. Acesso em: 28 mar. 2020.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 12, de 1978. **Diário Oficial da União**. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cnpa/1978/res0012_30_03_1978.html>. Acesso em: 13 jun. 2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Determinação de Acidez em Mel por Potenciometria**. 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/arquivos-metodos-da-area-poa-iqa/met-poa-slav-18-02-determinacao-de-acidez-em-mel.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 11 de 20 de outubro de 2000. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel**. 2000. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/IN-11-de-2000.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2019.

BRITO JUNIOR, L. C. de.; FERREIRA, P. de. L. Cicatrização de feridas contaminadas tratadas com papaína. **Medicina** (Ribeirão Preto), v. 48, n. 2, p. 168-174, 2015. Disponível em: <<https://www.revistas.usp.br/rmrp/article/view/99751/98171>>. Acesso em: 14 maio 2020.

CAMPOS, F. S.; GOIS; G. C.; CARNEIRO, G. G. Parâmetros Físico-Químicos do Mel de Abelhas *Melipona scutellaris* Produzido no Estado da Paraíba. **FAZU em Rev.** p. 186-190, 2010.

CARVALHO, C. A. L. et al. **Mel de abelhas sem ferrão**: contribuição para a caracterização físico-química. Bahia: Universidade Federal da Bahia/SEAGRI-BA, 2005. 32p.

CRUZ, C. B. N. et al. Antimicrobial activity of honeys from two stingless honeybee species and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) against pathogenic microorganisms. **Acta Amazônica**, v.44, n.2, p.287-290, 2014. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/aa/a/FQD9p65gvjVbcYkgCdt7FHm/?lang=en>>. Acesso em: 10 mar. 2019.

DAMY, S. B. et al. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 1, p. 103-111, 2010.

DUARTE, A. W. F. Mel de Abelhas Nativas e Africanizadas do Estado de Alagoas: Composição Química, Segurança Microbiológica e Atividade Terapêutica. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2009.

FERREIRA, I. C. F. R. et al. Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1438-1443, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814608013733>>. Acesso em: 10 maio 2019.

GOIS. G. C. et al. Composição do Mel de *Apis Mellifera*: Requisitos de Qualidade. **Acta Veterinaria Brasileira**, v. 7, n. 2, p. 137-147, 2013. Disponível em: <<https://periodicos.ufersa.edu.br/acta/article/view/3009>>. Acesso em: 26 mar. 2019.

GOMES, V. V. et al. Evaluation of the Quality of Honey Commercialized in Western Pará, Brazil. **Revista Virtual de Química**. v. 9. n. 2, p. 815-826, 2017. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/316500877_Evaluation_of_the_Quality_of_Honey_Commercialized_in_Western_Para_Brazil>. Acesso em: 26 mar. 2019.

GOMES, V. V. et al. Caracterização Físico-Química e Atividade Antioxidante do Mel de Abelha Jandaíra (*Melipona Compressipes* Manaosensis) Produzido em Mojuí dos Campos, Pará, Brasil. 2016. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/311613873_CHARACTERIZACAO_FISICO-QUIMICA_E_ATIVIDADE_ANTIOXIDANTE_DO_MEL_DE_ABELHA_JANDAIRA_Melipona_compressipes_manosensis_PRODUZIDO_EM_MOJUI_DOS_CAMPOS_PARA_BRASIL>. Acesso em: 15 mar. 2019.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos Para Análise De Alimentos**: Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo-SP: Instituto Adolfo Lutz, 2005. 4 ed. Brasília-DF: ANVISA, 2005.

JORGE, S. A.; DANTAS, R. S. P. E. **Abordagem multidisciplinar no tratamento de feridas**. São Paulo: Atheneu, 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p.359-366.

KLINGE; U.; FARMAN, N.; FIEBELER, A. Evaluation of the collaborative network of highly correlating skin proteins and its change following treatment with glucocorticoids. **Theoretical Biology and Medical Modelling**, 7:16. 2010. doi: 10.1186/1742-4682-7-16.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robins & Cotran Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 9 ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2016.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, É. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares -Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/abd/a/nL3Wsv5LbQN9V7QYwtkc5yh/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 05 nov. 2020.

MENDONÇA, R. J. de.; COUTINHO NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257-62, 2009. Disponível em: < <https://www.scielo.br/j/abd/a/DBvn66Nww64wMW9qjk59N6N/?lang=pt&format=pdf>>. Acesso em: 07 fev. 2020.

MILLER, W.H.; GRIFFIN, C. E.; CAMPBELL, K.L. Muller and Kirk's small animal dermatology. 7.ed. **St. Louis: Elsevier**, 2013. p.774-843.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA. **Diretrizes da prática de eutanásia** do CONCEA. Brasília-DF, 2018.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – CONCEA. **Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos** – DBCA, Brasília-DF, 2013.

MONTE, A. M. et al. Qualidade De Méis De Abelhas Nativas Sem Ferrão Do Estado Do Piauí, Brasil. **Revista brasileira de medicina veterinária**. v. 35, n. 1, p. 48-54, 2013.

MONTENEGRO, H. R. **Comparação das Características Físico-Químicas e Antioxidantes do Mel de *Tetragonisca Angustula* (Latreille, 1811) Coletado Nos Estados Do Paraná E Rondônia**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2018.

MORESKI, D. A. B.; LEITE-MELLO, E. V. S.; BUENO, F. G. Ação cicatrizante de plantas medicinais: um estudo de revisão. **Arquivos de Ciência e Saúde**, v. 22, n. 1, p. 63- 69, 2018.

NASCIMENTO, A. S. do. **Parâmetros Físico-químicos, polínicos e determinação de elementos-traço do mel de Meliponinae (*Hymenoptera: Apidae*)**. 2014. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências), Escola Superior Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2014.

NASCIMENTO, I. V. do. **Efeito da corticoterapia sistêmica crônica no desenvolvimento da periodontite apical em ratos**, 2017. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

NITZ, A. C. et al. Estudo morfométrico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando: *Coronopus didymus* e *Calendula officinalis*. **Arquivos Catarinenses de Medicina**. v. 35, n. 4, p. 74-79, 2006. Disponível em: <<http://www.acm.org.br/acm/revista/pdf/artigos/400.pdf>>. Acesso em: 22 maio 2019.

NUNES, C. de S.; CINSA, L. A. Princípios do processamento histológico de rotina. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 8, n. único, p. 31-40, 2016. Disponível em: <<https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/11/964830/2884-8890-1-sm.pdf>>. Acesso em: 22 out. 2020.

OLIVEIRA, A. F. et al. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 302-310, 2010.

OLIVEIRA, K. A. de M.; RIBEIRO, L. S.; OLIVEIRA, G. V. de. Caracterização Microbiológica, Físico-Química e Microscópica de Mel de Abelhas Canudo (*Scaptotrigona depilis*) e Jataí (*Tetragonisca angustula*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 3, p. 239-248, 2013.

OLIVEIRA, P. S. et al. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (*Apidae, Meliponini*) e *Apis mellifera* (*Apidae, Apini*) da Amazônia. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1728-1732, 2012.

PEREIRA, A. P. R. **Caracterização de Mel com vista à Produção de Hidromel**, 2008. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) - Escola Superior Agrária de Bragança, Portugal. 2008. Disponível em: <https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/1103/1/Pereira_Ana%20Paula.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2020.

PEREIRA, L. L. **Análise físico-química de amostras de méis de *Apis mellifera* e meliponíneos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2010.

RAHAL, S. C. et al. Utilização de própolis ou mel no tratamento de feridas limpas induzidas em ratos. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 1, p.61-67, 2003.

RAYOL, B. P.; MAIA, R. T. F. Potencial da inserção de abelhas em sistemas agroflorestais no oeste do estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 8, n. 3, p. 101-108, 2013. Disponível em: <https://orgprints.org/id/eprint/26041/1/Rayol_Avalia%C3%A7%C3%A3o%20do%20potencial%20de%20inser%C3%A7%C3%A3o%20de%20abelhas.pdf>. Acesso em: 22 maio de 2019.

RIVITTI, E. A. **Dermatologia de Sampaio e Rivitti**. 4. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2018.

- SANT'ANA, D. L. et al. Characterization of Monofloral honeys with Multivariate Analysis of Their Chemical Profile and Antioxidant Activity. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, p. 135-140, 2012.
- SANTOS, A. L. dos. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.
- SANTOS, A. T.; MAURÍCIO JÚNIOR, J.; CUNHA, G. N. Cicatrização por segunda intenção de feridas cutâneas em ratos Wistar com uso de *Stryphnodendron adstringens*. **Ciência Animal**, v. 29, n. 1, p. 15-29, 2019.
- SANTOS, D. da C.; OLIVEIRA, E. N. A. de. Características físico-químicas e microbiológicas de méis de *Apis mellifera* L. provenientes de diferentes entrepostos. **Comunicata Scientiae**, v. 4, n. 1, p. 67-74, 2013.
- ŠARIĆ, G. et al. Changes of Antioxidant Activity and Phenolic Content in Acacia and Multifloral Honey During Storage. 2012. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, n. 4, p. 434-441, 2012.
- SATO, T.; MIYATA, G. The nutraceutical benefit, part III: Honey. **Nutrition**, v. 16, n. 6, p. 468-469, 2000.
- SAXENA, S.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Physical, biochemical and antioxidant properties of some Indian honeys. **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 391-397, 2010.
- SCHLABITZ, C.; SILVA, S. A. F. da.; SOUZA, C. F. V. de. Avaliação de Parâmetros Físico-Químicos e Microbiológicos em Mel. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 4, n. 1, p. 80-90, 2010. Disponível em: <<https://periodicos.utfpr.edu.br/rbta/article/view/468>>. Acesso em: 10 maio 2019.
- SILVA, C. L.; QUEIROZ, A. J. M.; FIGUEIRÊDO, R. M. F. Caracterização físicoquímica de méis produzidos no Estado do Piauí para diferentes floradas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 8, n.2-3, p. 260-265, 2004.
- SILVA, G. S. da. **Avaliação dos Parâmetros Químicos e Potencial Antioxidante do Mel de Jandaíra (*Melipona Subnitida* D.)**. 2011. 88 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.
- SILVA, R. C. L.; FIGUEIREDO, N. M. A.; MEIRELES, I. B. **Feridas: fundamentos e atualizações em enfermagem**. São Caetano do Sul: Yendis, 2007.
- SILVA, R. A. da. et al. Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 1, p. 113-120, 2006.
- SILVA, T. M. S. et al. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 29, n. 1, p. 10-18, 2013. Disponível em: <<https://www.science-direct.com/science/article/pii/S0889157512001640>>. Acesso em: 02 maio. 2019.

SILVA, W. F. **Efeito da associação da terapia com laser de baixa potência e alta frequência no processo de cicatrização em feridas cutâneas de ratos**, 2019 - Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, 2019,

STRAMM, K. M. **Composição e qualidade de méis de abelha Jandaira (*Melipona subnitida*), efeitos estocagem e comparação com méis de *Apis mellifera***. 2011. Dissertação (Mestrado em Bromatologia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-20122011-152131/pt-br.php>>. Acesso em: 10 abr. 2019.

TAUBE JÚNIOR, P. S. et al. Atividade antimicrobiana de méis produzidos em Santarém-PA, Brasil. In: SILVA NETO, B. R. da (Org). **Pesquisa científica e tecnológica em microbiologia 2**. Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2020. cap. 3, p. 20-29.

VERHAEGEN, P. D. et al. Adaptation of the dermal collagen structure of human skin and scar tissue in response to stretch: an experimental study. **Wound Repair and Regeneration**, v. 20, p. 658-666, 2012. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1524-475X.2012.00827.x>>. Acesso em: 20 jun. 2019.

VILLAS-BÔAS, J. K.; MALASPINA, O. Parâmetros físico-químicos propostos para o controle de qualidade do mel de abelhas indígenas sem ferrão no Brasil. **Mensagem Doce**, n. 82, 2005. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br>>. Acesso em: 04 abr. 2019.

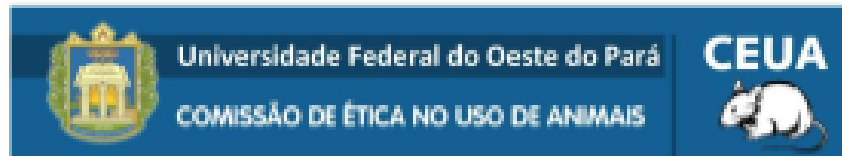
VISAVADIA, B. G.; HONEYSETT, J.; DANFORD, M. H. Manuka honey dressing: an effective treatment for chronic wound infections. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 46, n. 1, p. 55-56, 2008. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0266435606001860>>. Acesso em: 30 jun. 2019.

YAMAMOTO, V.; CEGACK, R. R. F. Microbiota oral de ratos e camundongos: estudo da prevalência de bactérias Gram positivas. **RESBCAL**, v.1, n.4, p. 302-309, 2012.

ZHANG, D.; HAMAUZU, Y. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. **Food Chemistry**. v. 88, n. 9, p. 503-509, 2004.

ANEXO

Anexo 1. Certificado de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (Ceua)



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº 052019001-2019, intitulado **"MEL NO REPARO TECIDUAL DE FERIDAS CUTÂNEAS INFECTADAS E NÃO INFECTADAS EM RATOS WISTAR"**, sob a responsabilidade de **Paulo Sérgio Tauber Júnior**, 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 Nº 052019001-2019, entitled **"MEL NO REPARO TECIDUAL DE FERIDAS CUTÂNEAS INFECTADAS E NÃO INFECTADAS EM RATOS WISTAR"**, (HONEY IN THE TISSUE REPAIR OF INFECTED AND NON-INFECTED SKIN WOUNDS IN WISTAR RATS) 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-UFOPA.

Santarém-PA, 18/05/2019.

Prof. Dr. Maxwell Barbosa de Santana
Presidente da CEUA/ UFOPA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal do Oeste do Pará
Av. Mendonça Furtado, 2440 CEP 68040-050 – Bairro Aldéia – Santarém/PA
E-mail: ceua@ufopa.edu.br

Verificar a autenticidade deste certificado: Enviar email para ceua@ufopa.edu.br