

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DA POMADA À BASE DE MISTURA DE MEL *IN*
NATURA E SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA DE PRÓPOLIS (5%)
EM EXCIPIENTE LIPOFÍLICO E HIDROFÍLICO NO
TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS WISTAR

MARINA PAIVA BRANCO

Botucatu – SP
Julho de 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DA POMADA À BASE DE MISTURA DE MEL *IN*
NATURA E SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA DE PRÓPOLIS (5%)
EM EXCIPIENTE LIPOFÍLICO E HIDROFÍLICO NO
TRATAMENTO DE FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS WISTAR

MARINA PAIVA BRANCO

Dissertação apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal
para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ivan Felismino Charas dos Santos

Botucatu – SP

Julho de 2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Branco, Marina Paiva.

Avaliação da pomada à base de mistura de mel in natura e solução hidroalcoólica de própolis (5%) em excipiente lipofílico e hidrofílico no tratamento de feridas cutâneas de ratos wistar / Marina Paiva Branco. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Ivan Felismino Charas dos Santos

Capes: 50501070

1. Ratos Wistar. 2. Pele - Ferimentos e lesões - Tratamento. 3. Pomadas. 4. Abelha - Produtos. 5. Mel de abelha. 6. Própole.

Palavras-chave: Abelha; Flavonoides; Pele; Produto naturais; trauma.

Nome da autora: Marina Paiva Branco

Título: Avaliação da pomada à base de mistura de mel *in natura* e solução hidroalcoólica de própolis (5%) em excipiente lipofílico e hidrofílico no tratamento de feridas cutâneas de ratos Wistar.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Ivan Felismino Charas dos Santos
Orientador
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal
FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Associada Noeme Sousa Rocha
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. José Manuel da Mota Cardoso
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
Setor de Cirurgia e Reprodução
Faculdade de Veterinária. Universidade Eduardo Mondlane
Maputo, Moçambique

Data da defesa: 16 de julho de 2020.

AGRADECIMENTOS

A gratidão é um sentimento muito nobre que nos faz reconhecer benefícios decorrente em nossas vidas, tão nobre que nos mostra a necessidade de ser grato também pelas adversidades. As dificuldades da vida são tão essenciais quanto às realizações, pois a partir delas que podemos aprender, crescer e evoluir.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço primeiramente ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal pela oportunidade oferecida para que eu realizasse meu mestrado e à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Botucatu, em especial à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) pela ótima estrutura e por todo suporte que oferece aos seus alunos.

Sou grata ao meu orientador, Prof. Dr. Ivan Felismino Charas dos Santos, pelo apoio e dedicação que tem comigo e com todos seus orientados, agradecendo todo o suporte e pela oportunidade que me ofereceu durante essa trajetória. À minha coorientadora Profa. Titular Sheila Canevese Rahal, por ter permitido meu ingresso na pós-graduação e por ter compartilhado o conhecimento e parcerias que agregassem ao nosso trabalho.

Agradeço à equipe do setor dos Isótopos Estáveis, Instituto de Biociências (IBB), Unesp, Botucatu, em especial ao assistente de suporte acadêmico Evandro Tadeu da Silva, pela ajuda e orientação para realização do piloto, e ao Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa pela ajuda na interpretação dos resultados.

À Profa. Associada Noeme Sousa Rocha e seus residentes Alexandre Batazza e Felipe César da Silva Brasileiro do setor de Patologia Veterinária, FMVZ, Unesp, Botucatu, que ajudaram na montagem e leitura das lâminas de histopatologia.

À equipe do setor de Diagnóstico por Imagem, FMVZ, Unesp, Botucatu, pela disponibilidade do aparelho de tomografia computadorizada, e em especial aos pós-graduandos Michel de Campos Vettorato e Jéssica Leite Fogaça, pela ajuda com a análise e mensuração das imagens tomográficas.

Agradeço à Profa. Regina Takahira e seus residentes, em especial Juliana Mayumi Tonossu, setor do Laboratório Clínico, pela realização dos exames laboratoriais.

À Unidade de Pesquisa Experimental (Unipex), Faculdade de Medicina, Unesp, Botucatu, e ao Luiz Carlos Edevalter Bardella pela ajuda na realização da tensão cicatricial das feridas.

À profa. Associada Claudia Helena Pellizzon e ao Lucas Fernando Sérgio Gushiken, do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, IBB, Unesp, Botucatu, pela análise do estresse oxidativo e citocinas inflamatórias.

Agradeço ao Pedro Esteves Trindade pela realização da análise estatística.

Sou grata aos meus familiares, em especial, minha mãe Ana Cristina Kamel, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões e me deu todo o suporte para concluí-las.

Aos meus amigos, sou extremamente grata pela parceria, companheirismo e apoio, principalmente pela ajuda na parte prática do estudo, em especial Gustavo Manea Ferreira, José Ivaldo de Siqueira Silva Junior, David José de Castro Martins, Bruna Martins da Silva, Thais Hamae Sato, Gabriella Cunha Salewski, Bárbara Wagner Duarte Ferraz De Camargo e Bárbara Di Martino Frezza.

À minha parceira de todos os momentos que me ofereceu todo apoio, e mesmo não precisando participar de nenhuma etapa do estudo, esteve lá me dando suporte, Karen Kobayachi.

Agradeço às pessoas que direta ou indiretamente cruzaram meu caminho e me incentivaram a iniciar um projeto de pesquisa. É muito bom saber que de certa forma é possível contribuir com a sociedade e retribuir o conhecimento que eu obtive dentro da universidade.

Sou extremamente grata pela minha vida e pelas oportunidades ganhadas e perdidas que me trouxeram até onde estou hoje. As experiências por mim vividas foram essenciais para formar a pessoa que sou hoje, e me sinto plenamente realizada.

SUMÁRIO

	Páginas
RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
CAPÍTULO 1	1
1. Introdução e Justificativa	2
2. Revisão de literatura	4
2.1. Fases da cicatrização.....	5
2.1.1. Fase inflamatória.....	5
2.1.2. Fase de proliferação.....	6
2.1.3. Fase de remodelação ou maturação	7
2.2. Mel.....	8
2.3. Própolis	9
3. Referências	12
CAPÍTULO 2	17
Trabalho científico 1	18
ANEXOS.....	48
Anexo 1.....	49
SÚMULA CURRICULAR.....	50

BRANCO, M. P. Avaliação da pomada à base de mistura de mel *in natura* e solução hidroalcoólica de própolis (5%) em excipiente lipofílico e hidrofílico no tratamento de feridas cutâneas de ratos Wistar. Botucatu, 2020. 60p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal – Cirurgia de Pequenos Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

RESUMO: O estudo teve como objetivo avaliar a ação cicatrizante da pomada à base da associação do mel *in natura* e solução hidroalcoólica de própolis (5%) com excipiente lipofílico e hidrofílico em feridas cirúrgicas cutâneas não contaminadas de ratos Wistar. Foram utilizados 48 ratos Wistar hígidos machos, com 14 semanas de idade e massa corpórea entre 365 e 370 g. Feridas de 3 cm de diâmetro foram realizadas na região dorsal de todos os animais. Os ratos foram divididos aleatoriamente em três grupos de 16 animais, de acordo com o tratamento: Grupo 1 - solução salina (0,9%), Grupo 2 - associação do mel *in natura* e da solução hidroalcoólica de própolis (5%) em excipiente lipofílico; Grupo 3 - associação do mel *in natura* e da solução hidroalcoólica de própolis (5%) em excipiente hidrofílico. O tratamento foi realizado a cada seis horas durante 14 dias. A avaliação clínica e morfométrica foi realizada no sétimo (7POS) e 14º dia de pós-operatório (14POS). Oito ratos de cada grupo foram submetidos às biopsias excisionais das feridas após eutanásia no 7POS e 14POS para realização da avaliação tensiométrica e histológica. Não foram observadas diferenças significativas na avaliação macroscópica. Na avaliação morfométrica e intensidade e característica do infiltrado inflamatório foi verificada variações significativas entre os grupos ao longo dos momentos. Histologicamente, a pomada com a associação de mel e solução hidroalcoólica de própolis a 5% em excipiente lipofílico demonstrou ter maior efeito benéfico na cicatrização. Ambas as pomadas apresentaram efeitos antimicrobianos profiláticos.

Palavras-chave: abelha; flavonoides; pele; produtos naturais; trauma.

BRANCO, M. P. Evaluation of the mixture of honey *in natura* and propolis hydroalcoholic solution (5%) ointment in a lipophilic and hydrophilic excipient in the treatment of skin wounds in Wistar rats. Botucatu, 2020. 60p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Animal – Cirurgia de Pequenos Animais) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

ABSTRACT: The study aimed to evaluate the wound healing effect of ointment based on the association of honey and 5% propolis hydroalcoholic solution with lipophilic and hydrophilic excipient in uncontaminated cutaneous surgical wounds of Wistar rats. Forty-eight healthy male Wistar rats, 14 weeks old and body weight between 365 and 370 g were used. Wounds with 3 cm diameter were performed on the dorsal region of all animals. The rats were randomly divided into three groups of 16 animals, according with treatment: Group 1 - saline (0.9%), Group 2 - association of honey and 5% propolis hydroalcoholic solution in lipophilic excipient; Group 3 - association of honey and 5% propolis hydroalcoholic solution in hydrophilic excipient. The treatment was carried out every six hours for 14 days. The clinical and morphometric evaluation was performed on the seventh (7POS) and 14th postoperative day (14POS). Eight rats from each group were submitted to excision biopsies of the wounds after euthanasia at 7POS and 14POS to perform the tensiometric and histological evaluation. There were no significant differences in the macroscopic evaluation. In the morphometric evaluation and intensity and characteristic of the inflammatory cells significant variations were observed between the groups over the time-points. Histologically, the ointment with association of honey and 5% hydroalcoholic propolis solution in lipophilic excipient has been shown to have a greater beneficial effect on healing. Both ointments showed prophylactic antimicrobial effects.

Keywords: bee; flavonoids; skin; natural products; trauma.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A cicatrização é um processo sistêmico que se relaciona diretamente com o estado geral do organismo, que se inicia por meio de um estímulo (ex. trauma) e posteriormente ocorre o desencadeamento de uma cascata de eventos celulares e moleculares (CAMPOS et al., 2007; OLIVEIRA e DIAS, 2012). Atualmente, vários produtos são estudados com o intuito de acelerar o processo de cicatrização sem interferir na qualidade do tecido cicatricial final (OLIVEIRA e DIAS, 2012).

O mel é um produto natural e orgânico fornecido pelas abelhas a partir do néctar das flores e reconhecido como um produto medicinal natural (ESCOBAR e XAVIER, 2013). Existe uma grande diversidade referente ao seu uso na cicatrização de feridas, com relatos na diminuição de infecções, edemas e dor; efeitos benéficos no processo cicatricial, preservação de enxertos de pele entre outros (SILVA et al., 2006; ESCOBAR e XAVIER, 2013).

A própolis é a mistura das secreções salivares das abelhas com diferentes locais da planta (PINTO et al., 2011). Ela possui propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, analgésica, entre outras (BARBOSA et al., 2009; PINTO et al., 2011). Os flavonoides são substâncias encontradas na própolis e são eles que conferem ação cicatrizante, ação antimicrobiana e moduladora do sistema imune (BARBOSA et al., 2009).

O uso da associação do mel e da própolis em feridas está relacionado com a aceleração da cicatrização devido a diminuição da fase inflamatória e aumento da vascularização e do tecido de granulação no leito da lesão (TAKZAREE et al., 2016). Contudo, pesquisas relacionadas com a ação cicatrizante do mel e da própolis, isoladas ou associadas, em feridas cutâneas são menos frequentes na literatura (RAHAL et al., 2003; SANTOS et al., 2012; TAKZAREE et al., 2016; MACIEL et al., 2020).

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a ação cicatrizante da pomada à base da associação do mel *in natura* e solução hidroalcoólica de própolis (5%) com excipiente lipofílico e hidrofílico em feridas cutâneas não contaminadas, utilizando o rato Wistar como modelo experimental de curta duração.

A hipótese é que a associação em ambos os excipientes induza efeitos benéficos morfológicos e morfométricos em relação às feridas tratadas com solução salina (0,9%). O estudo se justificou visto que não existem até o momento relatos da associação do mel *in natura* e solução hidroalcoólica de própolis (5%) utilizando diferentes excipientes (lipofílico e hidrofílico) na cicatrização de feridas cutâneas de ratos. Por outro lado, sendo substâncias de origem natural possuem baixo custo, mínimo descarte de resíduos ambientais favorecendo a sustentabilidade e ausência de efeitos colaterais.

Os resultados do estudo poderão ser utilizados como base para procedimentos terapêuticos de rotina clínico-cirúrgica em cães e gatos. Paralelamente, o estudo torna-se inédito pelo uso da tomografia computadorizada para avaliação objetiva da profundidade das feridas e pelo uso dos isótopos estáveis na determinação de frequência de aplicação das pomadas.

A presente dissertação gerou um trabalho científico intitulado “Associação do mel *in natura* e própolis em excipiente lipofílico e hidrofílico sobre a cicatrização de feridas cutâneas de ratos Wistar”. Paralelamente, após a realização dos exames laboratoriais será publicado um segundo trabalho científico intitulado “Avaliação do estresse oxidativo e citocinas inflamatórias em feridas cutâneas não contaminadas de ratos Wistar tratadas com associação do mel *in natura* e própolis em diferentes excipientes”.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A pele atua na proteção do corpo contra agressões externas, sendo o primeiro componente do organismo a ser submetido a impactos constantes, tornando sua capacidade de reparo essencial para a manutenção da vida (OLIVEIRA e DIAS, 2012).

O sistema imune tem a função de defender o organismo de agressões do meio externo mantendo a homeostase, e divide-se em imunidade inata e adquirida (CRUVINEL et. al., 2010). A imunidade inata possui barreiras físicas, químicas e biológicas, e não necessita de contato prévio com o agente agressor (CRUVINEL et. al., 2010; OLIVEIRA e DIAS, 2012). Ela tem como principais mecanismos a fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios e ativação de proteínas do sistema complemento (CRUVINEL et. al., 2010). Por sua vez, a resposta imune adquirida depende da ativação de linfócitos e de células especializadas, e suas características incluem a especificidade, reconhecimento de diversos receptores, resposta especializada e memória celular (CRUVINEL et. al., 2010).

A cicatrização é um mecanismo dinâmico que engloba eventos moleculares e bioquímicos e divide-se em três fases: inflamatória, proliferativa e de remodelação ou maturação (CAMPOS et al., 2007). A lesão tecidual dá início ao processo cicatricial, portanto é necessário que haja um estímulo inicial que normalmente está associado aos traumas ou lesões (CAMPOS et al., 2007; OLIVEIRA e DIAS, 2012). Imediatamente após a lesão, ocorre alterações nas células endoteliais devido ao rompimento dos vasos sanguíneos, e em seguida inicia-se o processo de hemostasia tecidual pela liberação dos mediadores vasoativos que promovem a vasoconstrição imediata (OLIVEIRA e DIAS, 2012).

2.1 Fases da cicatrização

2.1.1. Fase inflamatória

Após o trauma, a área lesionada é preenchida por plasma e elementos celulares, principalmente plaquetas, as quais constituem a base para formação do coágulo, e desse modo, criando o ambiente ideal para o início da organização tecidual (MENDONÇA e NETTO, 2009). As plaquetas secretam fatores de crescimento, citocinas e elementos da matriz extracelular para compor o coágulo (CAMPOS et al., 2007; MENDONÇA e NETTO, 2009). Por sua vez, o coágulo protege o organismo contra agentes exógenos que possam adentrar na lesão e evita a perda de sangue e fluídos para o meio extravascular (CAMPOS et al., 2007).

A fase inflamatória é caracterizada por vasodilatação, maior fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade capilar, intensa migração celular e de mediadores inflamatórios na lesão (CAMPOS et al., 2007; OLIVEIRA e DIAS, 2012). Os componentes celulares que migram para o local incluem os leucócitos polimorfonucleares e os macrófagos derivados de monócitos (MENDONÇA e NETTO, 2009).

Os leucócitos polimorfonucleares atuam na fagocitose de bactérias, corpos estranhos e de fragmentos celulares, permanecendo pouco tempo no local, em média entre três a cinco dias (MENDONÇA e NETTO, 2009). Além da fagocitose, os neutrófilos são fonte de mediadores bioquímicos e fatores de crescimento que preparam a ferida para a fase proliferativa (CAMPOS et al., 2007; OLIVEIRA e DIAS, 2012).

Os monócitos mantem-se na lesão em resposta aos agentes quimiotáticos, e transformam-se em macrófagos 24 a 48 horas após o trauma (CAMPOS et al., 2007; OLIVEIRA e DIAS, 2012). Entre o terceiro e quinto dia, os macrófagos liberam a colagenase; removem o tecido necrótico, agentes infecciosos e fragmentos que possam impedir a cicatrização; e induzem a liberação de fatores de crescimento que coordenam a formação do tecido de granulação (MENDONÇA e NETTO, 2009).

2.1.2 Fase de proliferação

A fase proliferativa inicia-se em média no quarto dia após o trauma, podendo durar até 15 dias (CAMPOS et al., 2007). Esta fase é responsável pela oclusão da ferida, sendo caracterizada por quatro etapas fundamentais: epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e deposição de colágeno (CAMPOS et al., 2007; OLIVEIRA e DIAS, 2012).

A epitelização tem início horas após a lesão, e ocorre migração das células epiteliais da margem e do centro da lesão (CAMPOS et al., 2007). As camadas da epiderme são restauradas em três dias na presença de uma membrana basal intacta, porém se estiver lesionada, as células epiteliais das bordas da ferida se proliferam na tentativa de restabelecer a barreira protetora afetando, desse modo, o tempo de cicatrização (CAMPOS et al., 2007).

A angiogênese ocorre em resposta à lesão tecidual na matriz extracelular, sendo estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), secretada principalmente pelos macrófagos (MENDONÇA e NETTO, 2009). Numa primeira fase, ocorre o aumento da permeabilidade vascular devido à migração e mitose das células endoteliais (CAMPOS et al., 2007; MENDONÇA e NETTO, 2009). Os componentes da matriz extracelular são organizados para que ocorra a migração de células endoteliais e formação de novos capilares, contudo dependem da presença das citocinas (CAMPOS et al., 2007). Por outro lado, a angiogênese pode ser estimulada pela baixa tensão de oxigênio, elevados níveis de ácido lático e aminas bioativas (CAMPOS et al., 2007; MENDONÇA e NETTO, 2009). Além disso, atua como reservatório e modulador da liberação de fatores de crescimento, como o fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGF2), produzido pelos macrófagos, e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β) (OLIVEIRA e DIAS, 2012).

A formação de novos vasos sanguíneos é o estímulo para iniciar a formação do tecido de granulação, que é caracterizado pela presença de fibroblastos e de células endoteliais (CAMPOS et al., 2007; MENDONÇA e NETTO, 2009). Dentre os componentes presentes na membrana basal endotelial e no tecido de granulação estão a fibronectina e o colágeno (MENDONÇA e NETTO, 2009). O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) atua na proliferação e na ativação dos fibroblastos (OLIVEIRA e DIAS, 2012), e o TGF- β estimula os fibroblastos a produzirem colágeno tipo I e sua

transformação em miofibroblastos, que promovem a contração da ferida (MENDONÇA e NETTO, 2009).

2.1.3. Fase de remodelação ou maturação

A fase de remodelação ou maturação é caracterizada pela deposição de colágeno que inicialmente é formada por colágeno fino, e mais tarde é substituído por colágeno mais espesso (CAMPOS et al., 2007). Esta fase tem duração de meses, e nela ocorre o aumento da força de tensão e a diminuição do tamanho da cicatriz (OLIVEIRA e DIAS, 2012). A força tênsil não é totalmente restituída, podendo atingir em média 80% da força tensil inicial após três meses da lesão (CAMPOS et al., 2007). Paralelamente, 12 meses após é identificado um colágeno menos organizado em relação à pele integra (CAMPOS et al., 2007).

Durante o processo de remodelação ocorre a apoptose e remoção das células endoteliais e dos fibroblastos determinando a maturação cicatricial (CAMPOS et al., 2007; MENDONÇA e NETTO, 2009). Contudo, se houver grande quantidade de células na lesão formar-se-á os queloides (MENDONÇA e NETTO, 2009). Paralelamente, a diminuição celular estimula o aumento da produção de colágeno do tipo I, e desse modo aumenta a agregação das fibras de colágeno (OLIVEIRA e DIAS, 2012).

As fibras colágenas tornam-se cada vez mais espessas devido às forças mecânicas que o tecido sofre durante a cicatrização, sendo que após a maturação do colágeno a lesão se torna mais resistente formando o tecido cicatricial final (CAMPOS et al., 2007; OLIVEIRA e DIAS, 2012).

O mel e a própolis tem sido cada vez mais pesquisadas devido as suas propriedades cicatrizantes e efeitos colaterais mínimos (PONTE, 2003; ROCHA e REIS, 2005). O objetivo final é formar uma cicatriz esteticamente viável e em menor tempo, de forma a evitar-se complicações como as contaminações e infecções (ROCHA e REIS, 2005; MÖRSCHBÄCHER et al., 2011).

2.2. Mel

O mel é uma substância produzida pelas abelhas melíferas e constituído por vários açúcares e com alto valor nutricional (ESCOBAR e XAVIER, 2013). De entre as suas propriedades cicatrizantes se destacam o aumento da produção de subprodutos oriundos do óxido nítrico, estimulando a vasodilatação, crescimento tecidual e epitelização; redução da inflamação e da formação de exsudato; debridamento natural; estimulação da angiogênese e aumento da síntese de tecido de granulação (BURLANDO e CORNARA, 2013; ESCOBAR e XAVIER, 2013; ARISTIZABAL et al., 2016). Outras propriedades incluem: diminuição dos níveis de prostaglandina, redução da formação de quelóide (MARTINOTTI e RANZATO, 2008; BURLANDO e CORNARA, 2013; ESCOBAR e XAVIER, 2013).

A presença do peróxido de hidrogênio e alta concentração de açúcar no mel gera uma alta osmolaridade e pH baixo no leito da ferida, impedindo o desenvolvimento de microrganismos (ARISTIZABAL et al., 2016; TAKZAREE et al., 2016). Por outro lado, o peróxido de hidrogênio, com seu efeito semelhante à insulina e fator oxidante, estimula a proliferação celular e a angiogênese, e induz um efeito antioxidante fisiológico (KHAN et al., 2014; COOKE et al., 2015).

Oryan et al. (2016) realizaram uma revisão sistemática que analisou as propriedades biológicas e atividade terapêutica do mel na cicatrização. Segundo os autores, os mecanismos de ação do mel no processo cicatricial foram associados com a presença do peróxido de hidrogênio, fatores não peróxidos, óxido nítrico e fenóis.

Em estudo realizado por Santos et al. (2012), o mel foi comparado com o açúcar mascavo na cicatrização de feridas cutâneas induzidas em cobaias durante 21 dias. Não foram observadas diferenças significativas microscópicas entre os tratamentos no sétimo, 14º e 21º dia após a indução das feridas, porém foi observado que as feridas tratadas com mel cicatrizaram mais rápido em relação às tratadas com o açúcar mascavo.

A aplicação clínica do mel foi relatada em cães com ferida lacerativa e com queimaduras. Santos et al. (2011), utilizaram o mel *in natura* em ferida lácerocontusa na região metatársica medial esquerda de aproximadamente 14

cm de extensão, em cão adulto. O mel foi aplicado a cada 48 horas e após nove aplicações foi observado a cicatrização da ferida. Por sua vez, Aristizabal et al. (2016) utilizaram o mel orgânico no tratamento de queimadura de terceiro grau em cão adulto após o debridamento do tecido necrosado e antibioticoterapia. O tratamento foi realizado sob a forma pura do mel a cada 12 horas, e após 15 dias foi observado uma evolução significativa do processo de cicatrização.

2.3. Própolis

A própolis é uma substância resinosa produzida nas glândulas salivares das abelhas da espécie *Apis mellifera* por meio do exsudato de diferentes partes das plantas (ex. brotos de árvores, ramos, flores e folhas) e pólen (FUNARI e FERRO, 2006; PEREIRA FILHO et al., 2012; PAIXÃO et al., 2014). No final do século XIX, a própolis já era considerada uma alternativa eficaz no tratamento de ferimentos cutâneos (PEREIRA FILHO et al., 2012). A sua capacidade em acelerar a cicatrização de feridas, inclusive em modelos animais que mimetizam as feridas diabéticas, já foram comprovadas na literatura (McLENNAN et al., 2008; GARRAUD et al., 2017; PASUPULETI et al., 2017; ORYAN et al., 2018).

Sua composição química é diversa e complexa, e está associada com a fitogeografia da região onde a própolis é adquirida (BURIOL et al., 2009; CABRAL et al., 2009), desse modo é considerada uma mistura heterogênea quando comparada às outras fontes naturais (BEZERRA et al., 2013).

Mais de 300 constituintes químicos foram identificados em amostras de própolis que incluíram: ácidos fenólicos, flavonoides, ésteres, diterpenos, sesquiterpenos, lignanas, aldeídos aromáticos, alcoóis, aminoácidos, ácidos graxos, terpenos, vitaminas e minerais. Contudo, a ação antibacteriana, antiviral, antioxidante, vasodilatadora, cicatrizante, imunomoduladora, anti-inflamatória e analgésica são atribuídas aos flavonoides, ácidos fenólicos e compostos aromáticos (PEREIRA FILHO et al., 2012; PAIXÃO et al., 2014; PEREIRA e BÁRTOLO, 2016; GARRAUD et al., 2017; ORYAN et al., 2018).

As propriedades cicatrizantes da própolis incluem a diminuição de células inflamatórias polimorfonucleares e da área fibrovascular; a redução de radicais livres associadas à presença de flavonoides; e o aumento da quantidade de colágenos tipo I e II (PEREIRA e BÁRTOLO, 2016; PASUPULETI et al., 2017; ORYAN et al., 2018). Outras propriedades estão associadas à regeneração e granulação dos tecidos (MOURA et al., 2011; PINTO et al., 2011).

Rocha e Reis (2005) realizaram um estudo experimental comparando a ação de glicosaminoglicanos e da própolis em forma de pomada na cicatrização de feridas cirúrgicas em ratos albinos. Efeitos deletérios da pomada de própolis incluiu o atraso dos processos de cicatrização pela menor quantidade de vasos sanguíneos e colágeno, e foram observados aos quatro, sete e 10 dias de tratamento. Posteriormente, a eficácia de diferentes concentrações do extrato etanoico da própolis na cicatrização de feridas foi pesquisada por diferentes autores. Iyyam Pillai et al. (2010) demonstraram que o extrato etanoico da própolis indiana (16,5%) induziu significamente maior contração das feridas excisionais de pele de ratos Wistar após 14 dias de tratamento e efeito antimicrobiano. O efeito cicatrizante foi associado ao seu potencial angiogênico e mitogênico, e o efeito antimicrobiano aos flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, ácidos benzoicos, aminoácidos e vitaminas presentes na própolis indiana.

Rocha et al. (2012) compararam os efeitos cicatrizantes e anti-inflamatórios entre o extrato etanoico da própolis (30%) e a dexametasona (0,1%) em feridas induzidas cirurgicamente na mucosa oral de hamsters. Ao sétimo dia de tratamento foi verificado que as áreas das feridas tratadas com a própolis foram significamente menores com relação aos restantes grupos. Histologicamente, o extrato etanoico diminuiu significamente a inflamação e induziu a epitelização e formação de tecido de granulação. Por sua vez, Batista et al. (2015) observaram que a solução hidroalcoólica de própolis (5%) foi mais efetiva na oclusão de feridas cutâneas não contaminadas de camundongo quando comparadas com a solução hidroalcoólica de própolis a 10%.

Na metanálise realizada por Oryan et al. (2018), por meio de buscas na base de dados do PubMed, ScienceDirect e Cochrane Library, entre janeiro de 2000 a outubro de 2017, concluiu-se que a própolis reduziu a formação de biofilme bacteriano, resultando em uma rápida cicatrização. Os mesmos autores observaram que a escassez de informação no que diz respeito a dose, efeitos colaterais e efetividade clínica da própolis em feridas faz com que a sua eficácia seja variável.

Estudo comparando o efeito cicatrizante do mel e da própolis foi realizado por Rahal et al. (2003) em ratos Wistar. Os autores identificaram pela avaliação histológica que nas feridas cutâneas tratadas com a pomada de própolis ocorreu uma diminuição significativa das células inflamatórias e uma reepitelização mais rápida quando comparada com as feridas tratadas com o mel. Por sua vez, Takzaree et al. (2016) verificaram a ação sinérgica do mel e de solução hidroalcoólica de própolis (10%) na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. Maciel et al. (2020) observaram em seu estudo que a mistura de mel e solução hidroalcoólica de própolis (5%) foi mais efetiva na diminuição da área e aumento da contração de feridas de pele de ratos Wistar comparando com a laserterapia de baixa intensidade isolada ou associada ao mel, solução hidroalcoólica de própolis (5%) ou a mistura de ambos.

3 REFERÊNCIAS

ARISTIZABAL, A. S.; HAYASHI, A. M.; MATERA, J. M. Uso do mel orgânico tópico no tratamento de queimadura de terceiro grau em cão: relato de caso. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária**, v. 14, n. 1, p. 12-17, 2016.

BARBOSA, M. H.; ZUFFI, F. B.; MARUXO, H. B.; JORGE, L. L. R. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 22, n. 3, p. 318-322, 2009.

BATISTA E. K. F.; BATISTA, M. C. S.; SOBRINHO, J. A. N.; TRINDADE, H. I.; SILVA, L. L. B.; MULLER, J. B. B. S. Influência da própolis sobre os perfis leucocitário e proteico de camundongos e tempo de fechamento de feridas excisionais limpas e infectadas por *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 3, p. 413-419, 2015.

BEZERRA, K. K. S.; BEZERRA, A. M. F.; SOUSA, L. C. F. S.; SOUSA, J. S.; SILVA, R. A.; BORGES, M. G. B. Atividade antimicrobiana da própolis em lesões cutâneas. **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.9, n.1, p.17-23, 2013.

BURIOL, L.; SCHMIDT, E. M.; ROSA, M. R., TORRES, Y.; PESSOA, C., COSTA-LOTUFO, L. V.; FINGER, D.; SANTOS, J. M. T. S.; PERUCIO, S.; SANTA, H. D.; MORAES, M. O.; FERREIRA, P. M. P. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 296-302, 2009.

BURLANDO, B.; CORNARA, L.. Honey in dermatology and skin care: a review. **Journal of Cosmetic Dermatology**. v.12, n. 4, p. 306, 2013.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; BEZERRA, R. M. N.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, vol. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CAMPOS, A. C. L.; BRANCO, A. B.; GROTH, A. K. Cicatrização De Feridas. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva. Artigo de revisão**, v. 20, n. 1, p. 51-8, 2007.

COOKE, J.; DRYDEN, M.; PATTON, T.; BRENNAN, J.; BARRETT, J. The antimicrobial activity of prototype modified honey that generate reactive oxygen species (ROS) hydrogen peroxide. **BMC Research Notes**, v. 8, n. 1, p.20, 2015.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRA, L. E. C. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-61, 2010.

ESCOBAR, A. L. S.; XAVIER, F. B. Propriedades fitoterápicas do mel de abelhas. **Revista Uningá**, n.37, p. 159-172, 2013.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 171-178, 2006.

GARRAUD, O.; HOZZEIN, W. N.; BADR, G. Wound healing: time to look for intelligent, 'natural' immunological approaches?. **BMC Immunology**, v. 18, p. 39-65, 2017.

IYYAM PILLAI, S.; PALSAMY, P.; SUBRAMANIAN, S.; KANDASWAMY, M. Wound healing properties of Indian propolis studied on excision wound-induced rats. **Pharmacology Biology**, v. 48, n. 11, p. 1198-206, 2010.

KHAN, F.; HILL, J.; KAEHLER, S.; ALLSOPP, M.; VAN VUUREN, S. Antimicrobial properties and isotope investigations of South African honey. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 2, p.366-79, 2014.

MACIEL, D. M.A. D.; RAHAL, S. C.; SANTOS, I. F. C.; ALVES, C. E. F.; SAMPAIO, A. B.A.; NAGAI, L.R.; CAMARGO, B. W. D. F.; SALEWSKI, G. C. Healing of Skin Wounds in Rats: Influence of Low-Level Laser Therapy, Alone or Combined with Natural Products. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 48, p. e1729. 2020.

MARTINOTTI, S.; RANZATO, E. Honey, Wound Repair and Regenerative Medicine. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 9, n. 2, p. 34, 2008.

McLENNAN, S. V.; BONNER, J.; MILNE, S.; LO, L.; CHARLTON, A.; KURUP, S.; JIA, J.; YUE, D. K.; TWIGG, S. M. The anti- inflammatory agent Propolis improves wound healing in a rodent model of experimental diabetes. **Wound Repair Regeneration**, v.16, n. 5, p. 706-173, 2008.

MENDONÇA, R. J.; NETTO, J. C. Aspectos celulares da cicatrização/Cellular aspects of wound healing. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, p. 257-62, 2009.

MÖRSCHBÄCHER, P.D.; LAMBERTS, M.; TUANE, N. A. G.; EMERSON, A. C. Uso de membrana biológica de hemicelulose (VELODERM) e pomada de calêndula (*Calendula officinalis*) como adjuvante na cicatrização músculo-cutânea em um cão. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 3, p. 366-370, 2011.

MOURA, S. A. L.; FERREIRA, M. A. N. D.; ANDRADE, S. P.; REIS, M. L. C.; NOVIELLO, M. L.; CARA, D. C. Brazilian green propolis inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 1-7, 2011.

OLIVEIRA, I. V. P. M.; DIAS, R. V. C. Cicatrização De Feridas: Fases e fatores de influência. **Acta Veterinária Brasília**, v. 6, n. 4, p. 267-271, 2012.

ORYAN A.; ALEMZADEH E.; MOSHIRI A. Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. **Biomedical Pharmacotherapy**, v. 98, p. 469 – 483, 2018.

PAIXÃO, D. R.; FLAUSINO, P. A.; REIS, N. G.; LIMA, G. C.; BERNARDES, M. T. C. P.; SANTOS, L.; GARCIA, J. A. D. Efeitos da própolis na proliferação de fibroblastos em lesões cutâneas de ratos. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 3, p. 413-417, 2014.

PASUPULETI V. R.; SAMMUGAM L.; RAMESH N.; GAN S. H. Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, ID: 1259510, p. 1-21, 2017.

PEREIRA FILHO, J. S.; BICALHO, L.; SILVA, D. A. Uso de própolis associada a outros componentes no tratamento de feridas oncológicas após excisão. **Acta Biomédica Brasiliensia**, v. 3, n. 2, 2012.

PEREIRA, R. F.; BÁRTOLO, P. J. Traditional therapies for skin wound healing. **Advances in Wound Care**, v. 5, n. 5, p. 208-229, 2016.

PINTO, L. M. A.; PRADO, N. R. T.; CARVALHO, L. Propriedades, usos e aplicações da própolis. **Revista Eletrônica De Farmácia**, v. 8, n. 3, p. 76-100, 2011.

PONTE, F. L. R. Toxicidade pré-clínica de fitoterápicos à base de mel de abelha, própolis e extrato de *Mikania Glomerata*. *Eucalyptus Globus* ou a associação *Zingiber Officinale* e *Allinum Sativum* em Roedores. **Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco-CCB. Departamento de Fisiologia e Farmacologia**, 2003.

RAHAL, S. C., BRACARENSE, A. P. F. R. L.; TANAKA, C. Y; GRILLO, T. P; LEITE, C. A. L. 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.

ROCHA, C. B. J.; REIS, N. S. Estudo comparativo do efeito de glicosaminoglicanas ácidas sulfatada (Hirudóid) e não-Sulfatada (ácido hialurônico) e da própolis sobre a cicatrização da pele de ratos albinos. **Revista Científica da Universidade de Franca**, v. 5, n. 1/6, p. 101-109, 2005.

ROCHA, R. L.; MIRANDA, J. L.; LIMA, N. L.; PEREIRA, F. O.; MARINHO, S. A.; VERLI, F. D. Effect of tropical própolis and dexamethasone on the healing of oral surgical wounds. **Wound Healing Southern Africa**, v. 25, n. 1, p. 25- 30, 2012.

SANTOS, I. F. C.; CARDOSO, J. M. M.; OLIVEIRA, K.C.; MARUJO, R.B. Uso do mel no tratamento de ferida lacero contusa em um cão adulto - Relato de caso. **Medvep Dermato - Revista de Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária**, v. 1, n. 1, p.73-76, 2011.

SANTOS, I. F.C.; GROSSO, S. L. S.; BAMBO, O. B.; NHAMBIRRE, A. P.; CARDOSO, J. M. C.; SCHMIDT, E. M. S.; MARUJO, R. B. Mel e açúcar mascavo na cicatrização de feridas. **Ciência Rural**, v.42, n.12, p.2219-2224, 2012.

SILVA, R. A.; MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; COSTA, J. M. C. Composição e propriedades terapêuticas do mel de abelha. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 17, n. 1, p. 113-120, 2006.

TAKZAREE, N.; HADJIAKHONDI, A.; HASSANZADEH, G.; ROUINI, M. R.; MANAYI, A. Synergistic Effect of Honey and Propolis on Cutaneous Wound Healing in Rats. **Acta Medical Iranica**, v. 54, n. 4, p. 233-239, 2016.

CAPÍTULO 2

TRABALHO CIENTÍFICO 1

Artigo científico a ser enviado para a Acta Medica Iranica.

Normas: http://acta.tums.ac.ir/index.php/acta/author_Guidelines

O presente trabalho científico será traduzido para a língua inglesa para submissão. O corpo do texto foi formatado de acordo com as normas de submissão da revista, com exceção das figuras e legendas que estão inseridas no texto para facilitar a leitura.

ASSOCIAÇÃO DO MEL *IN NATURA* E PRÓPOLIS EM EXCIPIENTE LIPOFÍLICO OU HIDROFÍLICO NA CICATRIZAÇÃO DE FERIDAS CUTÂNEAS DE RATOS WISTAR

Resumo

O estudo teve como objetivo avaliar a ação cicatrizante da associação do mel *in natura* e solução hidroalcoólica de própolis (5%) em excipiente lipofílico ou hidrofílico em feridas cirúrgicas cutâneas não contaminadas, utilizando o rato Wistar como modelo experimental de curta duração. Foram utilizados 48 ratos Wistar hígdidos machos, com 14 semanas de idade e massa corpórea entre 365 e 370 g. Feridas de 3 cm de diâmetro foram realizadas na região dorsal de todos os animais, e os ratos foram divididos aleatoriamente em três grupos de 16 animais, de acordo com o tratamento: Grupo 1 - solução salina (0,9%), Grupo 2 - associação do mel *in natura* e da solução hidroalcoólica de própolis (5%) em excipiente lipofílico; Grupo 3 - associação do mel *in natura* e da solução hidroalcoólica de própolis (5%) em excipiente hidrofílico. O tratamento foi realizado a cada seis horas durante 14 dias. A avaliação macroscópica foi realizada no terceiro (3POS), sétimo (7POS), 10º (10POS) e 14º dia de pós-operatório (14POS). A avaliação morfométrica, tensiométrica e histológica das feridas foram realizadas no 7POS e 14POS. Não foram observadas diferenças significativas na

avaliação macroscópica. Na avaliação morfométrica e histológica foi verificada variações significativas entre os grupos ao longo dos momentos. Histologicamente, a associação de mel *in natura* e solução hidroalcoólica de própolis (5%) em excipiente lipofílico demonstrou ter maior efeito benéfico na cicatrização das feridas cutâneas.

Palavras-chave: abelha; flavonoides; pele; produtos naturais; trauma.

Introdução

A cicatrização é um processo sistêmico e dinâmico que envolve uma cascata de eventos celulares e moleculares que tem como objetivo reestabelecer a hemostasia, substituir o tecido lesionado por tecido conjuntivo, e a reconstituição tecidual (1-2). Vários protocolos terapêuticos são usados no tratamento de feridas com o objetivo de acelerar o processo cicatricial diminuindo o tempo de oclusão e melhoria na qualidade do tecido cicatricial final (2). Os produtos naturais são cada vez mais pesquisados como alternativa na cicatrização de feridas, visto que os seus efeitos colaterais e o descarte de resíduos ambientais são mínimos ou estão ausentes (3).

O mel é produzido pelas abelhas melíferas a partir do néctar das flores, sendo constituído por vários açúcares e peróxido de hidrogênio (4). As suas propriedades cicatrizantes incluem a produção de subprodutos oriundos do óxido nítrico, induzindo a vasodilatação, estimulando o crescimento tecidual e epitelização; a redução da inflamação e da formação de exsudato; o debridamento natural; e a estimulação da angiogênese e aumento da síntese de tecido de granulação (4-6). Por sua vez, a própolis é uma substância resinosa produzida nas glândulas salivares das abelhas da espécie *Apis mellifera* por meio do exsudato das diferentes partes das plantas e pólen (7-8). A sua

composição química é diversa e considerada uma mistura heterogênea quando comparada as outras fontes naturais, estando associada com a fitogeografia da própolis (9-11).

Mais de 300 constituintes químicos foram identificados em amostras de própolis, porém a ação antibacteriana, antiviral, antioxidante, vasodilatadora, cicatrizante, imunomoduladora, anti-inflamatória e analgésica são atribuídas aos flavonoides, ácidos fenólicos e aos compostos aromáticos (7-8,12-14). As propriedades cicatrizantes da própolis incluem a redução da inflamação e da área fibrovascular; aumento da quantidade de colágenos tipo I e II; indução da reepitelização e estimulação da migração de queratinócitos (12,14-16).

O uso da associação do mel e da própolis em feridas está relacionado com a aceleração da cicatrização devido à diminuição da fase inflamatória e aumento da vascularização e do tecido de granulação no leito da lesão (17). Contudo, pesquisas relacionadas com a ação cicatrizante do mel e da própolis, isoladas ou associadas em feridas cutâneas são menos frequentes na literatura (17-19).

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a ação cicatrizante da associação do mel *in natura* e solução hidroalcoólica de própolis (5%) em excipiente lipofílico e hidrofílico em feridas cutâneas não contaminadas induzidas cirurgicamente, utilizando o rato Wistar como modelo experimental de curta duração. A hipótese é que essa associação em ambos os excipientes induza efeitos benéficos morfométricos, tensiométricos e histológicos em relação às feridas tratadas com solução salina (0,9%). Os resultados do presente estudo poderão ser utilizados como base para o uso em procedimentos terapêuticos na rotina clínico-cirúrgica em cães e gatos.

Material e métodos

Animais e ambiente de experimentação

A metodologia adotada no presente trabalho foi analisada e aprovada pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista (Unesp) – Botucatu, São Paulo (SP) (CEUA – nº 0177/2018). O estudo foi realizado na localização geográfica GPS: -22.890137, -48.497053.

Foram utilizados 48 ratos machos hípidos, espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, com 14 semanas de idade e massa corpórea entre 365 e 370 g. Os ratos foram adquiridos no Biotério Central, Unesp, Botucatu, SP, Brasil, sendo previamente submetidos aos protocolos de higiene determinados pelo biotério. Todos os animais foram tratados com ivermectina (1%) (Ivomec[®], Merial Saúde Animal, SP, Brasil) na quantidade de 0,1 mL diluída em 100 mL de água potável em bebedouro individual, a cada sete dias, durante 14 dias, antes de serem encaminhados para o local de experimentação.

O período de adaptação ao ambiente experimental foi de sete dias, e os ratos foram alocados individualmente em caixas de acrílico e receberam ração comercial para ratos (Presence[®], Purina) e água *ad libitum*. As caixas foram higienizadas com água e sabão a cada 48 horas. O ambiente manteve-se com umidade (30 – 40%) e temperatura (22° C) controlada e constante, e o ciclo de luz foi de 12 horas claro/escuro.

Aquisição do mel

O mel *in natura* foi adquirido do setor de apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (Unesp, Botucatu, SP, Brasil) (GPS: -22.8448301; -48.4309161). O mel de origem botânica silvestre teve na sua composição diferentes substâncias (Tabela 1), vitaminas, aminoácidos, proteínas e peróxido de hidrogênio, e o pH variou entre 3,78 a 4,68.

Tabela 1. Composição do mel *in natura*.

Componentes	Quantidade
Frutose (%)	27,30 - 44,30
Glicose (%)	22,00 - 40,80
Maltose (%)	2,70 - 16,00
Sacarose (%)	1,50 - 3,00
Cinzas (%)	0,07 - 0,51
Cálcio (mg/kg)	40,72 - 171,55
Enxofre (mg/kg)	29,11 - 172,73
Fósforo (mg/kg)	33,40 - 144,89
Magnésio (mg/kg)	15,91 - 68,09
Potássio (mg/kg)	293,15 - 1403,69
Sódio (mg/kg)	4,46 - 39,63
Cobre (mg/kg)	0,0161 - 0,0234
Ferro (mg/kg)	1,76 - 20,63
Zinco (mg/kg)	0,65 - 5,75

Preparação da solução hidroalcoólica de própolis (5%)

A própolis na sua forma bruta foi adquirida do mesmo local do mel no mês de março, sendo proveniente de Laranjais. Na sua composição incluiu o extrato seco (>11%), compostos fenólicos (>0,5%), flavonoides (>0,25%), di e triterpenos e óleos essenciais, e sua atividade antioxidante foi menor que 22 segundos (20-22).

A preparação da solução hidroalcoólica (5%) foi de acordo com a literatura (19,23). Para tal, foram usadas 30 g de raspado da própolis na sua forma bruta e misturada com 100 mL de álcool etílico (70%). A mistura permaneceu em descanso durante 24 horas, e posteriormente foi filtrada com papel filtro nº 103 formando o

extrato etanoico de própolis. Esse extrato foi diluído utilizando água de osmose reversa na proporção 0,5 mL de extrato etanoico com 9,5 mL de água formando a solução hidroalcoólica de própolis (5%).

Preparação da associação do mel in natura com a solução hidroalcoólica de própolis (5%) em excipientes lipofílico e hidrofílico

Para a associação do mel e da própolis foi realizado a mistura de 10 g do mel com 2 mL da solução hidroalcoólica de própolis (5%). Posteriormente, manipulou-se 50% da mistura com 50% do excipiente lipofílico ou hidrofílico, seguindo o padrão de proporção (1:1). O excipiente lipofílico foi formado pela lanolina (30%) e vaselina sólida (70%); e o excipiente hidrofílico pelo álcool estearílico (25%), vaselina branca (25%), propilenoglicol (12%), lauril sulfato de sódio (1%) e água (100%). As misturas com ambos os excipientes foram colocadas em frascos estéreis e mantidas refrigeradas a 10° C durante todo o período do estudo (Figura 1A e 1B). Paralelamente, foi realizado o exame microbiológico das misturas com os excipientes, no qual foi negativo para a presença de microrganismos.

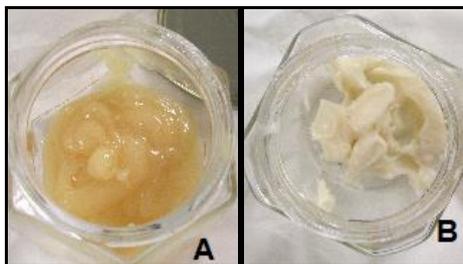


Figura 1. A - Mistura de mel *in natura* e solução hidroalcoólica de própolis (5%) em excipiente lipofílico e hidrofílico (B).

Procedimento experimental

Todos os animais foram submetidos ao protocolo anestésico com associação de xilazina 2% (Anasedan injetável 10 mL[®], Ceva Laboratório, SP, Brasil) (10 mg/kg) e cloridrato de cetamina 1% (Dopalen[®], Ceva Laboratório, SP, Brasil) (75 mg/kg), por via intraperitoneal. Posteriormente, foi realizada uma tricotomia desde a região atlanto-occipital até à base da cauda e antissepsia com clorexidina 2% (Riohex 2%[®], Rioquímica, SP, Brasil). Feridas de 3 cm de diâmetro foram realizadas com auxílio de um “*punch*” metálico no terço médio entre a distância da região atlanto-occipital e base da cauda. A pele e a gordura subcutânea foram removidas com auxílio de tesoura Metzemaum e pinça anatômica estéreis preservando a fáscia muscular. As feridas foram confeccionadas sempre pela mesma pessoa e devidamente paramentada.

Os ratos foram divididos aleatoriamente, usando o programa Randomizer[®] (versão 2018), em três grupos de 16 animais, de acordo com o tratamento: Grupo 1 (G1) - solução salina (0,9%), Grupo 2 (G2) - associação do mel *in natura* e solução hidroalcoólica de própolis (5%) em excipiente lipofílico; Grupo 3 (G3) - associação do mel *in natura* e solução hidroalcoólica de própolis (5%) em excipiente hidrofílico.

A periodicidade de aplicação da pomada foi determinada de acordo com análises isotópicas que tiveram como objetivo avaliar a absorção das pomadas na ferida. O método utilizado foi o de análise do valor isotópico de carbono, demonstrado pelo delta ($\delta^{13}\text{C}$) e calculado pela fórmula:

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{R_{amostra} - R_{padrão}}{R_{padrão}} \right) \times 1000 \text{ ‰}$$

$$R_{amostra} = \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \quad R_{padrão} = \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} = 0,01172$$

As coletas das amostras da ferida após a aplicação das misturas foram realizadas em diferentes momentos: imediatamente após aplicação; a cada hora durante oito horas; e 22, 48 e 72 horas após a aplicação. A análise demonstrou que nos primeiros 300 minutos ocorreu uma oscilação entre os valores isotópicos de carbono entre -22,0 ‰ e -26,0 ‰ e a partir desse momento o valor se estabilizou em torno de -22,0 ‰, e desse modo foi determinado aplicação das misturas a cada seis horas.

O tratamento de todos os grupos se iniciou logo após à confecção das feridas e foi realizado a cada seis horas: 6:00, 12:00, 18:00 e 00:00 horas, durante 14 dias, precedido pela limpeza das feridas superficialmente com gaze estéril umedecida em solução salina (0,9%) sem a remoção da crosta.

Nas feridas do G1, a solução salina (0,9%) foi aplicada na quantidade de 0,1 mL por meio de uma seringa de 1 mL estéril. As feridas do G2 e G3 foram submetidas ao tratamento com 0,1 g da associação do mel *in natura* e solução hidroalcoólica de própolis (5%) em excipiente lipofílico e hidrofílico, respectivamente, utilizando uma espátula de madeira estéril.

A ingestão de alimento e água, e observação do estado geral dos animais foi realizada a cada 12 horas. As feridas permaneceram sem curativo durante todo o período de estudo e não foi administrado nenhum antibiótico, anti-inflamatório ou analgésico.

Oito ratos de cada grupo foram selecionados aleatoriamente e submetidos às biopsias excisionais das feridas após eutanásia com tiopental sódico (Thiopentax[®], Cristália laboratórios, SP, Brasil) (120 mg/kg) associado com lidocaína 2% sem vasoconstritor (Xilocaina[®], Hipolabor, SP, Brasil) (7 mg/kg), por via intraperitoneal. A eutanásia foi realizada em dois momentos distintos: sete (7POS) e 14 dias após início dos tratamentos (14POS). As feridas foram excisadas com margem de no mínimo 2 cm

de pele íntegra em torno da lesão, e em profundidade até à fáscia muscular. Do total do diâmetro da ferida, 50% foram utilizados para avaliação histológica e 50% para avaliação da tensão cicatricial da ferida.

Avaliação clínica

As variáveis avaliadas incluíram a massa corpórea (MC), temperatura corpórea (TC) e os parâmetros macroscópicos. A MC foi mensurada 24 horas antes da indução das feridas cutâneas (24hPRE), 7POS e 14POS utilizando-se uma balança digital de bancada com divisão de 2 g a 6,0 kg (Toledo Pnix3 FIT[®], Toledo Brasil, SP, Brasil). A TC foi aferida por meio de um termômetro digital (MC-246-BRV[®], Omron, SP, Brasil), cinco minutos antes da indução das feridas e a cada 24 horas durante 14 dias.

As feridas foram avaliadas macroscopicamente pela presença ou ausência de crosta, pus e tecido de granulação. Para a análise estatística as variáveis crosta e tecido de granulação foram classificadas com um escore semi-quantitativo de acordo com a intensidade em leve (grau 1), moderada (grau 2) e intensa (grau 3). A variável pus foi classificado como ausente e presente. Os momentos avaliados foram: terceiro dia após o início dos tratamentos (3POS), 7POS, 10º dia (10POS) e 14POS.

“Swabs” estéreis das feridas de todos os grupos foram coletados no 3POS e no 7POS e enviados para realização de exames microbiológicos.

Avaliação morfométrica

Os parâmetros avaliados na mensuração das feridas incluíram a área, contração e profundidade, e seus valores foram determinados em dois momentos distintos: 7POS e 14POS. Todos os animais tiveram suas feridas fotografadas por câmera digital (Canon[®]

PowerShot sx160 is, Canon do Brasil Indústria e Comércio, São Paulo, Brasil) e o software *Image J*[®] foi usado para mensurar a área das feridas.

O grau de contração foi realizado de acordo com a fórmula:

$$\frac{(\text{área inicial} - \text{área do dia da medida})}{\text{área inicial}} \times 100$$

As mensurações das profundidades das feridas foram realizadas por meio de exames tomográficos após a eutanásia. Para tal, foi usado um tomógrafo helicoidal modelo SCT 7800 de 1 canal (Shimadzu[®], Shimadzu Brasil, São Paulo, Brasil), e os fatores de exposição utilizados foram de 120 kV e 80 mA. Para realização do exame, os ratos foram fixados na calha de espuma em decúbito ventral. Em seguida, foram obtidas secções transversais com 2 mm de espessura e de incremento (FOV 10 cm). A reconstrução das imagens foi realizada pela Reformatação Multi-planar (MPR) e, em seguida, o software Synapse Pacs[®] (Program System, Fujifilm, Tóquio, Japão) foi utilizado para mensurar a profundidade da lesão pelo diâmetro dorsoventral obtido no corte transversal (Figura 2).



Figura 2. Determinação da profundidade da ferida pelo diâmetro dorsoventral obtido no corte tomográfico transversal.

Avaliação tensiométrica

A avaliação da força tensil máxima ou força de ruptura (FTM) e da deformidade máxima (DM) foi realizada nos seguintes momentos: 7POS e 14POS. Após as eutanásias, amostras teciduais retangulares contendo a ferida e com pelo menos 2 cm de tecido sem a lesão em cada extremidade foram envolvidas em gaze estéril embebida em solução salina (0,9%) e imediatamente foram submetidos à avaliação tensiométrica.

As amostras foram fixadas numa máquina de teste mecânico universal (EMiC[®], Instron Brasil Equipamentos Científicos Ltda, São José dos Pinhais, Paraná) por meio de prensas, a uma distância de 1,0 cm de cada lado da extremidade da amostra, deixando uma área livre de 1,0 cm da ferida (Figura 3). O ensaio foi realizado no sentido vertical, onde a porção inferior do equipamento era imóvel e a porção superior móvel. Foi usada uma velocidade de tração constante de 20 mm/segundo e célula de carga na faixa de 1 a 50 N com uma resolução de leitura 0,01 N, e os valores da FTM e DM foram avaliados no software Mtest[®].

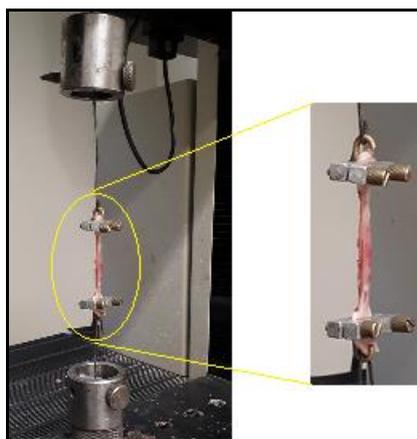


Figura 3. Teste tensiométrico (EMiC[®], Instron Brasil Equipamentos Científicos Ltda, São José dos Pinhais, Paraná).

Avaliação histológica

Os espécimes foram colocados em frascos de formaldeído 10% tamponado por 24 horas e, posteriormente mantidas em álcool 70% até a inclusão em parafina. Cortes de 5 μ m foram obtidos nas amostras, e os fragmentos foram corados pelos métodos de hematoxilina-eosina (H&E) para avaliação geral do tecido. As lâminas foram observadas no microscópio ótico (Zeiss®, Axio Lab A 1, Alemanha), com objetivas de 10x e 40x, sendo que 10 áreas foram observadas e avaliadas, e as imagens foram registradas por fotomicrografia utilizando o programa analisador de imagem (Axio Vision Rel4.8).

Para a análise estatística as variáveis que incluíram o infiltrado celular inflamatório (intensidade e característica celular), a vascularização e os fibroblastos foram classificadas com um escore semi-quantitativo de acordo com a quantidade em leve (grau 1), moderada (grau 2) e intensa (grau 3). Quanto à distinção das camadas superficial e profunda da derme, classificou-se como ausente ou presente.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no software R no ambiente de desenvolvimento integrado RStudio (Version 1.0.143 – © 2009-2016, RStudio, Inc.). Para análise estatística dos dados macroscópicos em cada um dos grupos foi empregada a análise de variância (ANOVA) para amostras repetidas, com contrastes pelo método de Tukey e teste de Kolmogorov-Smirnov. Para avaliação entre momentos foi usado teste de Friedman (função “friedman.test” do pacote “stats”) para as variáveis que não obedeceram às características da normalidade. Para que os empates no ranking estabelecido pelo teste de Friedman não influenciassem nos resultados, o valor de

probabilidade de rejeição da hipótese nula foi corrigido com o procedimento de taxa de descoberta falsa (função “*pairwiseSignTest*” do pacote “*rcompanion*”).

Para comparação entre os grupos, em cada momento avaliado, empregou-se a análise de variância para amostras independentes (ANOVA One way) para dados normais, e teste de Kruskal-Wallis (função “*kruskal*” do pacote “*agricolae*”) para variáveis fora das condições da normalidade. Diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$. Com relação aos dados histológicos empregaram-se os teste qui-quadrado e teste exato de Fisher. Diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$.

Resultados

Avaliação clínica

As feridas do grupo G2 apresentaram crosta fina e aspecto seco ao contrário do G3. Não foi observado variação estatística da MC e da TC entre os grupos e momentos avaliados. A MC variou entre 365,0 e 394,5 g ($379,8 \pm 32$ g) e a TC entre 36,1 e 39,1° C ($36,7 \pm 0,5^\circ$ C) mantendo-se dentro dos padrões de referência da espécie.

Durante o estudo não foi verificado óbito, autotraumatismo e sinais clínicos de contaminação ou infecção das feridas. Os “*swabs*” estéreis das feridas do G2 e G3 não apresentaram crescimento bacteriano e fúngico. Porém, nas feridas do G1 foi identificado *Pseudomonas aeruginosa* no momento 3POS.

Na avaliação macroscópica não foram observadas diferenças significativas nas variáveis crosta e tecido de granulação em todos os grupos nos momentos avaliados (Tabela 2). A evolução do processo cicatricial foi apresentada na figura 2.

Tabela 2. Parâmetros macroscópicos das feridas do G1, G2 e G3 avaliadas no 3POS, 7POS, 10POS e 14POS.

Variáveis/Grupos	3POS	7POS	10POS	14POS
Crosta				
G1 (n = 8)	2	1	0	0
G2 (n = 8)	2	1	0	0
G3 (n = 8)	2	1	0	0
Pus				
G1 (n = 8)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
G2 (n = 8)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
G3 (n = 8)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Tecido de granulação				
G1 (n = 8)	1	2	1	1
G2 (n = 8)	1	2	1	1
G3 (n = 8)	1	1	1	0

*Classificação das variáveis crosta e tecido de granulação: ausente (grau 0), leve (grau 1), moderada (grau 2) e intensa (grau 3). Classificação da variável pus: ausente e presente.

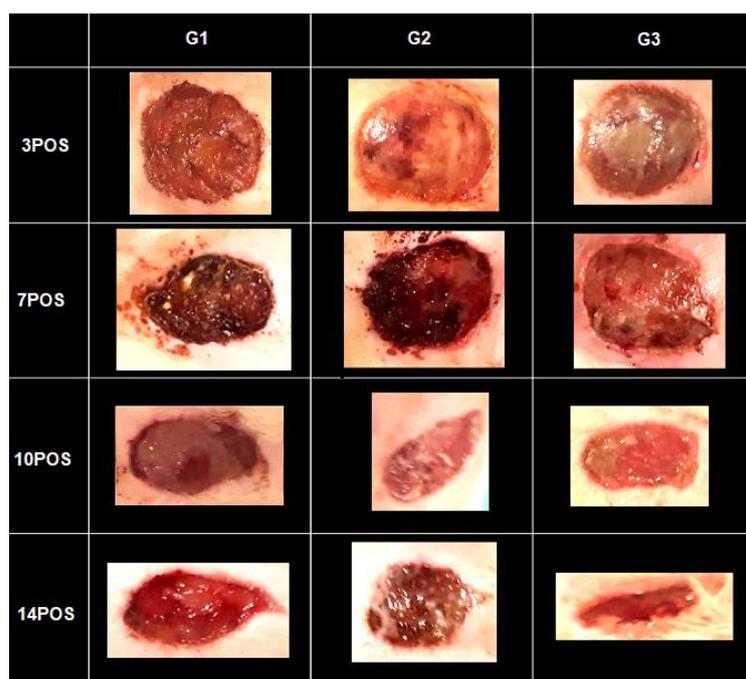


Figura 2. Evolução do processo cicatricial do G1, G2 e G3 nos momentos: 3POS, 7POS, 10POS e 14POS.

Avaliação morfométrica e tensiométrica

Em relação às áreas e profundidade das feridas foi observada uma diminuição significativa ($p < 0,05$) e um aumento significativo ($p < 0,05$) das contrações em todos os grupos entre os momentos 7POS e 14POS (Tabela 3). Foi verificado um aumento significativo ($p < 0,05$) nos valores da FTM e diminuição significativa da DM em todos os grupos entre o sétimo dia e 14º dia de pós-operatório (Tabela 3).

Tabela 3. Mediana (Med) e amplitude (mínima - min e máxima - max) dos valores das áreas, contrações, profundidades, FTM e DM do G1, G2 e G3 avaliados nos momentos: 7POS e 14POS.

Variáveis	7POS Med (min - max)	14POS Med (min - max)
Área (cm ²)		
G1 (n = 8)	7,50 ^a (5,700 – 9,10)	3,50 ^b (2,90 – 5,40)
G2 (n = 8)	8,90 ^a (7,10 – 9,70)	4,10 ^b (3,00 – 6,00)
G3 (n = 8)	8,0 ^a (6,50 – 11,90)	4,00 ^b (1,20 – 5,60)
Contração (%)		
G1 (n = 8)	47,50 ^b (38,00 – 51,00)	74,50 ^a (62,00 – 78,00)
G2 (n = 8)	35,00 ^b (34,00 – 61,00)	71,00 ^a (60,00 – 79,00)
G3 (n = 8)	41,50 ^b (21,00 – 63,00)	71,50 ^a (64,00 – 91,00)
Profundidade (mm)		
G1 (n = 8)	1,19 ^a (0,62 – 1,51)	0,75 ^b (0,46 – 0,84)
G2 (n = 8)	0,99 ^a (0,46 – 1,16)	0,65 ^b (0,47 – 1,09)
G3 (n = 8)	0,74 ^a (0,47 – 1,58)	0,66 ^b (0,47 - 1,09)
FTM (N)		
G1 (n = 8)	2,14 ^b (1,16 – 3,50)	5,91 ^a (1,07 – 8,05)
G2 (n = 8)	4,29 ^b (2,56 – 6,71)	5,13 ^a (3,21 – 7,19)
G3 (n = 8)	2,42 ^b (0,89 – 5,40)	5,93 ^a (1,07 – 8,05)
DM (mm)		
G1 (n = 8)	10,25 ^a (6,63 – 14,19)	5,19 ^b (3,09 – 6,61)
G2 (n = 8)	11,18 ^a (5,26 – 20,02)	4,79 ^b (3,98 – 7,82)
G3 (n = 8)	8,86 ^a (4,71 – 16,37)	5,23 ^b (3,09 – 6,61)

*Medianas seguidas por letras minúsculas representaram diferença significativa ao longo dos tratamentos ($p < 0,05$).

Avaliação histológica

Na comparação entre os grupos foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação a intensidade do infiltrado celular inflamatório entre o G1 e G2 ($G1 > G2$) e G3 e G2 ($G3 > G2$) em todos os momentos avaliados. Paralelamente, no G2 foi identificado uma diferença significativa da característica do infiltrado celular inflamatório misto (neutrófilos e monócitos) para infiltrado celular mononuclear entre o 7POS e 14POS. Contudo, as feridas do G1 e G3 mantiveram um infiltrado inflamatório misto em ambos os momentos.

Com relação à neovascularização e presença de fibroblastos, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos e entre os momentos. Nas feridas do G1 e G3 foi observado uma intensidade moderada de neovascularização e presença de fibroblastos, contudo nas feridas do G2 verificou-se uma intensidade leve, em ambos os momentos (7POS e 14POS).

As feridas do G2 apresentaram distinção das camadas dérmicas em ambos os momentos, porém essa distinção foi observada no G1 e G3 somente 14 dias após o início dos tratamentos. Na figura 3 foram ilustradas as lesões nos exames histológicos das feridas cutâneas 14 dias de pós-operatório.

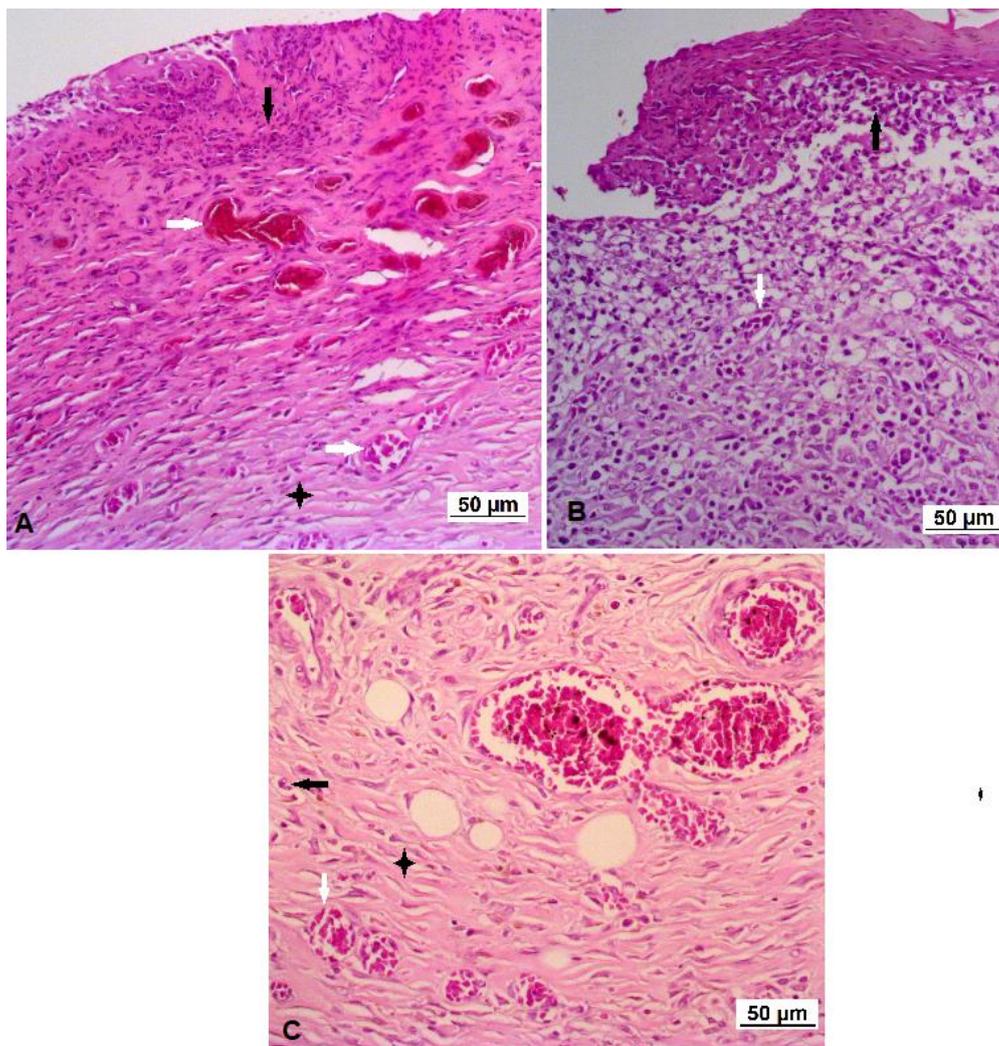


Figura 3. Lesão histológica das feridas do G1 (A) e G3 (C) com presença de infiltrado inflamatório misto (células polimorfonucleares e mononucleares) intenso (setas pretas), neovascularização moderada (setas brancas) e presença de fibroblastos com colágeno em padrão linear (estrela preta); e das feridas do G2 (B) evidenciando infiltrado inflamatório mononuclear moderado (seta preta) e neovascularização leve (seta branca) [H&E].

Discussão

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da associação do mel *in natura* e solução hidroalcoólica de própolis (5%) com excipiente lipofílico ou hidrofílico na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar, enfatizando a evolução macroscópica e histológica, e a resistência à tração do tecido cicatricial. A associação do mel *in natura* e solução hidroalcoólica de própolis a 5% em excipiente lipofílico demonstrou efeitos cicatrizantes benéficos na avaliação histológica comprovando parcialmente a hipótese inicial. O uso da tomografia computadorizada para avaliação objetiva da profundidade das feridas, e dos isótopos estáveis para a determinação de frequência de aplicação dos produtos tornou o presente estudo inédito visto que até o momento desconhece-se o seu uso em estudos similares.

A utilização de protocolos terapêuticos em feridas tem como objetivo diminuir o tempo de oclusão e melhoria na qualidade do tecido cicatricial final, e assim evitando possíveis complicações, como as contaminações e infecções (2,24-25). Nesse contexto, a terapia de cicatrização por meio de produtos naturais está associada com os seus efeitos colaterais mínimos, carência de risco de poluição ambiental associado ao descarte de resíduos químicos (3) e diminuição de uso de antibióticos visto que o mel e a própolis possuem efeito antimicrobiano (28-29,41), conforme observado no presente estudo.

O mel e a própolis são substâncias produzidas pelas abelhas da espécie *Apis mellifera* e usadas no tratamento de feridas devido às suas propriedades anti-inflamatória, aumento da vascularização e do tecido de granulação no leito da lesão, imunomoduladora, antioxidante e antimicrobiana (4,15,26-28).

A ação terapêutica do mel e da própolis é afetada pela localização geográfica da planta, estação de coleta e a espécie de abelha (11,20,22). Ambos os produtos utilizados no presente estudo foram adquiridos na região Pólo Cuesta do município de Botucatu, São Paulo, Brasil, garantindo a padronização, homogeneidade química e qualidade físico-química (12,16,20-22,29).

O mel teve na sua composição alta concentração de frutose, glicose, maltose e sacarose; vitaminas, aminoácidos, proteínas e peróxido de hidrogênio, e o pH variou entre 3,78 a 4,68. Essas substâncias garantiram as propriedades cicatrizantes, antimicrobianas e antioxidante do mel (4-6,14,30-31). Por sua vez, na composição da própolis incluiu os compostos fenólicos com concentração maior que 0,5%, flavonoides acima de 0,25% e atividade antioxidante menor que 22 segundos, conferindo a sua ação cicatrizante, antioxidante e antimicrobiana (14,32).

Efeitos cicatrizantes significativos foram observados com o uso de diferentes concentrações etanoicas da própolis (33-35), mesmo quando associados ao mel (17,19). Os excipientes monofásicos usados no presente estudo não apresentaram ação terapêutica, e suas propriedades foram associadas à conservação e estabilização dos produtos (36). A ausência de ação cicatrizante dos excipientes foi comprovada por meio de estudo piloto utilizando a mesma metodologia do presente estudo, e não foram observadas diferenças significativas morfométricas e morfológicas e entre os grupos testados e grupo controle.

Os exames microbiológicos não identificaram presença de microrganismos nas feridas do G2 e G3. Contudo, nas feridas do G1 foi identificado a presença *Pseudomonas aeruginosa* no terceiro dia de pós-operatório. Esse microrganismo é considerado oportunista, ou seja, raramente causa afecções em um sistema imunológico saudável (37). A ausência de sinais macroscópicos de contaminação ou infecção e

exames microbiológicos negativo no G2 e G3 associada à ausência de variação significativa da temperatura corporal e da massa corpórea confirmou a ação antimicrobiana profilática da associação do mel *in natura* e da solução hidroalcoólica da própolis (5%). A propriedade antimicrobiana do mel foi associada à presença de peróxido de hidrogênio que induz um pH ácido no leito da ferida e liberação de fatores oxidantes conferindo sua propriedade antioxidante; à concentração de açúcares que determina uma alta osmolaridade na lesão; e à imunomodulação (4,28,38-39). O efeito antibacteriano da própolis foi relacionado com a presença dos flavonoides, ácidos e ésteres (32,40-41).

Ao se avaliar os valores das áreas das feridas verificou-se que todos os grupos apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) entre o 7POS e 14 POS, sendo que o G1 apresentou menor área durante as avaliações e os valores das áreas do G2 e G3 foram similares em ambos os momentos. Esses achados foram similares com a porcentagem de contração das feridas, ou seja, ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) da porcentagem ao longo dos tratamentos em todos os grupos. A maior contração foi observada nas feridas do G1 e menor contração nas feridas do G2 e G3.

A mensuração da profundidade das feridas foi realizada por meio de exames tomográficos visto ser mais objetivo em relação ao paquímetro. A pesquisa bibliográfica realizada pelos autores revelou a ausência de uso da tomografia computadorizada na avaliação da profundidade de feridas cutâneas, tornando o método inovador e inédito para o campo de pesquisa sobre a cicatrização. Com relação aos valores da profundidade das feridas foi observado uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em todos os grupos ao longo dos momentos avaliados. Sete dias após o início dos tratamentos (7POS) as feridas do G3 apresentaram menor profundidade em relação às feridas do G1 e G2; e no 14º dia de pós-operatório os grupos G2 e G3 apresentaram

valores similares e menores quando comparado com o grupo G1. Esse fato foi associado à ação da associação do mel e da própolis na formação exagerada do tecido de granulação no estudo visto que a menor profundidade de ferida está associada à maior granulação, e assim, pode ocorrer o atraso da contração na fase de remodelação (1,42). Desse modo, sugeriu-se que macroscopicamente as feridas tratadas com a associação do mel *in natura* e solução hidroalcoólica de própolis (5%) em excipiente lipofílico e hidrofílico atuaram de forma negativa na ferida até 14 dias após o início dos tratamentos, corroborando com a literatura no que diz respeito no uso da pomada de própolis (24). Efeitos positivos macroscópicos foram verificados na cicatrização de feridas cutâneas de ratos Wistar por meio de associação do mel com solução hidroalcoólica de própolis (10%) ou com solução hidroalcoólica de própolis (5%) (17,19).

Os testes tensiométricos são considerados padrão-ouro na avaliação do processo de cicatrização, porém fornece resultados mais fidedignos na fase de remodelação (43). Nas primeiras duas semanas do processo cicatricial, a resistência da cicatriz é diretamente proporcional à quantidade de colágeno depositada no leito da ferida (43,44). Contudo, no início da cicatrização, o tecido cicatricial é mais delicado e sua resistência tensil é menor e depende da capacidade de sustentação das suas bordas (45).

Ao longo dos momentos foi possível verificar um aumento significativo dos valores da FTM e uma diminuição significativa dos valores da DM em todos os grupos entre 7POS e 14POS, conferindo o aumento da tensão entre as fibras colágenas. No sétimo dia de pós-operatório foi observado maior valor da FTM nas feridas do G2 e menor valor da DM no G3. Após 14 dias do início dos tratamentos o G1 e G3 apresentaram valores similares da FTM e maiores em relação ao G2. Campos et al. (1) relacionaram o aumento dos valores da FTM e diminuição da DM com a fase

proliferativa. Os mesmos autores afirmaram que a característica qualitativa da ferida depende do colágeno III que mais tarde é reabsorvido e um colágeno mais espesso e organizado ao longo das linhas de tensão, refletindo em aumento da força tensil da ferida.

Para além da capacidade do mel em remover microrganismos que causam inflamação e atrasam a cicatrização, ele possui propriedades anti-inflamatórias diretas, como a redução do infiltrado inflamatório, do edema e do exsudato e, conseqüentemente, redução da fase inflamatória (46). Por sua vez, os flavonoides presentes na própolis agem como potencial anti-inflamatório pelo bloqueio da liberação dos mediadores inflamatórios pelos mastócitos e, assim, inibem a inflamação (47).

As fases inflamatória e proliferativa corresponderam com o primeiro e segundo momento de avaliação histológica, 7POS e 14POS, embora se deva considerar a sobreposição das fases de cicatrização (2). Durante a fase inflamatória ocorre uma resposta vascular e presença de células inflamatórias, predominantemente neutrófilos e macrófagos derivados dos monócitos (2,42). Por sua vez, a fase proliferativa é caracterizada pela formação do epitélio, neovascularização e tecido de granulação (1,42).

Durante a avaliação da intensidade do infiltrado inflamatório foram verificadas diferenças significativas em todos os momentos avaliados, sendo que os grupos G1 e G3 apresentaram um infiltrado intenso (grau 3) em relação ao G2 que demonstrou um infiltrado moderado (grau 2). Esse fato associado à manutenção de infiltrado inflamatório misto nas feridas do G1 e G3 no 14POS; e a distinção das camadas dérmicas no G2 em ambos os momentos, confirmou-se que histologicamente as feridas do G2 obtiveram melhor efeito cicatrizante. Diferentemente, na literatura não foram observadas diferenças significativas em relação à intensidade e característica do

infiltrado inflamatório nas feridas cutâneas de ratos Wistar tratadas com a mistura do mel *in natura* e solução hidroalcoólica de própolis (5%) (19).

Todos os grupos apresentaram uma neovascularização e presença de fibroblastos leve e moderada no 7POS e 14POS, contribuindo com a ausência de efeitos benéficos das pomadas nesta fase de cicatrização, corroborando com a literatura (19). Uma vascularização intensa estimula a oxigenação e formação do tecido de granulação e, conseqüentemente, acelera a cicatrização (46,48). Na fase proliferativa, o mel induz a proliferação das células epiteliais e a neovascularização por meio do peróxido de hidrogênio e sua propriedade semelhante à insulina (17,49). O aumento da neovascularização induz a maior disponibilidade dos nutrientes e oxigênio para as células fibroblástica, e o pH ácido do meio estimula a liberação do oxigênio da hemoglobina (50). Por sua vez, a presença dos flavonoides na própolis estimula a granulação tecidual e ao aumento da quantidade de colágenos tipo I e II, e desse modo auxiliando na contração mais rápida da ferida (14-16).

A escassez no que diz respeito à informação sobre a dose e efetividade clínica da própolis na cicatrização de feridas faz com que a sua eficácia seja variável (14). A principal limitação do estudo foi a ausência de grupo experimental de feridas tratadas com a associação do mel e da própolis sem incorporação dos excipientes. Neste contexto, futuros estudos devem ser realizados com mais um grupo experimental. O uso da tomografia computadorizada na avaliação da profundidade das feridas e dos isótopos estáveis na determinação da frequência de aplicação dos produtos devem ser repetidos em futuros estudos para que haja uma padronização na metodologia.

Conclusões

Histologicamente, a associação do mel *in natura* e solução hidroalcoólica de própolis (5%) em excipiente lipofílico demonstra ter maior efeito benéfico na cicatrização de feridas cirúrgicas cutâneas não contaminadas de ratos Wistar num período de avaliação de 14 dias. Paralelamente, a associação de ambos os produtos em excipiente lipofílico ou hidrofílico apresentam efeitos antimicrobianos.

Agradecimentos: Os autores agradecem à Unidade de Pesquisa Experimental (Unipex), Faculdade de Medicina, Unesp, Botucatu, e ao Luiz Carlos Edevalter Bardella pela realização dos testes tensiométricos; ao setor dos Isótopos Estáveis, Instituto de Biociências (IBB), Unesp, Botucatu; e ao setor de Diagnóstico por Imagem (FMVZ, Unesp, Botucatu).

Referências

1. Campos ACL, Branco AB, Groth AK. Cicatrização de feridas. ABCD Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva 2007;20(1):51-8.
2. Oliveira IVPM, Dias RVC. Cicatrização De Feridas: Fases e fatores de influência. Acta Veterinária Brasília 2012;6(4):267-271.
3. Ponte FLR. Toxicidade pre-clínica de fitotetrapicos a base de mel de abelha, própolis e extrato de *Mikania Glomerata*. *Eucalyptus Globus* ou a Associação *Zingiber Officinale* e *Allinum Sativum* em Roedores. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco-CCB. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, 2003.

4. Escobar ALS, Xavier FB. Propriedades fitoterápicas do mel de abelhas. *Revista Uningá* 2013;37:159-172.
5. Burlando B, Cornara L. Honey in dermatology and skin care: a review. *Journal of Cosmetic Dermatology* 2013;12(4):306-311.
6. Aristizabal AS, Hayashi AM, Matera JM. Uso do mel orgânico tópico no tratamento de queimadura de terceiro grau em cão: relato de caso. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária* 2016;14(1):12-17.
7. Pereira Filho JS, Bicalho L, Silva DA. Uso de própolis associada a outros componentes no tratamento de feridas oncológicas após excisão. *Acta Biomédica Brasiliensia* 2012;3(2):111-119.
8. Paixão DR, Flausino PA, Reis NG, Lima GC, Bernardes, MTCP, Santos L, Garcia JAD. Efeitos da própolis na proliferação de fibroblastos em lesões cutâneas de ratos. *Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 2014;35(3):413-417.
9. Buriol L, Schmidt EM, Rosa MR, Torres Y, Pessoa C, Lotufo LVC, Finger D, Santos JMST, Perucio S, Santa HD, Moraes MO, Ferreira PMP. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. *Química Nova* 2009;32(2):296-302.
10. Cabral ISR, Oldoni TLC, Prado A, Bezerra RMN, Alencar SM. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova* 2009;32(6):1523-1527.
11. Bezerra KKS, Bezerra AMF, Sousa LCFS, Sousa JS, Silva RA, Borges MGB. Atividade antimicrobiana da própolis em lesões cutâneas. *Agropecuária Científica no Semi-Árido* 2013;9(1):17-23.

12. Pereira RF, Bártolo PJ. Traditional therapies for skin wound healing. *Advances in Wound Care* 2016;5(5):208-229.
13. Garraud O, Hozzein WN, Badr G. Wound healing: time to look for intelligent, 'natural' immunological approaches. *BMC Immunology* 2017;18:39-65.
14. Oryan A, Alemzadeh E, Moshiri A. Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. *Biomedical Pharmacotherapy* 2018;98:469-483.
15. Pinto LMA, Prado NRT, Carvalho L. Propriedades, usos e aplicações da própolis. *Revista Eletrônica De Farmácia* 2011;8(3):76-100.
16. Pasupuleti V. R.; Sammugam L.; Ramesh N.; Gan S. H. Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017;20:1-21.
17. Takzaree N, Hadjiakhondi A, Hassanzadeh G, Rouini MR, Manayi A. Synergistic Effect of Honey and Propolis on Cutaneous Wound Healing in Rats. *Acta Medical Iranica* 2016;54(4):233-239.
18. Rahal SC, Bracarense APFRL, Tanaka CY, Grillo TP, Leite CAL. Utilização de própolis ou mel no tratamento de feridas limpas induzidas em ratos. *Archives of Veterinary Science* 2003;8(1):61-67.
19. Maciel DMAD, Rahal SC, Santos IFC, Alves CEF, Sampaio ABA, Nagai LR, Camargo BWDF, Salewski GC. Healing of Skin Wounds in Rats: Influence of Low-Level Laser Therapy, Alone or Combined with Natural Products. *Acta Scientiae Veterinariae* 2020;48:e1729.
20. Mani F, Damasceno HC, Novelli EL, Martins EA, Sforcin JM. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. *Journal of Ethnopharmacology* 2006;105(2):95-98.

21. Souza EA, Inoue HT, Gomes SMA, Funari SRC, Orsi RO. Propriedade físico-química da própolis em função da sazonalidade e método de produção. *Archivos de Zootecnia* 2010;59(228):571-576.
22. Ito EH, Araújo WLP, Shinohara AJ, Barros DCB, Camilli MP, Orsi RO. Características Físico-Química Dos Méis De Abelhas *Apis Mellifera* Produzidos na região do Polo Cuesta. *Indústria Animal, Nova Odessa* 2018;75:1-9.
23. Berretta AA, Nascimento AP, Bueno PC, et al. Propolis standardized extract (EPP AF[®]), an innovative chemically and biologically reproducible pharmaceutical compound for treating wounds. *International Journal of Biological Sciences* 2012;8(4):512-21.
24. Rocha CBJ, Reis NS. Estudo comparativo do efeito de glicosaminoglicanas ácidas sulfatada (Hirudóid) e não-Sulfatada (ácido hialurônico) e da própolis sobre a cicatrização da pele de ratos albinos. *Revista Científica da Universidade de Franca* 2005;5(1/6):101-109.
25. Mörschbacher PD, Lamberts M, Tuane NAG, Emerson AC. Uso de membrana biológica de hemicelulose (VELODERM) e pomada de calêndula (*Calendula officinalis*) como adjuvante na cicatrização músculo-cutânea em um cão. *Veterinária e Zootecnia* 2011;18(3):366-370.
26. Sell SA, Wolfe PS, Spenc AJ, et al. A preliminary study on the potential of manuka honey and platelet-rich plasma in wound healing. *International Journal of Biomaterials* 2012;20(12):313-321.
27. Raynaud A, Ghezali L, Gloguen V, et al. Honey-induced macrophage stimulation: AP-1 and NF- κ B activation and cytokine production are unrelated to LPS content of honey. *International Immunopharmacology* 2013;17(3):874-9.

28. Yaghoobi R, Kazerouni A, Kazerouni O. Evidence for clinical use of honey in wound healing as an anti-bacterial, anti-inflammatory anti-oxidant and anti-viral agent: A review. *Jundishapur Journal Natural Pharmaceutic Products* 2013;8(3):100-4.
29. Ibrahim N, Wong SK, Mohamed IN, Mohamed N, Chin KY, Ima Nirwana S, Shuid AN. Wound healing properties of selected natural products. *International Journal Environmental Research and Public Health* 2018;15(11):1-23.
30. Khan F, Hill J, Kaehler S, Allsopp M, Van Vuuren S. Antimicrobial properties and isotope investigations of South African honey. *Journal of Applied Microbiology* 2014;117(2):366-79.
31. Cooke J, Dryden M, Patton T, Brennan J, Barrett J. The antimicrobial activity of prototype modified honey that generate reactive oxygen species (ROS) hydrogen peroxide. *BMC Research Notes* 2015;8(1):20.
32. Barbosa MH, Zuffi FB, Maruxo HB, Jorge LLR. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. *Acta Paulista de Enfermagem* 2009;22(3):318-322.
33. Batista EKF, Batista MCS, Sobrinho JAN, Trindade HI, Silva LLB, Muller JBBS. Influência da própolis sobre os perfis leucocitário e proteico de camundongos e tempo de fechamento de feridas excisionais limpas e infectadas por *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 2015;17(3):413-419.
34. Rocha RL, Miranda JL, Lima NL, Pereira FO, Marinho SA, Verli FD. Effect of tropical própolis and dexamethasone on the healing of oral surgical wounds. *Wound Healing Southern Africa* 2012;25(1):25- 30.

35. Peruchi CMS, Silva EB, Andrade RA, Franco SL, Ramatho LTO. Efecto del propóleos en la cicatrización de lesiones subcutáneas inducidas en el dorso de ratones: estudio histológico. Revista de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile 2001;19(2):23-34.
36. INFARMED. Farmacopeia portuguesa. Infarmed, Lisboa 2009;9(9):371.
37. Henriques A. Mel: Um milagre da natureza para o tratamento de feridas School of Applied Sciences; University of Wales Institute. Wales, Cardiff, UK, 2004; 32: 98-101.
38. Simon A, Traynor K, Santos K, Blaser G, Bode U, Molan P. Medical honey for wound care--still the 'latest resort'? Evidence Based Complementary Alternative Medicine. 2009;6(2):165-73.
39. Ai-Waili NS, Salom K, Butler G, Al Ghamdi AA. Honey and microbial infections: a review supporting the use of honey for microbial control. Journal of Medicinal Food. 2011;14(10):1079-96.
40. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. Journal of Ethnopharmacology 1999;64(3):235-40.
41. Ai-Waili NS, Al-Ghamdi A, Ansari M, et al. Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* isolates in single and polymicrobial cultures. International Medicine Science 2012;9(9):793-800.
42. Mendonça RJ, Netto JC. Cellular aspects of wound healing. Anais Brasileiros de Dermatologia 2009;84(3):257-62.

43. Ehrlich HP, Keefer KA, Maish GO, Myers RL, Mackay DR. Vanadate ingestion increases the gain in wound breaking strength and leads to better organized collagen fibers in rats during healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2001;107(2):471-7.
44. Matayoshi S, Hanaoka BY, Osaka J, Tolosa EMC, Margarido N F. Comportamento biomecânico da pálpebra reconstruída. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 2007;34(1):31-4.
45. Alberti LR, Vasconcellos LS, Petroianu A. Resistência cicatricial cutânea sob efeito de hidrocortisona local ou sistêmica, em distintos períodos pós-operatórios. *Einstein* 2008;6(3):269-73.
46. Molan PC. A brief review of the use of honey as a clinical dressing. *Journal of the Australian Wound Management Association* 1998;6(4):148-58.
47. Volpert R, Elstner EF. Biochemical activities of propolis extracts. I. Standardization and antioxidative properties of ethanolic and aqueous derivatives. *Zeitschrift für Naturforschung C* 1993;48(11-12):851-7.
48. Lima LD, Andrade SP, Campos PP, et al. Brazilian green propolis modulates inflammation, angiogenesis and fibrogenesis in intraperitoneal implant in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014;14(1):177
49. Tonks AJ, Dudley E, Porter NG, Parton J, Brazier J, Smith EL, et al. A 5.8-kDa component of manuka honey stimulates immune cells via TLR4. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007;82(5):1147-55
50. Majtan J. Honey: an immunomodulator in wound healing. *Wound Repair Regeneration* 2014;22(2):187-92.

ANEXOS

Anexo 1.

	UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"	 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Campus de Botucatu
---	---	---

ATESTADO

Atesto que o Projeto "AVALIAÇÃO DA AÇÃO CICATRIZANTE DA POMADA A BASE DE MEL E SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA DE PRÓPOLIS 5% EM FERIDAS CUTÂNEAS INDUZIDAS CIRURGICAMENTE EM RATOS WISTAR" **Protocolo CEUA 0177/2018**, a ser conduzido por Marina Paiva Branco, responsável/orientador Ivan Felismino Charas dos Santos, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	17/09/2018 a 17/12/2018
Nome Comum / Espécie / Linhagem	ROEDOR / RATTUS NOVERGICUS / Heterogênica
Raça	Wistar
Nº de animais machos	48
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	400 gr
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	0 ano(s) e 3 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Biotério Central

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 14/11/2018

SÚMULA CURRICULAR

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/8272128768233872>

1) Formação acadêmica/titulação

2018 - 2019 - Mestrado em Biotecnologia Animal. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, FMVZ - UNESP, São Paulo, Brasil.

2013 - 2017 Graduação em Medicina Veterinária. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, FMVZ - UNESP, São Paulo, Brasil.

2) Produção bibliográfica

2.1. Artigos completos publicados em periódicos

a) Silva, B. M.; Santos, I. F. C.; Doiche, D. P.; Azevedo, M. G. P. ; Martins, D. J. C.; Camargo, B. W. D. F.; Agostinho, M.; Ferreira, G. M. ; **Branco, M. P.** ; Salewski, G. C. . Femoral Diaphyseal Fractures Fixation Technique Using an Adjustable Nylon Tie in Dog (*Canis lupus familiaris*) and Cat (*Felis catus domesticus*). Acta Scientiae Veterinariae, v. 46, p. 2, 2018.

b) Santos, I. F. C.; Inamassu, L.R.; Rahal, S. C.; Mamprim, M.J.; Martins, D. J. C.; Ferro, B.S.; Silva, B. M.; Ferreira, G. M.; **Branco, M. P.**; Silva Junior, J. I. S. Dopplerfluxometria da artéria femoral de cães adultos hípidos (*Canis lupus familiaris*). Acta Scientiae Veterinariae, v. 46, p. 1596, 2018.

c) Santos, I. F. C.; Silva, B. M.; Ferro, B.S.; Martins, D. J. C.; Ferreira, G. M.; **Branco, M. P.**; Silva Junior, J. I. S.; Blazizza, M. F. S.; Sato, T. H.; Rahal, S. C. . Pododermite em Cisne Negro (*Cygnus atratus*) em Moçambique. Acta Scientiae Veterinariae, v. 46, p. 344, 2018.

2.2. Artigo aceito para publicação

a) SANTOS, I. F. C.; FERRO, B. ; FERREIRA, G. M. ; **BRANCO, M. P.** ; SILVA, B. M. ; ASSIS, A. C. G. ; REIS, M. G. ; SATO, THAIS ; RAHAL, S.C. Prevalência de tumor venéreo transmissível em cães (*Canis Lupus Familiaris*) na região de Garça, São Paulo, Brasil. Medicina Veterinária-Recife.