
Evaluarea potențialului biologic activ al unor produse apiterapeutice cu adaos de uleiuri naturale în plăgi cutanate experimentale la șobolani

(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

Doctorand Negrea Octavia Maria (Tamas-Krumpe)

Conducător de doctorat Prof. Dr. Laurenț Ognean



INTRODUCERE

Produsele apicole se situează printre produsele naturale care se bucură actualmente de o atenție sporită în rândul consumatorilor, precum și în industria farmaceutică globală. Mierea de mană reprezintă unul dintre principalele produse ale stupului și este extrem de apreciată datorită unei game largi de compuși care intră în alcătuirea sa, îmbunătățindu-i profilul nutrițional și potențialul curativ. Printre numeroasele beneficii, cercetătorii menționează proprietățile antiinflamatoare, antimicrobiene, antiseptice, antioxidante ale acestui sortiment de miere. Toate aceste acțiuni sunt esențiale în diversele procese reparatorii, în care produsele apiterapeutice își găsesc aplicabilitatea, inclusiv în procesul de regenerare tisulară. Propolisul, un alt produs valoros al stupului este considerat de către mulți specialiști un aliat de bază în terapia diverselor boli, inclusiv a patologiilor cutanate. O altă categorie de produse naturale cu un potențial ridicat de utilizare clinică în domeniul dermatologiei este reprezentată de uleiurile naturale. La nivel global, interesul pentru uleiurile naturale a crescut considerabil în ultimele decenii, datorită gamei vaste de aplicații, care sunt direct legate de o serie de activități farmacologice și biologice.

Cu toate dovezile adunate de-a lungul timpului cu privire la efectele pozitive ale produselor naturale asupra sănătății, referindu-ne în mod particular, la produsele apicole și uleiurile naturale, tot mai există actualmente, ușoare rețineri din partea unora de a le utiliza în clinicile medicale. Prin urmare, este de datoria cercetătorilor de a depune eforturi susținute pentru efectuarea cât mai multor studii în vederea redescoperirii și valorificării unor remedii naturale cu numeroase întrebuințări terapeutice, demult uitate sau considerate uneori, empirice.

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI

Cercetările întreprinse în cadrul prezentei teze de doctorat au avut ca **scop** principal elaborarea a două produse apiterapeutice cu adaos de uleiuri naturale și implementarea lor ca terapie topică în defecte cutanate experimentale la șobolani din rasa Wistar. În vederea realizării scopului propus, au fost stabilite următoarele **obiective generale**:

- ❖ Evaluarea parametrilor fizico-chimici de calitate ai probei de miere de mană utilizată ca bază comună pentru cele două produse apiterapeutice studiate și verificarea conformității acesteia cu cadrul legislativ;
- ❖ Analiza compozițională a uleiului de cătină, respectiv a uleiului esențial de cimbriu, utilizate în formularea produselor apiterapeutice supuse testării, în corelație cu evidențierea principalilor compuși bioactivi cu importanță deosebită în procesele reparatorii cutanate;

- ❖ Cercetări privind conținutul în compuși biologic activi al formulelor apiterapeutice investigate, comparativ cu al mierii de mană, baza comună a acestora;
- ❖ Evaluarea capacității antioxidante totale a produselor apiterapeutice formulate, în corelație cu potențialul antioxidant al mierii de mană;
- ❖ Studiu comparativ privind activitatea antibacteriană a produselor apiterapeutice și a componentelor utilizate;
- ❖ Testarea efectului regenerativ a produselor apiterapeutice formulate, în plăgi cutanate induse experimental la șobolani de laborator.

STRUCTURA TEZEI

Teza de doctorat intitulată „Evaluarea potențialului biologic activ al unor produse apiterapeutice cu adaos de uleiuri naturale în plăgi cutanate experimentale la șobolani” este structurată în cele două părți uzuale, cuprinzând 152 de pagini, 17 tabele și 64 de figuri.

PARTEA I : Stadiul actual al cunoașterii

Prima parte este destinată stadiului actual al cunoașterii și grupează primele trei capitole, fiecare dintre acestea prezentând informații generale sintetizate din literatura de specialitate și în conformitate cu obiectivele urmărite în cercetările întreprinse.

Capitolul I este intitulat „Aspecte corelative privind funcțiile pielii și mecanismele regenerative cutanate” și cuprinde 3 subcapitole, în care sunt abordate noțiuni legate de structura și funcțiile pielii, mecanismele implicate în vindecarea plăgilor cutanate și modelele experimentale *in vivo* frecvent utilizate pentru monitorizarea evoluției procesului regenerativ tisular.

Capitolul II, denumit „Considerații generale privind testarea bioactivă a unor produse apicole și uleiuri naturale”, se derulează pe două subcapitole, în care sunt prezentate proprietățile bioactive ale unor produse naturale, precum: potențialul antioxidant al mierii de albine și al propolisului, respectiv activitatea antibacteriană a unor produse apicole și a uleiurilor naturale de cătină și de cimbriu.

Capitolul III este denumit „Actualități în terapia plăgilor cutanate cu unele produse apicole și uleiuri naturale” și include 2 subcapitole, care completează întregul tablou al primei părți, prin datele referitoare la utilizarea mierii de albine și a propolisului în terapia plăgilor cutanate și beneficiile uleiurilor naturale de cătină și de cimbriu în tratamentul plăgilor cutanate.

PARTEA a II-a : Contribuția personală

Partea a II-a cuprinde contribuția personală, structurată în șase capitole, destinate abordării diferitelor aspecte formulate în obiectivele urmărite.

Capitolul IV este denumit „Scopul și obiectivele cercetării” și constă în expunerea celor șase obiective generale stabilite în vederea realizării scopului principal propus.

Capitolul V este intitulat „Particularitățile în care s-a realizat cercetarea” și prezintă pe scurt, produsele experimentale și animalele introduse în testare, precum și totalitatea laboratoarelor specializate acreditate atât din cadrul USAMV Cluj-Napoca, cât și din afara acesteia, care au servit pentru derularea experimentelor.

Capitolul VI face referire la „Materialele și metodele” utilizate pe parcursul cercetărilor, și anume: materialul biologic, analizele fizico-chimice întreprinse, determinările specifice efectuate, organizarea și descrierea protocolului experimental instituit, precum și metodele de analiză statistică utilizate. Protocolul experimental implementat s-a bazat pe: proceduri chirurgicale, monitorizarea evoluției vindecării plăgilor prin examen macroscopic și histologic, examen bacteriologic al microbismului de la nivelul pielii animalelor, ante- și post-operator.

Capitolul VII grupează partea de „Rezultate și discuții”, incluzând șase subcapitole în care sunt conturate datele obținute pentru fiecare obiectiv în parte.

Capitolul VIII sintetizează partea de „Concluzii și recomandări” desprinse în urma investigațiilor efectuate.

Capitolul IX este denumit „Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei” și analizează caracterul inovativ și aportul prezentului studiu la ansamblul datelor existente în literatura de specialitate.

REZULTATELE CERCETĂRII

Cercetările efectuate în cadrul prezentei teze de doctorat au fost realizate în perioada 2018-2020. În acest context, strategia de abordare a temei de cercetare a cuprins două mari direcții: analiza calității compoziționale și evaluarea proprietăților biologice a două produse apiterapeutice, care au fost implementate ca terapie topică în plăgi cutanate experimentale la șobolani.

Produsele experimentale introduse în acest studiu au fost două produse apiterapeutice, elaborate în colaborare cu SC VITAPLANT SRL, din localitatea Săcel, județul Sibiu, România. Produsul Apiterapeutic I s-a obținut prin amestecul a două componente naturale, reprezentate de miere de mană (95%) și ulei de cătină (5%) per 100 g. Produsul Apiterapeutic II s-a obținut prin amestecul a două remedii apicole: miere de mană (89%), respectiv extract moale de propolis (10%) și a unui ulei esențial de cimbru (1%), per 100 g. Materia primă necesară în elaborarea celor două produse apiterapeutice a fost asigurată de către SC VITAPLANT SRL.



Fig. 1. Produsele apiterapeutice investigate (original)

Animalele introduse în testare au fost reprezentate de 15 șobolani (*Rattus norvegicus*), din linia Wistar, clinic sănătoși, masculi, de un an, cu greutatea corporală medie de 518.47 ± 14.43 g. Aceștia au fost întreținuți pe durata experimentului în Biobaza USAMV Cluj-Napoca, în condiții special create și conforme cu legislația în vigoare (STANDARD ISO 10993-2/2004; DIRECTIVA 2010/63/UE A PARLAMENTULUI EUROPEAN ȘI A CONSILIULUI EUROPEAN; LEGEA 43/2014 DIN ROMÂNIA).

În prezenta lucrare, am efectuat de asemenea, o serie de analize fizico-chimice uzuale în cadrul laboratoarelor specializate acreditate și conform metodelor consacrate din literatura de specialitate.

Studiul parametrilor fizico-chimici ai mierii de mană

În general, proprietățile fizico-chimice ale mierii constituie veritabili parametri de calitate ai acesteia, investigarea lor fiind necesară în vederea evaluării autenticității acestui produs și identificării factorilor responsabili pentru deprecierea lui. Rezultatele obținute au relevat conformitatea mierii studiate cu prevederile legale în vigoare și încadrarea sa ca miere de mană de calitate superioară.

Toți parametrii fizico-chimici analizați au indicat valori situate în limitele de referință prevăzute de cadrul legislativ, incluzând: conținutul în apă (16%); conductivitatea electrică ($940 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$); aciditatea liberă ($10.20 \text{ meq NaOH}/\text{kg}$); pH-ul (3.84); HMF-ul ($0.27 \text{ mg}/\text{kg}$ miere); profilul glucidic (conținut de glucoză+fructoză=71.33%), activitatea diastazică (37.12 DN); lipidele totale (0.024%); proteinele totale (0.55%). Am remarcat de asemenea, absența reziduurilor de tetraciline, iar la analiza melisopalinologică a probei de miere investigate am evidențiat prezența elementelor de mană specifice.

Studiul calității compoziționale a uleiurilor naturale

Analiza datelor obținute pentru uleiul de cătină investigat a relevat o gamă largă de compuși biologic activi, care activează funcțiile fiziologice ale pielii și stimulează procesul de regenerare tisulară și sinteză a collagenului, precum: carotenoidele totale ($142.33 \text{ mg}/100 \text{ g}$ ulei); acizii grași saturați (41.30%), incluzând acidul palmitic (41.03%), acidul stearic și acidul miristic; acizii grași mononesaturați (53.50%), incluzând acidul palmitoleic ca și compus majoritar (35.12%), dar și acidul oleic și vaccenic; acizii grași polinesaturați

(5.20%), incluzând acidul linoleic (3.63%) și acidul linolenic; tocoferolii reprezentați de α -tocoferol (128 mg/100 mL ulei), β -tocoferol (6.24 mg/100 mL ulei) și δ -tocoferol (0.65 mg/100 mL ulei); sterolii, reprezentați de stigmasterol (32 mg/100 mL ulei) și β -sitosterol (3000 mg/100 mL ulei).

Analiza datelor obținute la testarea uleiului esențial de cimbru a evidențiat 21 de compuși organici diferiți. Dintre aceștia, compusul majoritar a fost reprezentat de timol, care a înregistrat valori ridicate (52.15%), acesta fiind cunoscut prin activitatea antibacteriană puternică. Am semnalat de asemenea, cantități importante de p-cimen (23.55%) și γ -terpinen (5.31%). Valorile obținute confirmă faptul că proba investigată aparține chemotipului timol, ceilalți compuși fiind minoritari, cu valori cuprinse în intervalul 0.03%-3.81%.

Studiul privind conținutul în compuși biologic activi din mierea de mană și din produsele apiterapeutice

Evaluarea conținutului în polifenoli totali a relevat valori medii de 87 mg GAE/100 g la mierea de mană, 973 mg GAE/100 g la produsul apiterapeutic I și 997 mg GAE /100 g la produsul apiterapeutic II. În consecință, putem observa o creștere a conținutului în polifenoli totali în cazul celor două produse apiterapeutice comparativ cu proba de miere de mană, care a servit ca bază comună acestora. Aceste aspecte pot fi puse pe seama constituenților suplimentari care intră în compoziția produselor, precum uleiul de cătină pentru produsul apiterapeutic I, respectiv uleiul esențial de cimbru și extractul moale de propolis pentru produsul apiterapeutic II.

Evaluarea conținutului în flavone-flavonoli a evidențiat un conținut al acestor compuși apropiat ca valori: 33.33 mg QE/100 g pentru produsul apiterapeutic I, respectiv 37.33 mg QE/100 g pentru produsul apiterapeutic II. Spre deosebire, cantitatea de flavone-flavonoli conținută în proba de miere de mană a fost mai redusă (20.33 mg QE/100 g miere), dovedindu-se încă o dată, superioritatea produselor apiterapeutice elaborate, datorită constituenților suplimentari din compoziția acestora.

Studiul activității antioxidante totale a mierii de mană și a produselor apiterapeutice

Evaluarea activității antiradicalice prin metoda DPPH a relevat valori variate, dependente de conținutul în compuși antioxidanți prezenți în fiecare probă. Cel mai mic procent de inhibiție a fost observat la mierea de mană (21.03 %), în timp ce la produsele apiterapeutice am obținut valori mult mai ridicate. Produsul apiterapeutic II a prezentat cel mai ridicat procent de inhibiție (84.29 %), în timp ce la produsul apiterapeutic I am obținut o valoare mai scăzută (41.75 %).

Evaluarea activității antioxidante prin metoda FRAP a relevat de asemenea, valori

diferite. Cea mai mare valoare FRAP a fost semnalată la produsul apiterapeutic II ($2734 \mu\text{M Fe}^{2+}/100 \text{ g produs}$), urmat de produsul apiterapeutic I ($541.3 \mu\text{M Fe}^{2+}/100 \text{ g produs}$), mierea de mană prezentând cea mai scăzută activitate antioxidantă ($29.68 \mu\text{M Fe}^{2+}/100 \text{ g miere}$).

Studiul activității antibacteriene a produselor apiterapeutice și a componentelor utilizate

Rezultatele activității antibacteriene a celor două produse apiterapeutice, precum și a fiecărui element component din formula acestora au fost exprimate în funcție de diametrele zonelor de inhibiție (mm). Tulpinile bacteriene testate au fost clasificate ca fiind: „sensibile”, dacă diametrul a fost mai mare de 12 mm, „moderat sensibil”, când diametrul fost cuprins între 6 și 12 mm și „rezistente”, dacă diametrul a fost mai mic de 6 mm. Cele șase tulpini bacteriene de referință internațională utilizate în acest studiu au prezentat sensibilitate diferită față de cele două produse apiterapeutice testate (Tabel 1). Tulpinile de stafilococi izolate clinic au prezentat sensibilitate diferită la acțiunea produselor apiterapeutice investigate, cea mai sensibilă dovedindu-se a fi tulpina de *Staphylococcus spp. 354*. În general, bacteriile Gram-pozitive au fost mai sensibile la acțiunea produselor testate, dar s-au obținut rezultate bune și față de cele Gram-negative.

Tabel 1

Potențialul antibacterian al probelor luate în studiu

Nr./ No.	TULPINA BACTERIANĂ/ BACTERIAL STRAINS	PROBELE TESTATE/ TESTED SAMPLES						
		Ulei de cimbru/ Thyme oil	Ulei I de cătină/ Sea buckthorn oil	Miere de mană/ Honeydew honey	Produs apiterapeutic I/ Apiterapeutic product I	Produs apiterapeutic II/ Apiterapeutic product II	Extract moale de propolis / Soft propolis extract	Amoxicilină/ Amoxycilin
		DIAMETRUL ZONEI DE LIZĂ (mm)/ DIAMETER OF THE LYSIS AREA (mm)						
1.	<i>S. aureus 6538 P</i>	18.09	0	8.71	10.13	14.22	9.63	23.47
2.	<i>Staphylococcus spp. 88</i>	18.54	0	11.47	14.32	14.64	7.89	28.58
3.	<i>Staphylococcus spp. 112</i>	24.18	0	8.32	8.59	12.04	946IP	11.64 CR
4.	<i>Staphylococcus spp. 119</i>	24.19	0	8.04	9.13	13.07	10.52	26.50
5.	<i>Staphylococcus spp. 183</i>	23.89	0	8.44	9.47	10.85	9.92	9.53
6.	<i>Staphylococcus spp. 354</i>	39.02	0	12.15	15.63	17.08	14.01	40.86
7.	<i>B. cereus. 11778</i>	26.33	0	9.06	10.37	18.73	13.40	R
8.	<i>L. monocytogenes 13932</i>	23.20	0	13.66	14.58	16.80	15.13	30.12
9.	<i>E. coli 10536</i>	27.06	0	0	8.77	9.83	0	15.39
10.	<i>S. enteritidis 13076</i>	17.62	0	8.93	9.78	11.05	0	18.23
11.	<i>Ps. aeruginosa 27853</i>	21.19IP	0	15.93CR	1593CR	17.49	0	R
12.	<i>S. pseudintermedius</i>	27.68	0	9.32	12.36	13.74	9.77	24.38

Legendă: IP = inhibiție parțială; CR = colonii rezistente; R= rezistent.

Studiul privind potențialul cicatrizant și regenerativ al produselor apiterapeutice

În urma investigațiilor efectuate în baza protocolului experimental adoptat, bazat pe inducerea de plăgi excizionale cu un punch de biopsie de 8 mm, la șobolani repartizați pe trei loturi (lot I- plăgi netratate; lot II- plăgi tratate cu produsul apiterapeutic I; lot III-plăgi tratate cu produsul apiterapeutic II), am constatat următoarele:

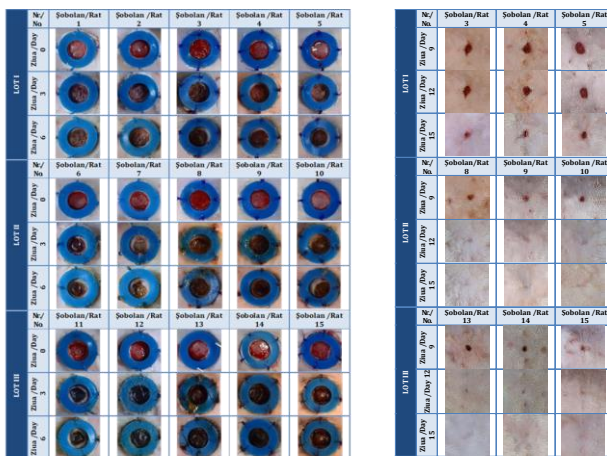
- Acoperirea cu cruste a plăgilor de control și a plăgilor tratate cu cele două produse apiterapeutice, existând însă și unele diferențe. Astfel, la majoritatea defectelor cutanate de control, crustele au fost sero-hemoragice, roșiatice și puternic aderente la țesutul subiacent. Spre deosebire, plăgile tratate au fost mult mai uscate, mai voluminoase și de culoare brun-maronie la subiecții din lotul II, respectiv brun-negricioasă la cei din lotul III (Tabel 2);
- Plăgile subiecților tratați cu produsul I și plăgile tratate cu produsul II au relevat o vindecare completă în ziua a 12-a, dar cu resturi cicatriciale ușor vizibile. Comparativ, plăgile netratate prezentau încă dimensiuni importante și aspect concav în ziua a 12-a post-intervenție (Tabel 3);
- Procesul de cicatrizare-regenerare a fost complet finalizat în ziua a 15-a a experimentului la subiecții tratați topic cu produsele apiterapeutice (loturile II și III), distingându-se cu greu locul producerii defectului cutanat, în timp ce la lotul de control, plăgile erau în continuare prezente (Tabel 3);

Tabel 2 și 3

Evoluția procesului de vindecare a plăgilor pe zile

A (zilele 0-3-6)

B (zilele 9-12-15)



- Procentul de închidere a plăgii (%), calculat pentru fiecare șobolan în parte, a evidențiat începând cu ziua a 9-a post-intervenție, o medie de 93.77 % pentru lotul II, respectiv de 95% pentru lotul III, în timp ce la lotul I, valorile medii înregistrate au fost de 77.93%.
- În ziua a 12-a a experimentului, procentul de închidere a fost de 100% la plăgile tratate cu produsele apiterapeutice din loturile II și III, cu urme cicatriciale discrete, iar la lotul de control, media atinsă a fost de 80.90%. La 15 zile de la derularea experimentului, s-a înregistrat un procent de închidere a plăgilor de 93.11% la lotul netratat;
- Analiza microbiologică comparativă a probelor prelevate ante- și post-operator de la nivelul pielii șobolanilor a relevat un număr mai redus de colonii dezvoltate, în ziua a 7-a post-terapeutic la loturile experimentale, față de lotul de control. Acest număr foarte redus de colonii față de ziua 0, l-am atribuit efectului antibacterian al produselor experimentale utilizate;
- Evaluarea histologică a biopsiilor cutanate a evidențiat un bun efect terapeutic al aplicării topice a celor două produse apiterapeutice, procesele reparatorii cutanate fiind mult mai avansate la finele experimentului, loturile tratate prezentând un epiteliu gros și refăcut aproape în totalitate (Fig. 2).

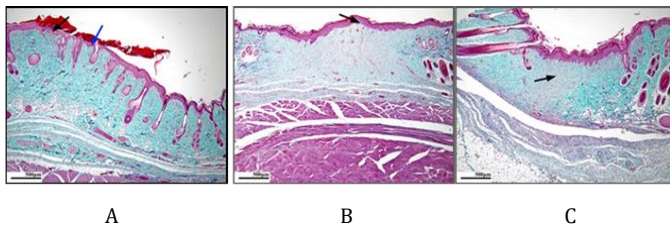


Fig. 2. Aspectul histologic al epitelului cutanat la șobolanii din loturile investigate: A-Lot I: săgeata neagră-zonă lipsită de epiteliu; săgeata albastră-epiteliu în curs de consolidare; B-Lot II: săgeată neagră-epiteliu refăcut deasupra zonei de intervenție; C-Lot III: săgeată neagră-zonă refăcută, lipsită de fire de păr și glande (Col. Tricrom Goldner; original).

CONCLUZII ȘI RECOMANDĂRI

- ✓ Analiza parametrilor fizico-chimici ai probei de miere de mană, utilizată ca bază comună pentru cele două produse apiterapeutice testate a relevat calitatea compozițională și conformitatea acestora cu cadrul legislativ actual.
- ✓ Analiza compozițională a uleiurilor de cătină și de cimbbru, componentele formulelor apiterapeutice, a indicat un conținut bogat în compuși bioactivi cu impact deosebit în procesele reparatorii tisulare.
- ✓ Din ansamblul rezultatelor obținute reiese și conținutul bogat în polifenoli totali, respectiv în flavone-flavonoli a produselor apiterapeutice investigate.
- ✓ Rezultatele studiului nostru a relevat o activitate antibacteriană și antioxidantă bună a produselor apiterapeutice investigate, cu efecte benefice în vindecarea plăgilor.
- ✓ Implementarea modelului excizional în testarea potențialului regenerativ tisular al celor două produse apiterapeutice cu adaos de uleiuri naturale s-a dovedit eficientă în investigațiile efectuate, procesele tisulare reparatorii fiind dominante pe toată durata experimentului.
- ✓ Pornind de la arsenalul bogat de produse bioterapeutice existent actualmente pe piață, recomandăm elaborarea și utilizarea pe scară mai largă a acestora și în domeniul medicinei veterinare.
- ✓ Efectuarea și reproducerea unor viitoare studii cu diferite tipuri de mieri autohtone și uleiuri naturale privind potențialul biologic activ al acestora.
- ✓ Pe baza proprietăților bioactive raportate în prezenta lucrare, recomandăm implementarea acestui tip de formule apiterapeutice în clinicile veterinare, ca terapie topică în managementul plăgilor simple și complicate la animale.

BIBLIOGRAFIE

1. BERTONCELJ J., DOBERŠEK U., JAMNIK M., GOLOB T., 2007. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey, *Food Chem.* 105, 822–828.
2. BETANCES-SALCEDO E., REVILLA I., VIVAR-QUINTANA A.M., GONZÁLEZ-MARTÍN M.I., 2017. Flavonoid and Antioxidant Capacity of Propolis Prediction Using Near Infrared Spectroscopy, *Sensors (Basel)* 17(7):1647.
3. BIALEK A., BIALEK M., JELINSKA M., TOKARZ A., 2016. Fatty acid profile of new promising unconventional plant oils for cosmetic use, *Int. J. Cosmet. Sci.* 38, 382–388.
4. BITTENCOURT M. L. F., RIBEIRO P. R., FRANCO R. L. P., HILHORST H. W. M., DE CASTRO R. D., FERNANDEZ L. G., 2015. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: *Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds*, 76, Part 3:449–457.
5. BLASER G., SANTOS K., BODE U., VETTER H., SIMON A., 2007. Effect of medical honey on wounds colonised or infected with MRSA, *J. Wound Care* 16(8), 325–328.
6. BOATENG J., DIUNASE K.N., 2015. Comparing the antibacterial and functional properties of cameroonian and manuka honeys for potential wound healing-have we come full cycle in dealing with antibiotic resistance, *Molecules* 20:16068–16084.
7. BOBIȘ OTILIA, MARGHITAS LIVIU, KRISZTINA RINDT, NICULAE MIHAELA, DEZMIREAN DANIEL, 2008. Honeydew honey: correlations between chemical composition, antioxidant capacity and antibacterial effect mierea de mană: corelații între compoziția chimică, capacitatea antioxidantă și efectul antibacterian, *Lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologii, Timisoara* 41.
8. CHUA L.S., LEE J.Y., CHAN G.F., 2013. Honey protein extraction and determination by mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405(10), 3063–3074.
9. COOPER R., 2016. Honey for wound care in the 21st century, *Journal of Wound Care* 25(9): 544–552, doi:10.12968/jowc.2016.25.9.544.
10. CORNELL K., 2012. Wound Healing. In: Tobias, KM.; Johnston, SA., editors, *Veterinary Surgery: Small Animal* 1, Vol. 1, St. Louis: Saunders, 125-134.
11. COSTA M.F., DURÇO A.O., RABELO T.K., BARRETO R.S.S., GUIMARÃES A.G., 2019. Effects of Carvacrol, Thymol and essential oils containing such monoterpenes on wound healing: a systematic review, *J Pharm Pharmacol.* 71(2):141-155.
12. COTRAN R.S., ABBAS A.K., FAUSTO N., ROBBINS S.L., KUMAR V., 2005. ROBBINS & COTRAN: Patologia - Bases Patológicas das Doenças, 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 1592 p.
13. COTTE J.F., CASABIANCA H., CHARDON S., LHERITIER J., GRENIER-LOUSTALOT M.F., 2004. Chromatographic analysis of sugars applied to the characterisation of monofloral honey, *Anal. Bioanal. Chem.* 380, 698–705.
14. COUQUET YVES, ALEXIS DESMOULIÈRE, MARIE-LAURE RIGAL, 2013. Les propriétés antibactériennes et cicatrisantes du miel, *Actualités Pharmaceutiques, Volume* 52, Issue 531, Pages 22-25, ISSN 0515-3700

