

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO COM EMULSIFICADO DE  
NANOPRÓPOLIS ASSOCIADO A LASERTERAPIA: ESTUDO DE CASOS EM  
SÉRIE**

Leticia Silva Ghedin<sup>1</sup>, Maria Gabriela Pereira Zurlo<sup>1</sup>, Caroline Locatelli Guidi<sup>1</sup>, Daniel Paulo Bortoluzzi<sup>1</sup>, Luciane B. Ceretta<sup>2</sup>, Felipe Dal-Pizzol<sup>1</sup>, Cleonice Gonçalves da Rosa<sup>3</sup>, Diogo Domingui<sup>1, 4\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina (UNESC), Criciúma, 88806-000, SC, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Universidade do Sul de Santa Catarina (UNESC), Criciúma, 88806-000, SC, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório Multiusuário, Programa de Pós-Graduação em Ambiente e Saúde, Universidade Planalto Catarinense, Lages 88509-900, SC, Brasil.

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Gestão em Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina (UNESC), Criciúma, 88806-000, SC, Brasil.

\*Autor correspondente: Diogo Domingui, PhD. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Gestão em Saúde, Universidade do Sul de Santa Catarina (UNESC), Criciúma, 88806-000, SC, Brasil. Fax: 55 48 3431 2736.

E-mail: diogo\_domingui@unesc.net ou diogo\_domingui@hotmail.com

## RESUMO

O nanoprópolis é uma alternativa terapêutica com propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias e efeitos nos mastócitos, essenciais no processo de cicatrização. A laserterapia de baixa intensidade também possui efeitos benéficos, como modulação da inflamação, proliferação celular e reparo tecidual das lesões. Por isso, o objetivo do estudo foi avaliar a evolução da ferida com a utilização do nanoprópolis associado à fotobioestimulação, em um ambulatório de feridas localizado no extremo sul catarinense. Foram analisadas as características morfológicas, o perfil inflamatório, o dano oxidativo e os marcadores de reparação tecidual, tanto no soro quanto nas secreções coletadas da ferida. Foram avaliados os níveis de interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10), a atividade da mieloperoxidase (MPO), a expressão de colágeno tipo I e III, além dos fatores de crescimento FGF, EGF e TGF- $\beta$ . O estudo, realizado com 7 pacientes masculinos (30–69 anos), mostrou que 9 semanas de tratamento com nanoprópolis e laserterapia promoveram melhora clínica nas feridas vasculares, com redução das dimensões da lesão, aumento do tecido de granulação e modulação de biomarcadores inflamatórios (redução de IL-6 e MPO, aumento de IL-10) e cicatriciais (aumento de TGF- $\beta$ , FGF e colágeno). Conclui-se que o tratamento promoveu a cicatrização por modular a inflamação, promover angiogênese e estimular fatores de crescimento, oferecendo uma alternativa acessível para feridas complexas.

**Palavras-chave:** Cicatrização, Ferida, Lesão, Própolis, Nanoprópolis, Laserterapia.

## INTRODUÇÃO

A ferida é definida como uma ruptura da estrutura e função normal da pele e das estruturas de tecidos moles subjacentes associados.<sup>1</sup> Essas lesões podem ser causadas por diversos mecanismos, incluindo etiologias agudas e crônicas.<sup>2</sup> Diversos fatores podem

contribuir para a manutenção e o agravamento da lesão, dentre eles, a redução prolongada do fluxo sanguíneo cutâneo, que pode causar um colapso isquêmico, dificultando o processo de cicatrização.<sup>3</sup>

A reparação de feridas consiste em uma cascata coordenada de eventos celulares e moleculares que interagem para que ocorra a reconstituição do tecido, dividida em três fases: inflamatória, proliferativa e remodeladora.<sup>4</sup> Cada fase é caracterizada pela presença de infiltrados de células em locais específicos, ocorrendo de forma linear e simultânea, mediada por fatores químicos.<sup>4</sup> Entre esses fatores, destacam-se, na inflamação, a interleucina-10 (IL-10), citocina anti-inflamatória, e a interleucina-6 (IL-6), de ação pró-inflamatória, além da mieloperoxidase (MPO), que atua de maneira semelhante, e do colágeno tipo III, responsável pela formação do tecido de granulação.<sup>5, 6</sup> Na fase proliferativa, predominam o colágeno tipo I e os fatores de crescimento como o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o fator de crescimento epidérmico (EGF) e o fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ), os quais promovem processos como angiogênese e diferenciação celular.<sup>7</sup>

No âmbito do tratamento de lesões, destacam-se estratégias terapêuticas que visam otimizar a reparação tecidual, aliando eficácia clínica, viabilidade econômica e acessibilidade populacional. O própolis, produto natural derivado de colmeias, configura-se como uma alternativa promissora devido ao seu amplo espectro de ação farmacológica, que inclui propriedades antimicrobianas, efeitos antioxidantes, modulação da atividade de mastócitos e ação anti-inflamatória, essenciais no processo de cicatrização de feridas.<sup>8, 9, 10, 11</sup> Além disso, efeitos podem ser potencializados quando o própolis é usado em associação com a laserterapia.<sup>12</sup> O laser é uma modalidade terapêutica não tóxica, não invasiva e indolor, que age provocando a modulação da inflamação, a proliferação e reparo das lesões.<sup>13</sup> A interação da luz com o tecido promove efeitos biológicos como aumento de potencial de membrana mitocondrial, ativando adenosina trifosfato (ATP), que fornece mais energia para a

recuperação das células danificadas.<sup>14</sup>

As feridas constituem um sério problema de saúde, altamente prevalente, que onera os gastos com a saúde pública do país. Por isso, é de suma importância a existência de uma terapêutica de boa qualidade, de baixo custo e acessível à população. A associação do nanoprópolis à laserterapia no processo de reparação tecidual pode atuar acelerando e melhorando a regeneração e a reparação das células cutâneas. Essa abordagem pode minimizar a necessidade de medicação convencional, aperfeiçoando os resultados e as taxas de recuperação, com custo reduzido. Portanto, neste estudo, o objetivo foi avaliar a evolução da ferida com a utilização do nanoprópolis associado à laserterapia em pacientes atendidos no ambulatório de feridas, localizado no extremo sul catarinense.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Amostra do estudo**

O estudo consistiu em uma série de casos, o qual foi desenvolvido no Ambulatório de Feridas de um município do sul de Santa Catarina, com usuários que aceitaram participar desse tratamento, durante o período de nove semanas entre setembro de 2024 e fevereiro de 2025. Foram incluídos no estudo participantes que não apresentaram quadros anteriores de alergia ao própolis ou ao nanoprópolis; que possuíam feridas de origem vascular; que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE); e que tinham disponibilidade para comparecer ao local uma vez por semana. Conseqüente foram excluídos os pacientes diabéticos, oncológicos e aqueles com feridas causadas decorrentes de amputação de membros ou de outras etiologias que não fossem vasculares, assim como os desistentes ao longo da pesquisa, aqueles que não permitiram a coleta de sangue ou o recebimento do tratamento, e também os que apresentaram três faltas consecutivas sem justificativa.

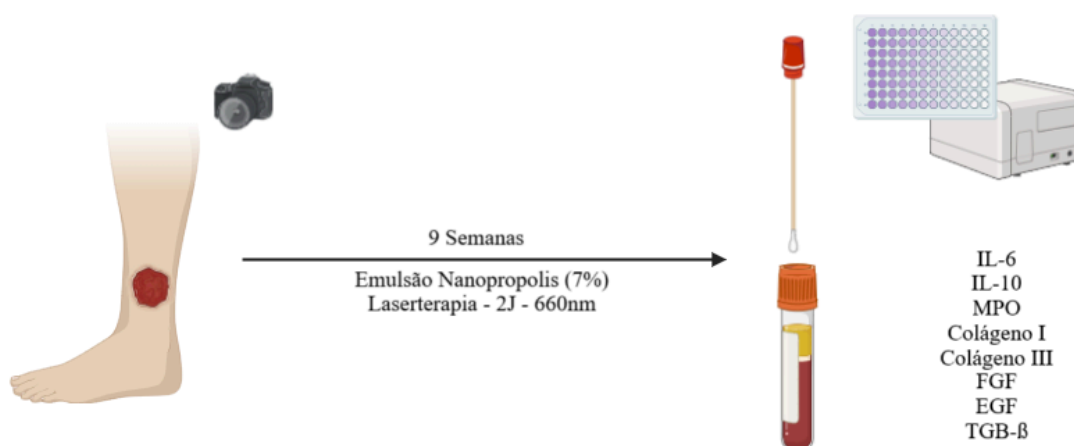
Inicialmente, 16 participantes foram incluídos. Entretanto, no início da pesquisa, houve a desistência de um participante; ao longo do estudo, houve a exclusão de quatro participantes devido a três faltas consecutivas sem justificativa; e quatro participantes faltaram as coletas finais, impossibilitando a coleta de dados.

## **Procedimentos**

A partir da autorização municipal e aprovação do Comitê de Ética da UNESC (Parecer nº 6.968.240), os pesquisadores entraram em contato com os participantes, agendando o primeiro encontro. No primeiro dia (tempo 0), foram explicados o objetivo, os riscos e os benefícios da pesquisa, bem como as orientações gerais, informando que o tratamento seria aplicado uma vez por semana. Após a assinatura do TCLE, foi aplicado um questionário de identificação do usuário e de suas condições sociodemográficas, além da origem da ferida e seu desenvolvimento. Logo após, foi coletado 3 mL de sangue venoso do paciente. Em seguida, o curativo antigo foi removido cuidadosamente, conforme protocolo prévio de cuidados com feridas. Realizou-se a análise qualitativa da ferida, observando-se a pele e suas adjacências, a aparência dos bordos, as características do exsudato, a presença de tecido necrosado ou de granulação, e sinais de infecção, registrando tudo por fotografia e anotando, no questionário, o estágio da lesão.

Nos tempos 0, 3, 5 e 9, os pesquisadores passaram um swab no leito da ferida, coletando secreção para avaliação dos mecanismos inflamatórios e de cicatrização local (Figura Suplementar 1). Os swabs foram armazenados em tubos de ensaio com tampa, enquanto eram realizados os tratamentos das lesões, sendo posteriormente congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Os swab foram lavados, e as células, depositadas em microtubos. A solução foi centrifugada a 2500 RPM por 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado. O pellet de células foi homogeneizado e diluído em tampão Trizol para a extração do RNA e execução da

técnica de RT-PCR.



**Figura Suplementar 1:** Desenho do estudo. Fonte: elaborado pelas autoras, 2025; IL-6: Interleucina-6; IL-10: Interleucina-10; MPO: Mieloperoxidase; FGF: Fator de Crescimento Fibroblástico; EGF: Fator de Crescimento Epidérmico; TGF-  $\beta$ : Fator de Crescimento Transformante Beta.

Para remover o restante do exsudato, fibrina e/ou restos celulares da lesão, esta foi irrigada com solução fisiológica a 0,9%. Para o tratamento foi aplicado no leito da ferida a emulsão de nanoprópolis a 7%, sucedido por laserterapia contínua 2J de 660nm. Em seguida, a região perilesional foi seca com gaze estéril, foi feita a colocação de nova gaze estéril, e esta foi fixada com fita micropore ou esparadrapo, conforme a necessidade, finalizando o curativo e proporcionando a cobertura adequada.

As amostras sanguíneas coletadas foram centrifugadas durante 5 minutos, a 5000 rpm a 4°C. O soro foi separado do pellet e armazenado em freezer a -80°C. As análises bioquímicas foram realizadas por teste ELISA (no soro) ou por RT-PCR (nas células do tecido), com o objetivo de mensurar os níveis de IL-6, IL-10, MPO, colágeno tipo I, colágeno tipo III, FGF, EGF e TGF- $\beta$ , seguidas de análise estatística. Essa primeira coleta foi utilizada

como tempo basilar para a análise da evolução.

O 2º, 4º, 6º e 8º encontro dos pesquisadores com o paciente (um encontro semanal para a realização do procedimento) iniciaram-se com a retirada do curativo antigo. Em seguida, foi realizada a aplicação da emulsão de nanoprópolis a 7%, sucedida por laserterapia (2J de 660nm), e posterior colocação do curativo, conforme descrito no primeiro momento. Nos tempos 3 e 5, também houve a coleta da secreção da lesão com swab, para avaliar posteriormente, e registro da evolução da ferida por meio de fotografias. No 9º e último encontro, repetiram-se os cuidados da primeira semana, incluindo a coleta de sangue para análise e conclusão dos resultados.

### **Análises pelo método ELISA**

Para as análises dos níveis de citocinas (IL-6 e IL-10) em soro, dos fatores de desenvolvimento de reparação tecidual (colágeno I, colágeno III, EGF, TGF- $\beta$  e FGF) e nas secreções coletadas pelo swab, foram utilizados os testes de imunoenensaio (ELISA Sanduíche) com kits R&D Systems (DY206, D1000B, DY6220-05, MBS730758, DEG00, DB100C e DFB50, respectivamente). Os procedimentos para cada dosagem foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram homogeneizadas em 1 mL de tampão fosfato salino (PBS) 1x. Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, adicionados aos poços e incubados a 4 °C *overnight*. Após lavagens com tampão (0,05% Tween 20 em PBS), as placas foram bloqueadas com solução de bloqueio (1% de albumina bovina em PBS) e incubadas.

Em seguida, foram adicionados 100  $\mu$ L das amostras ou padrões diluídos, e nova incubação *overnight*. Após as lavagens, adicionaram-se 100  $\mu$ L de anticorpos de detecção, incubando por mais duas horas. Após novas lavagens, 100  $\mu$ L de polímero estreptavidina peroxidase foram adicionados e incubados por 30 minutos. Após mais lavagens, 100  $\mu$ L da

solução substrato foram adicionados e incubados por 30 minutos. A reação foi interrompida com 50 µL de ácido clorídrico 2N, e a coloração foi lida em espectrofotômetro a 450 nm.

## PCR-RT

As células viáveis coletadas no leito da ferida foram centrifugadas e lavadas com tampão fosfato. Em seguida, o RNA total foi isolado com reagente Trizol® (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total foi quantificado por espectrofotometria (A260/280 nm) após o tratamento com desoxirribonuclease I (Invitrogen) para eliminar a contaminação do DNA genômico, de acordo com as instruções do fabricante. Para a realização do procedimento, foram utilizados os primers IL-6, IL-10, colágeno I, colágeno III, FGF, EGF, TGF-β (Material Suplementar 2), juntamente com o kit Power SYBR™ Green RNA-to-CT™ 1-Step, conforme recomendações do fabricante. As reações foram realizadas em volumes de 20 µL.

IL-6	Forward: 5'-GAA GAG GAA GAC CAG GAG AAG-3'
	Reverse: 5'-CCT TCT GTG GCT TGT CTT CTT-3'
IL-10	Forward: 5'-TGC TGC TTT CTT CTC CTC TGC-3'
	Reverse: 5'-GGC TCC AGA GGA TGC TTT C-3'
Colágeno I	Forward: 5'-CAG GAG GAC TGG CTC TCT G-3'
	Reverse: 5'-GGT GAC GGT GAC GGT GTT C-3'
Colágeno III	Forward: 5'-GGA CTT GGA CCT GGT TCT C-3'
	Reverse: 5'-GGC TTT GAC CTC TCC TCT G-3'
FGF	Forward: 5'-GAC CCA GAC CAA GGA GAC C-3'
	Reverse: 5'-GGC TCA GGA GGA CAA GAT G-3'
EGF	Forward: 5'-GCA CCA GAC TGT GAC CCA G-3'
	Reverse: 5'-GGA GGA GAG GTC TGG AGA C-3'
TGF-B	Forward: 5'-GGA TGA CTC TGG TCA GGA C-3'
	Reverse: 5'-GCT GTT CTC TGG GCT GTT G-3'

**Material Suplementar S2** - Sequenciamento de primers utilizados para a técnica de PCR-RT. Para análise de IL-6, IL-10, colágeno I, colágeno III, FGF, EGF, TGF-β, do leito da

ferida foram utilizados os primers produzidos pela Exxtend Biotecnologia Ltda.

As condições dos ciclos de reação de transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), foram as seguintes: uma etapa inicial de ativação da polimerase a 48 °C por 30 minutos e 95 °C por 10 minutos. Logo após, 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C para desnaturação e 60 segundos a 60 °C para estabilização. Ao final do protocolo de ciclagem, foi incluída uma análise da curva de fusão, com medição da fluorescência entre 60 e 99 °C, sendo observado um único pico em todos os casos. Os níveis de expressão relativa foram determinados com 7500 Fast Real-Time System Sequence Detection Software v.2.0.5 (Applied Biosystems).

### **Níveis de Mieloperoxidase – MPO**

As amostras foram adicionadas em placas de microtitulação previamente revestidas com anticorpo monoclonal específico para MPO. Após a incubação e lavagem, foi adicionado um anticorpo policlonal de detecção conjugado com enzima. Após nova incubação e lavagem, o substrato enzimático foi adicionado, e a reação foi interrompida com solução de parada. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 450 nm, com correção do comprimento de onda a 540 nm. A concentração de MPO foi determinada a partir de uma curva padrão. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, e os resultados foram expressos em ng/mL.

### **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados coletados foram organizados em planilhas para posterior análise. Foi realizada análise descritiva das variáveis estudadas, relatando-se a frequência e a porcentagem das variáveis qualitativas (mecanismo de lesão, tipo de ferida, sexo, etiologia da

ferida, fatores de cicatrização), bem como a média e o desvio padrão das variáveis quantitativas (idade). A investigação da distribuição das variáveis quantitativas quanto à normalidade foi realizada por meio da aplicação do teste de Shapiro-Wilk. Quando constatada a normalidade dos dados, aplicou-se o teste ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey's para múltiplas comparações, ou o teste T para amostras pareadas, no caso de comparações em duas variáveis de tempo. A significância estatística foi considerada para valores de  $P < 0,05$  em todas as análises. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa Statistical Package for the Social Science (SPSS) versão 20.0, e os gráficos foram elaborados no Graphpad Prism 9.0.

## **Resultados**

### **Descrição dos casos em série**

A amostra foi composta de 7 casos (Quadro 1) de pacientes com feridas vasculares, todos do sexo masculino, com idades variando entre 30 e 69 anos, predominando pacientes acima de 50 anos. Entre os pacientes apresentados, os portadores de hipertensão arterial sistêmica (HAS) são P2, P3 e P7, enquanto os não portadores de HAS são P1, P4, P5 e P6. Em relação ao tempo de ferida, os casos de curto prazo, com 6 meses ou mais, incluem os pacientes P1 e P7; os de médio prazo, com 2 a 3 anos, são P3, P5 e P6; e os de longo prazo, com mais de 8 anos, são P2 e P4. Quanto à satisfação com a qualidade de vida, estão satisfeitos os pacientes P2, P3, P5 e P6, enquanto P1, P4 e P7 se declaram insatisfeitos (Material Suplementar 3).

paciente	Baseline							9 Semanas de tratamento						
	Localização da ferida	Profundidade	Dimensão	Região perilesional	Bordas	leito da ferida	Sinais de infecção	profundidade	Dimensão	Região perilesional	Bordas	leito da ferida	Sinais de infecção	
P1	região de tornozelo	profunda	Ovalada	hiperemiada	íntegras, irregulares e levemente elevadas	presença de tecido de granulação e esfacelo	Não	Aumento da profundidade	Irregular, com aumento de tamanho	hiperemiada	íntegras, levemente elevadas e hiperemiadas	presença de tecido de granulação e esfacelo	Não	
P2	região anterior distal do MI	profundidade parcial	contornos irregulares	com tecido desvitalizado e ressecado	irregulares e levemente elevadas	irregular com predomínio de tecido de granulação avemelhado	Não	Profundidade parcial	Irregular	Diminuição do tecido desvitalizado e ressecado	Íntegras	Redução do tecido necrosado e aumento do tecido de granulação	Não	
P3	região medial distal do MI	profunda	contornos irregulares	hiperemiada e ressecada	irregulares e levemente elevadas	irregular com presença de tecido de granulação e tecido desvitalizado	Não	Profundidade parcial	Irregular com diminuição do tamanho	Ressecado	Íntegras e levemente elevada	Diminuição de exsudato com redução do tamanho	Não	
P4	região distal dos MMI	profunda	contornos irregulares	hiperemiada, ressecada e presença de maceração	irregulares e levemente elevadas	irregular com predomínio de tecido de granulação avemelhado	Presença de exsudato purulento e odor fétido	profunda	irregular	hiperemiada, ressecada e presença de maceração	irregulares e levemente elevadas	Irregular, com aumento de granulação e desvitalizado	Odor fétido e exsudato purulento	
P5	região de tornozelo posterior	profunda	ovalada	ressecada	irregulares e levemente elevadas	predomínio de hipergranulação e presença de esfacelo	Não	Superficial	Irregular com diminuição do tamanho	Ressecada e hiperemiada	Fechamento total de bordas	Rápida formação de tecido viável e de granulação	não	
P6	região de dorso de MMI	profunda	arredondada	ressecada, hiperemiada e macerada	irregulares, levemente elevadas, com tecido desvitalizado	irregular com predomínio de tecido de granulação vermelho e esfacelo	Não	Profunda	Irregular com diminuição do tamanho	Ressecada e hiperemiada	Irregulares e levemente elevadas	Formação de tecido viável	Não	
P7	região distal dos MMI	profundidade parcial	contornos irregulares	hiperemiada, ressecada e com maceração	irregulares e levemente elevadas	irregular com predomínio de tecido de granulação avemelhado	Presença de exsudato purulento e odor fétido.	Profundidade parcial	Irregular	Ressecada	irregulares e levemente elevadas	Aspecto semelhante ao início, com pouca formação de tecido de granulação	Odor fétido e exsudato purulento	

**Quadro 1 - Avaliação clínica da ferida, realizado na sessão inicial ao tratamento e final ao tratamento durante o procedimento de curativo e aplicação do nanoprópolis. O quadro apresenta os participantes do estudo e as análises da Profundidade, Dimensão, Região perilesional, Bordas, Leito da ferida e Sinais de infecção.**

Identificador	Idade	Sexo	Portador de HAS	Tempo de ferida	Tratamentos para ferida já feitos	Satisfeito com a qualidade de vida	Tipo de ferida	Grau da ferida
P1	69	M	Não	6 meses a mais	Escleroterapia;	Não	Vascular	4
P2	66	M	Sim	8 anos	Coberturas	Sim	Vascular	4
P3	30	M	Sim	3 anos	Coberturas	Sim	Vascular	4
P4	40	M	Não	Mais de 10 anos	Escleroterapia, coberturas	Não	Vascular	4
P5	57	M	Não	2 anos	Debridamento, coberturas	Sim	Vascular	4
P6	64	M	Não	2 anos	Coberturas, angioplastia, ciprofloxacino	Sim	Vascular	4
P7	69	M	Sim	6 meses a mais	Benzetacil	Não	Vascular	4

**Material Suplementar 3 - Caracterização dos participantes do estudo.** Os participantes foram renomeados conforme sua sequência de inclusão e os dados como idade, sexo, comorbidades e qualidade de vida foram relatados e expostos em uma tabela de forma

descritiva.

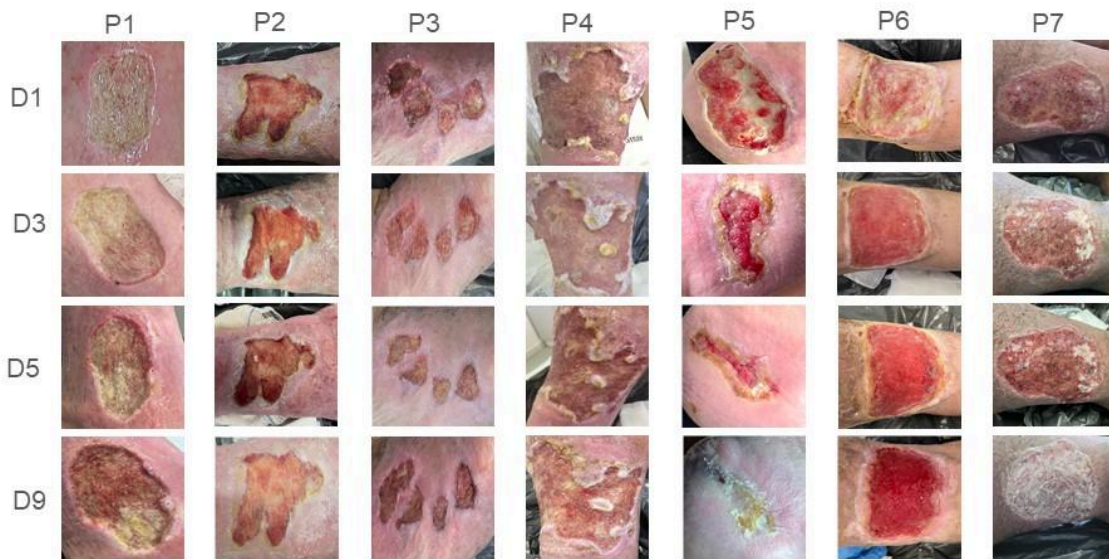
### **Análise da evolução da ferida**

Ao longo das 9 semanas de tratamento, observou-se melhora clínica progressiva na maioria dos pacientes, com redução da profundidade e das dimensões das feridas, bem como melhora na qualidade do leito da ferida, com predominância de tecido de granulação saudável (Quadro 1). O paciente P1, embora tenha apresentado aumento da profundidade e dimensões da ferida, manteve a ausência de sinais infecciosos. A região perilesional permaneceu hiperemiada e as bordas íntegras e levemente elevadas. Em P2, observou-se manutenção da profundidade parcial, mas com redução do tecido desvitalizado e aumento do tecido de granulação, o que indica evolução positiva do processo de cicatrização.

O paciente P3 apresentou melhora significativa, com diminuição do tamanho da lesão e do exsudato, além de progressiva substituição do tecido desvitalizado por tecido de granulação. Em P4, apesar da manutenção da profundidade e da presença de exsudato purulento e odor fétido, houve predomínio de tecido de granulação avermelhado, sugerindo atividade cicatricial. Já o paciente P5 demonstrou melhora notável, com a ferida tornando-se superficial e menor em tamanho, associada à rápida formação de tecido saudável e de granulação.

O P6 evidenciou redução do tamanho da lesão e substituição do tecido desvitalizado por tecido de granulação vermelho. Por fim, P7 manteve o padrão de profundidade parcial, com pouca formação de tecido de granulação e presença persistente de exsudato purulento e odor fétido, sugerindo estagnação ou lenta evolução cicatricial. De modo geral, os achados apontam para uma tendência de melhora no aspecto clínico das feridas em grande parte dos pacientes, destacando a efetividade do tratamento ao longo das 9 semanas, com especial atenção para os casos de P5 e P6, que apresentaram melhora acentuada dos parâmetros

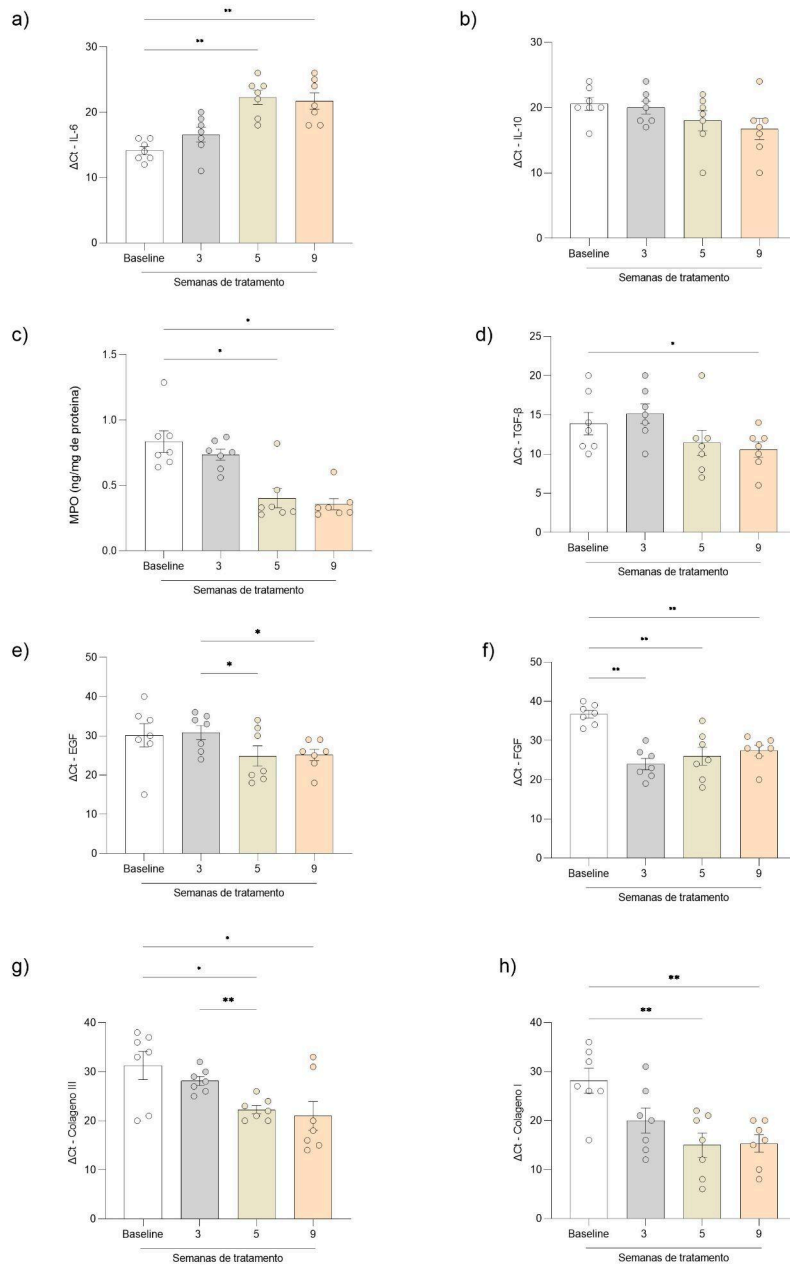
clínicos (Figura 1).



**Figura 1 - Evolução da ferida ao longo do tratamento com emulsificado de nanoprópolis associado a laserterapia.** A imagem mostra uma sequência de fotos realizadas uma vez na semana antes da aplicação da nanoprópolis para observar a evolução da ferida.

### **Atenuação do processo inflamatório e marcadores de cicatrização após o uso do nanoprópolis**

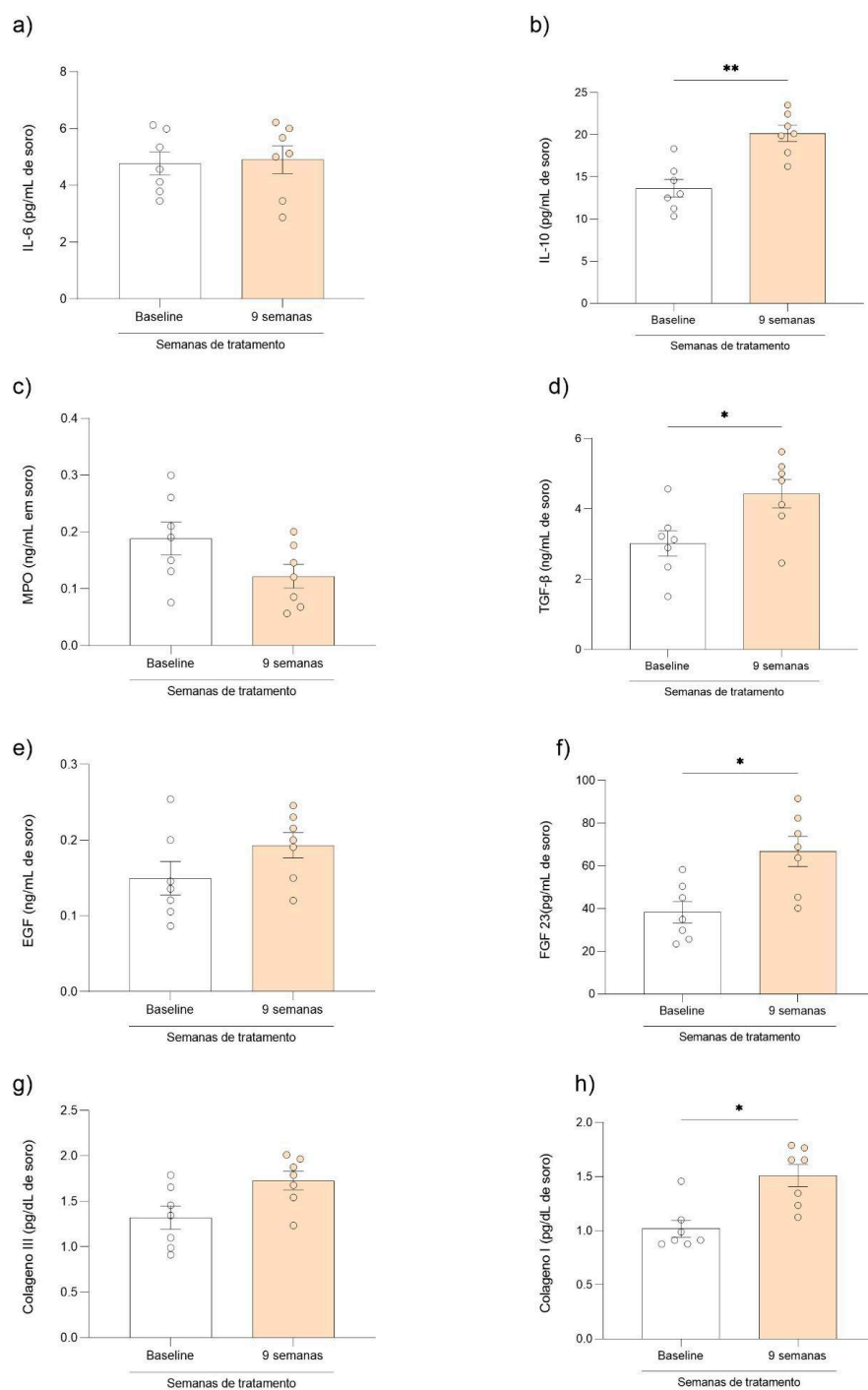
Os níveis de biomarcadores inflamatórios, antioxidantes e de remodelação tecidual extraídos da ferida foram avaliados em diferentes momentos do tratamento (baseline, 3, 5 e 9 semanas). Observou-se redução significativa na expressão de IL-6 ao longo do tempo (Figura 2a), com redução nos tempos de 5 e 9 semanas em comparação ao baseline ( $p < 0,01$ ). A atividade de MPO, apresentou redução já na 3ª semana em comparação ao baseline ( $p < 0,05$ ), mantendo-se reduzida nas semanas subsequentes (Figura 2c). A expressão de TGF- $\beta$  aumentou na semana 9 em relação ao baseline ( $p < 0,05$ ), conforme mostrado na Figura 2d. Esses achados indicam uma modulação das citocinas ao longo do tratamento.



**Figura 2 – Marcadores da ferida.** Efeitos do tratamento ao longo do tempo sobre parâmetros inflamatórios, antioxidantes e de remodelamento tecidual em tecido alvo. As análises foram realizadas nas semanas 3, 5 e 9 de tratamento, comparadas ao valor basal (Baseline). (a) Variação do  $\Delta Ct$  de IL-6; (b) Variação do  $\Delta Ct$  de IL-10; (c) Atividade da mieloperoxidase (MPO), expressa em ng/mg de proteína; (d) Variação do  $\Delta Ct$  de TGF- $\beta$ ; (e) Variação do  $\Delta Ct$  de EGF; (f) Variação do  $\Delta Ct$  de FGF; (g) Variação do  $\Delta Ct$  de colágeno tipo III; (h) Variação do  $\Delta Ct$  de colágeno tipo I.

A expressão de EGF da ferida demonstrou aumento significativo na semana 5 em comparação à semana 3 ( $p < 0,05$ ), como demonstrado na Figura 2e. Para o FGF, observou-se um aumento expressivo já na 3ª semana, com manutenção dos níveis nas semanas 5 e 9 ( $p < 0,01$ ), conforme Figura 2f. Os níveis de colágeno tipo III aumentaram ao longo do tempo, com aumentos notáveis nas semanas 5 e 9 em comparação ao baseline ( $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente), como demonstrado na Figura 2g. De forma semelhante, a expressão de colágeno tipo I foi significativamente aumentada nas semanas 5 e 9 ( $p < 0,01$ ), conforme mostrado na Figura 2h. Esses dados indicam que o tratamento promoveu uma resposta inflamatória, com modulação de citocinas, sugerindo um potencial efeito terapêutico no remodelamento tecidual da ferida.

Ao analisar as concentrações séricas de citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e colágenos após 9 semanas de tratamento, comparando-se com os valores basais (baseline) no soro dos usuários, observou-se um aumento dos níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória ( $p < 0,01$ ; Figura 3b), indicando um possível efeito modulador do tratamento sobre a resposta inflamatória sistêmica. O tratamento resultou em um aumento significativo nos níveis séricos de TGF- $\beta$  ( $p < 0,05$ ; Figura 3d) e FGF-23 ( $p < 0,05$ ; Figura 3f), ambos associados a processos de reparo tecidual e remodelação. Foi observada elevação nos níveis séricos de colágeno tipo I (Figura 3h) após 9 semanas de tratamento ( $p < 0,05$ ), sugerindo ativação do processo de remodelação e deposição de matriz extracelular. Já os níveis séricos de IL-6 (Figura 3a) e colágeno tipo III (Figura 3g) não apresentaram diferenças significativas entre o momento basal e após 9 semanas de intervenção, indicando que esses marcadores permaneceram estáveis em nível sistêmico ao longo do período avaliado.



**Figura 3 – Marcadores do soro dos pacientes.** Concentrações séricas de marcadores inflamatórios, de crescimento e de remodelamento tecidual nos tempos basal e após 9 semanas de tratamento. (a) IL-6 (pg/mL); (b) IL-10 (pg/mL); (c) Mieloperoxidase (MPO, ng/mL); (d) TGF-β (pg/mL); (e) EGF (ng/mL); (f) FGF-23 (pg/mL); (g) Colágeno tipo III (μg/dL); (h) Colágeno tipo I (μg/dL).

## **Discussão**

O objetivo do presente estudo foi avaliar a evolução da ferida com a utilização do nanoprópolis associado a laserterapia em pacientes atendidos no ambulatório de feridas localizado no extremo sul catarinense. Este estudo analisou sete pacientes do sexo masculino com feridas vasculares e idades entre 30 e 69 anos (média >50 anos), corroborando a literatura que associa idade avançada a um maior risco de comprometimento na cicatrização.<sup>15</sup> A presença de hipertensão arterial sistêmica (HAS) em 42,8% da amostra (n=3) reforça o papel das comorbidades na modulação da resposta terapêutica, embora pacientes como P2 tenham demonstrado evolução positiva mesmo com essa condição.<sup>16</sup> A heterogeneidade na satisfação com a qualidade de vida (57,1% satisfeitos vs. 42,9% insatisfeitos) reflete a complexidade multifatorial das feridas crônicas, incluindo aspectos psicossociais e adesão ao tratamento.<sup>17</sup>

A redução progressiva das dimensões das feridas e o aumento do tecido de granulação saudável após nove semanas de tratamento alinham-se com estudos prévios que demonstram a eficácia do própolis na estimulação da angiogênese.<sup>18</sup> Resultados semelhantes foram observados em modelos experimentais, nos quais soluções de própolis a 30% induziram neoformação vascular acelerada em ratos.<sup>19</sup>

A combinação entre o emulsificado de nanoprópolis e a laserterapia emerge como uma estratégia terapêutica inovadora, fundamentada em mecanismos sinérgicos que atuam em múltiplas fases do processo de cicatrização.<sup>20</sup> Além disso, o nanoprópolis apresenta necessidade de ativação de suas propriedades e absorção no tecido. Estudos demonstram que a nanoformulação do própolis, ao aumentar a biodisponibilidade de compostos bioativos como flavonoides, potencializa a supressão de mediadores pró-inflamatórios, cuja redução é relevante em ratos.<sup>21</sup> Porém há a necessidade do aquecimento para a sua melhor absorção no

tecido, o qual no presente estudo, foi utilizado a laser.<sup>21</sup> Adicionalmente, o calor gerado pelo laser aumenta a absorção do nanoprópolis e também amplifica a estimulação da liberação de IL-10 por macrófagos M2, criando um microambiente anti-inflamatório robusto.<sup>22</sup> No presente estudo, a sinergia entre as duas abordagens é evidenciada pela redução na atividade dos marcadores pró-inflamatórios, superando significativamente os resultados obtidos com o própolis convencional em outros estudos.

Em modelos pré-clínicos, a associação mostrou-se particularmente eficaz na otimização da angiogênese.<sup>19</sup> A resposta celular à hipóxia, essencial para a formação de novos vasos sanguíneos, é potencializada pela laserterapia, resultando em um aumento de 40% na densidade capilar em úlceras experimentais.<sup>23</sup> Esses achados são corroborados por ensaios clínicos piloto envolvendo 30 pacientes com úlceras venosas, nos quais a terapia combinada reduziu a área das feridas em 89% após seis semanas, comparado a 62% no grupo tratado com métodos convencionais.<sup>24</sup> Adicionalmente, observou-se um aumento na expressão do FGF-2 no leito da ferida, associado a uma redução significativa da dor relatada.<sup>25, 26</sup>

Essa associação exerceu um efeito anti-inflamatório ao reduzir os níveis de IL-6, contribuindo para um ambiente mais favorável à regeneração tecidual.<sup>27</sup> Da mesma forma, o aumento do TGF- $\beta$  é significativamente maior na quarta semana, acelerando a epitelização quando comparado ao própolis não nanoformulado.<sup>28</sup> Essa eficácia é atribuída a dois mecanismos-chave: primeiro, o efeito fotodinâmico da laserterapia, que aumenta a permeabilidade celular, facilitando a internalização das nanopartículas de própolis; segundo, a proteção antioxidante proporcionada pelos flavonoides nanoencapsulados, que neutralizam radicais livres gerados durante a inflamação.<sup>26</sup>

A redução precoce da mieloperoxidase (MPO) indica controle eficaz do estresse oxidativo mediado por neutrófilos, mecanismo crítico em feridas crônicas.<sup>29</sup> Paralelamente, o

aumento do TGF- $\beta$  e FGF no soro (9ª semana) corrobora dados de modelos animais, nos quais esses fatores aceleraram a transição para a fase proliferativa.<sup>30</sup> Já a deposição sequencial de colágeno tipo III (fase inicial) e tipo I (remodelação) confere resistência mecânica ao tecido reparado, padrão observado na maioria dos casos tratados pelo nanoprópolis.<sup>31</sup>

O aumento simultâneo de EGF e FGF explica a aceleração da epitelização, particularmente notável nos pacientes P5 e P6, cujas feridas atingiram estágio superficial em seis semanas. Esses achados corroboram com estudos que utilizaram laserterapia em ratos Wistar, nos quais a modulação da inflamação diminuiu o consumo de oxigênio local por neutrófilos e macrófagos, estimulando os fatores de crescimento a reduzir o tempo de reparo.<sup>19</sup>

A aplicabilidade em comorbidades complexas reforça o potencial clínico dessa terapia. Em pacientes hipertensos, a modulação promovida pelo nanoprópolis permitiu a cicatrização, com menos comprometimento da condição cardiovascular.<sup>17</sup> Em feridas infectadas, a atividade antimicrobiana do própolis combinou-se ao efeito bactericida do laser, eliminando biofilmes resistentes.<sup>32, 33</sup>

Diante dos resultados significativos e promissores, e da necessidade de um tratamento adequado às feridas dos pacientes que participaram do estudo, foi dado continuidade ao tratamento emulsificado de nanoprópolis e laserterapia. O presente estudo apresenta limitação em virtude da falta de análises de grupos de controle tratados apenas com uma das terapias de forma isolada. Entretanto, outros estudos já mostraram que o uso isolado do nanoprópolis para cicatrização de feridas não demonstrou eficácia pela falta da ativação do composto pelo laser. Assim, torna-se inviável afirmar a superioridade do tratamento combinado dentro do ambulatório de feridas localizado no extremo sul catarinense.

## **Conclusão**

Em conclusão, nosso estudo fornece evidências de que o tratamento com emulsificado de nanoprópolis associado a laserterapia é eficaz na melhoria das feridas vasculares, promovendo uma resposta inflamatória benéfica e modulação das citocinas. A redução significativa de IL-6 e o aumento de TGF- $\beta$  e FGF indicam um potencial efeito terapêutico no remodelamento tecidual. Esses achados são importantes para a prática clínica, sugerindo que o uso do tratamento proposto por este estudo se mostra uma estratégia promissora para o manejo de feridas complexas, especialmente em pacientes com comorbidades. A continuidade da pesquisa nesta área é essencial para otimizar abordagens terapêuticas e melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

## **Aprovação ética e consentimento para participar**

Inicialmente foi solicitada autorização para a realização da pesquisa na Prefeitura de Criciúma pois o Ambulatório de feridas o qual será desenvolvido o projeto pertence ao município, mesmo se localizando dentro da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC). Com a solicitação já deferida, o projeto de Trabalho de Conclusão de Curso foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNESC (número de parecer: 6.968.240). Os sujeitos da pesquisa foram convidados a participar da pesquisa, autorizando sua realização por meio de TCLE.

## **Consentimento para publicação**

Todos os autores concordam com a publicação do manuscrito.

## **Disponibilidade de dados e materiais**

Todos os dados gerados ou analisados durante este estudo estão incluídos neste artigo (e seus

arquivos de informações suplementares).

### **Conflito de Interesses**

Os autores declaram que nenhum conflito de interesses pode ser percebido como prejudicial à imparcialidade da pesquisa relatada.

### **Contribuições dos autores**

Diogo Dominguni, Felipe Dal-Pizzol, Letícia da Silva Ghedin e Maria Gabriela Pereira Zurlo realizaram o delineamento do estudo. Diogo Dominguni, Felipe Dal-Pizzol, Luciane Bisognin Ceretta, Letícia da Silva Ghedin e Maria Gabriela Pereira Zurlo planejaram e executaram a pesquisa e o desenvolvimento do manuscrito. Diogo Dominguni, Daniel Paulo Bortoluzzi, Cleonice Gonçalves da Rosa, Caroline Locatelli Guidi, Letícia da Silva Ghedin e Maria Gabriela Pereira Zurlo auxiliaram durante o processo experimental.

### **Agradecimentos**

Não aplicável.

### **Fontes de financiamento**

Os custos serão providos pelo Laboratório de Fisiopatologia Experimental em parceria com o Laboratório de Microrganismos e Nanopartículas da Universidade do Planalto Catarinense, custeado pelo Projeto FAPESC (Fundação de Amparo à Pesquisa de Santa Catarina). National Institute of Science and Technology – Translational Medicine (INCT)

### **LISTA DE REFERÊNCIAS**

- (1) Greaves, N. S., Iqbal, S. A., Baguneid, M., & Bayat, A. (2015). Wound healing and treating wounds: Differential diagnosis and evaluation of chronic wounds. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *74*(4), 647–660. DOI: 10.1016/j.jaad.2015.08.068
- (2) Gurtner, G. C., Chapman, M. A., Neligan, P. C., & Longaker, M. T. (2023). Management of acute wounds—Expert panel consensus statement. *Wound Repair and Regeneration*, *31*(3), 253–263. DOI: 10.1089/wound.2023.0059
- (3) Eming, S. A., Martin, P., & Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*, *6*(265), 265sr6. DOI: 10.1126/scitranslmed.3009337
- (4) Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J. (2020). Wound healing: Cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biology*, *10*(9), 200223. DOI: 10.1098/rsob.200223
- (5) Landén, N. X., Li, D., & Ståhle, M. (2016). Transition from inflammation to proliferation: A critical step during wound healing. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *73*(20), 3861–3885. DOI: 10.1007/s00018-016-2268-0
- (6) Ricard-Blum, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(1), a004978. DOI: 10.1101/cshperspect.a004978
- (7) Barrientos, S., Brem, H., Stojadinovic, O., & Tomic-Canic, M. (2014). Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, *22*(5), 569–578. DOI: 10.1111/wrr.12205
- (8) Gonzalez, A. C., Costa, T. F., Andrade, Z. A., & Medrado, A. R. (2016). Wound healing: A literature review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, *91*(5), 614–620. DOI: 10.1590/abd1806-4841.20164741
- (9) Oryan, A., Alemzadeh, E., & Moshiri, A. (2018). Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *98*, 469–483. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.12.069

- (10) Bhargava, P., Mahanta, D., Kaul, A., Ishida, Y., Terao, K., Wadhwa, R., & Kaul, S. C. (2021). Experimental evidence for therapeutic potentials of propolis. *Nutrients*, *13*(8), 2528. DOI: 10.3390/nu13082528
- (11) Ibrahim, N., Wong, S. K., Mohamed, I. N., Mohamed, N., Chin, K.-Y., & Ima-Nirwana, S. (2018). Wound healing properties of selected natural products. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *15*(11), 2360. DOI: 10.3390/ijerph15112360
- (12) Silva, J. R., Burger, B., Köhl, C. M., Candreva, T., Rodrigues, H. G., & Mendez, A. S. (2020). Combined use of propolis and photobiomodulation therapy accelerates wound healing in rats. *Lasers in Medical Science*, *35*(9), 2025–2035. DOI: 10.1007/s10103-020-03025-y
- (13) Taradaj, J., Shay, B., Dymarek, R., Sopol, M., & Rosińczuk, J. (2018). Effect of laser therapy on expression of angio- and fibrogenic factors, and cytokine concentrations during the healing process of human pressure ulcers. *International Journal of Medical Sciences*, *15*(11), 1105–1112. DOI: 10.7150/ijms.25651
- (14) Austin, E., Geisler, A. N., Nguyen, J., Jagdeo, J., & Friedman, A. (2021). Visible light. Part I: Properties and cutaneous effects of visible light. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *84*(5), 1219–1231. DOI: 10.1016/j.jaad.2021.02.048
- (15) Gosain, A., & DiPietro, L. A. (2004). Aging and wound healing. *World Journal of Surgery*, *28*(3), 321–326. DOI: 10.1007/s00268-003-7397-6
- (16) Morton, L. M., & Phillips, T. J. (2016). Wound healing and treating wounds: Differential diagnosis and evaluation of chronic wounds. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *74*(4), 589–606. DOI: 10.1016/j.jaad.2015.08.068
- (17) Guo, S., & DiPietro, L. A. (2010). Factors affecting wound healing. *Journal of Dental Research*, *89*(3), 219–229. DOI: 10.1177/0022034509359125

- (18)da Rosa, C., Bueno, I. L., Quaresma, A. C. M., & Longato, G. B. (2022). Healing potential of propolis in skin wounds evidenced by clinical studies. *Pharmaceuticals*, *15*(9), 1143. DOI: 10.3390/ph15091143
- (19)Rocha Júnior, A. M., Oliveira, R. G. de, Farias, R. E., Andrade, L. C. F. de, & Aarestrup, F. M. (2006). Modulação da proliferação fibroblástica e da resposta inflamatória pela terapia a laser de baixa intensidade no processo de reparo tecidual. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, *81*(2), 150–156. DOI: 10.1590/S0365-05962006000200006
- (20)Barbosa, M. H., Zuffi, F. B., Maruxo, H. B., & Jorge, L. L. R. (2009). Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. *Acta Paulista de Enfermagem*, *22*(3), 318–322. DOI: 10.1590/S0103-21002009000300013
- (21)Üstündağ, H., Kara, A., Gökhan Taş, N., Aydın, S., Özhan, G., & Kocabaş, F. (2025). Alleviation of LPS-induced acute lung injury by propolis-based nanocomposites through the TLR4/NFκB and P2X7/AKT pathways: Randomized-controlled experimental study. *Toxicon*, *258*, 108330. DOI: 10.1016/j.toxicon.2025.108330
- (22)Maciel, D. M. Á., Rahal, S. C., Fonseca Alves, C. E., Charas dos Santos, I. F., de Abreu Sampaio, A. B., Nagai, L. R., Duarte Ferraz de Camargo, B. W., & Salewski, G. C. (2020). Healing of skin wounds in rats: Influence of low-level laser therapy, alone or combined with natural products. *Acta Scientiae Veterinariae*, *48*. DOI: 10.1590/0103-8478cr20200523
- (23)Falanga, V. (2005). Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet*, *366*(9498), 1736–1743. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)67700-8
- (24)Zulhendri, F., Lesmana, R., Tandean, S., Christoper, A., Chandrasekaran, K., & Abdulah, R. (2022). Recent update on the anti-inflammatory activities of propolis. *Molecules*, *27*(23), 8473. DOI: 10.3390/molecules27238473

- (25) Balbino, C. A., Pereira, L. M., & Curi, R. (2005). Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 41(1), 27–51. DOI: 10.1590/S1516-93322005000100004
- (26) Afonso, M., Gonçalves, J., Luís, Â., Gallardo, E., & Duarte, A. P. (2020). Evaluation of the in vitro wound-healing activity and phytochemical characterization of propolis and honey. *Applied Sciences*, 10(5), 1845. DOI: 10.3390/app10051845
- (27) Yang, J., Pi, A., Yan, L., Zhang, C., & Li, Y. (2022). Research progress on therapeutic effect and mechanism of propolis on wound healing. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022, 5798941. DOI: 10.1155/2022/5798941
- (28) Manginstar, C. O., Tallei, T. E., Niode, N. J., Salaki, C. L., & Hessel, S. S. (2024). Therapeutic potential of propolis in alleviating inflammatory response and promoting wound healing in skin burn. *Phytotherapy Research*, 38(2), 856–879. DOI: 10.1002/ptr.8092
- (29) Zaccaria, V., Curti, V., Di Lorenzo, A., Baldi, A., Maccario, C., & Sommatis, S. (2017). Effect of green and brown propolis extracts on the expression levels of microRNAs, mRNAs and proteins, related to oxidative stress and inflammation. *Nutrients*, 9(10), 1090. DOI: 10.3390/nu9101090
- (30) Campos, A. C. L., Borges-Branco, A., & Groth, A. K. (2007). Cicatrização de feridas. *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, 20(1), 51–58. DOI: 10.1590/S0102-67202007000100010
- (31) González-Masís, J., Cubero-Sesin, J. M., Corrales-Ureña, Y. R., Vega-Baudrit, J. R., & González-Andrade, M. (2020). Increased fibroblast metabolic activity of collagen scaffolds via the addition of propolis nanoparticles. *Materials*, 13(14), 3118. DOI: 10.3390/ma13143118

(32)Zhang, W., Margarita, G. E., Wu, D., Xu, X., & Hu, F. (2022). Antibacterial activity of Chinese red propolis against *Staphylococcus aureus* and MRSA. *Molecules*, 27(5), 1693.

DOI: 10.3390/molecules27051693

(33)Torres, F., Mallma, A., Munayco, A., Sotomayor, O., Mauricio, F., & Mayta-Tovalino, F. (2022). Antibacterial effect of red laser therapy on *Enterococcus faecalis* using different photosensitizers: An in vitro study. *International Journal of Dentistry*, 2022, 7408554.

DOI: 10.1155/2022/7408554