UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

CRISTIANO DA ROSA

EFEITOS DA PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA NAS FASES INFLAMATÓRIA E PROLIFERATIVA DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS CUTÂNEAS

Bragança Paulista

2026

CRISTIANO DA ROSA – R.A. 202239728

EFEITOS DA PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA NAS FASES INFLAMATÓRIA E PROLIFERATIVA DO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE ÚLCERAS CUTÂNEAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Giovanna Barbarini Longato

Co-orientadora: Profa. Dra. Karen Sánchez Luquez

Bragança Paulista

2026

WR 598
R694e

Rosa, Cristiano da
Efeitos da própolis verde brasileira nas fases inflamatória e proliferativa do processo de cicatrização de úlceras cutânea / Cristiano da Rosa. – Bragança Pauliasta, 2026.
54 p.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.
Orientação de: Giovanna B. Longato
Co-orientação: Karen Sánchez Luquez

1. Citocinas. 2. Cicatrização. 3. Queratinócitos. 4. Úlcera cutânea. 5. Própolis.. I. Longato, Giovanna B. II. Sánchez Luquez, Karen. III. Título.

Sistema de Bibliotecas da Universidade São Francisco – USF
Ficha catalográfica elaborada por: Denise Isabel Arten - CRB-8/5823



ROSA, Cristiano da. "Efeitos da própolis verde brasileira nas fases inflamatória e proliferativa do processo de cicatrização de úlceras cutâneas". Tese defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 27 de julho de 2026 pela Banca examinadora constituída pelos membros:

Prof(a). Dr(a). Giovanna Barbarini Longato
Orientador(a) e Presidente
Universidade São Francisco

Prof(a). Dr(a). Erivelto Luis Chacon
(por videoconferência)
Centro Universitário Padre Anchieta

Prof(a). Dr(a). Ivan Gustavo Masselli dos Reis
Universidade São Francisco

Prof(a). Dr(a). José Aires Pereira
Universidade São Francisco

Prof(a). Dr(a). Sônia Regina Pérez Evangelista Dantas
(por videoconferência)
Universidade Estadual de Campinas

AGRADECIMENTOS

Ao longo da vida, aprendemos que nenhuma caminhada verdadeiramente significativa é construída de forma solitária. Esta tese, mais do que um trabalho acadêmico, representa uma trajetória marcada por desafios, renúncias, amadurecimento e, sobretudo, encontros humanos que deram sentido a cada etapa deste percurso. Assim, encerrar este ciclo exige, antes de tudo, reconhecer com profunda gratidão aqueles que caminharam comigo.

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Antônio e Gerdulina, por terem sido meu primeiro exemplo de força, dignidade e perseverança. Tudo aquilo que sou carrega, inevitavelmente, marcas do amor, dos ensinamentos e dos valores que vocês me transmitiram ao longo da vida. Obrigado por acreditarem em mim mesmo nos momentos em que eu duvidei das minhas próprias capacidades. Esta conquista também pertence a vocês.

Aos meus filhos, Giulia e Lucca, razão maior da minha existência e inspiração diária para continuar seguindo em frente. Vocês transformam os dias difíceis em esperança e me lembram constantemente sobre aquilo que realmente importa na vida. Cada página escrita carrega também o desejo de construir um futuro do qual vocês possam se orgulhar. Obrigado por serem minha luz, meu amor e minha maior razão para continuar caminhando.

À minha noiva, Beatriz, meu agradecimento mais profundo pelo amor, pela compreensão e pela presença constante durante esta trajetória. Obrigado por permanecer ao meu lado nos momentos de cansaço, ansiedade e silêncio, compreendendo as ausências necessárias que este processo exigiu. Seu apoio, incentivo e carinho foram fundamentais para que eu encontrasse equilíbrio e forças para continuar. Dividir a vida com você torna todas as conquistas mais significativas.

À minha orientadora, Profª Dra. Giovanna Barbarini Longato, expresso a minha mais sincera admiração e gratidão. Muito além da orientação acadêmica, sua presença foi essencial na construção desta trajetória científica e humana. Obrigado pela confiança depositada em mim, pela generosidade intelectual, pela paciência diante das dificuldades e pelo rigor científico conduzido sempre com sensibilidade e humanidade. Sua capacidade de ensinar ultrapassa o conhecimento técnico; ela inspira, acolhe e transforma. Tive o privilégio de encontrar em sua orientação não apenas uma pesquisadora brilhante, mas também alguém que compreende a ciência como instrumento de cuidado, responsabilidade e impacto humano. Levarei comigo, para além desta tese, os ensinamentos, os conselhos e o exemplo profissional que recebi ao longo desse caminho.

Aos meus irmãos Jonas, Simone e Mateus, agradeço pelo incentivo, pelas palavras de apoio e por compreenderem os momentos de ausência necessários durante esta jornada. O carinho e a presença de cada um foram essenciais para tornar o percurso mais leve.

Meu agradecimento especial à Larissa e ao Ian, que contribuíram de forma significativa para o desenvolvimento deste estudo. Obrigado pela disponibilidade, colaboração, dedicação e auxílio em diferentes etapas da pesquisa. Toda construção científica também nasce da soma de esforços, e a participação de vocês foi extremamente importante para a concretização do trabalho.

Agradeço igualmente a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para esta pesquisa, seja por meio de apoio técnico, científico, institucional ou humano. Nenhum trabalho dessa magnitude é realizado sozinho.

Minha gratidão mais respeitosa e sensível aos participantes de pesquisa. Cada indivíduo que aceitou participar, permitiu que esta investigação ultrapassasse os limites teóricos e alcançasse seu verdadeiro propósito humano. A confiança depositada neste trabalho representa uma responsabilidade ética que levarei comigo em toda minha trajetória profissional e acadêmica.

Por fim, agradeço à Universidade São Francisco, expresso minha sincera gratidão pelo suporte acadêmico, científico e humano proporcionado, tornando possível a concretização deste trabalho por meio da concessão da bolsa de estudos.

“Aprendi que as pessoas esquecerão o que você disse, esquecerão o que você fez, mas jamais esquecerão como você as fez sentir. Em profissões dedicadas ao cuidado humano, o conhecimento técnico é indispensável, mas é a empatia que dá sentido à prática. A verdadeira grandeza da ciência e da educação está na capacidade de utilizar o saber para acolher, compreender e transformar a vida daqueles que atravessam momentos de fragilidade e sofrimento.”

Maya Angelou

RESUMO

O manejo de úlceras cutâneas crônicas representa um importante desafio clínico em virtude da persistência do processo inflamatório, da elevada carga microbiana, da resistência à cicatrização e das múltiplas comorbidades frequentemente associadas, fatores que comprometem o reparo tecidual e impactam negativamente a qualidade de vida dos pacientes. Nesse contexto, a busca por terapias alternativas baseadas em compostos naturais tem despertado crescente interesse devido ao seu potencial terapêutico, baixo custo e ampla disponibilidade quando comparadas aos tratamentos convencionais. Entre esses compostos, a própolis verde brasileira destaca-se por suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes e imunomoduladoras, atribuídas principalmente à presença de compostos fenólicos bioativos. Em estudo clínico piloto previamente conduzido por nosso grupo de pesquisa (CAAE: 48002021.0.0000.5514), observou-se redução significativa da área de úlceras cutâneas decorrentes da hanseníase tratadas com pomada contendo extrato de própolis verde brasileira (EPV), evidenciando seu potencial como agente cicatrizante. Dando continuidade a essa linha de investigação, o presente estudo teve como objetivo investigar os possíveis mecanismos biológicos envolvidos nessa resposta terapêutica. Para isso, foi avaliada, in vitro, a capacidade do EPV, nas concentrações de 0,25 a 125 µg/mL durante 48 horas, de estimular a proliferação de fibroblastos humanos e queratinócitos por meio do ensaio colorimétrico de MTT e leitura espectrofotométrica. Adicionalmente, investigou-se sua atividade antimicrobiana frente à microbiota cutânea e a isolados clínicos de Staphylococcus aureus por meio da técnica de difusão em disco (CAAE: 44416021.3.0000.5514), bem como sua influência sobre a expressão dos genes TNF-α, IL-6 e MMP-9. Complementarmente, exsudatos provenientes das úlceras tratadas no estudo clínico foram analisados por tecnologia Luminex para quantificação das proteínas TNF-α, VEGF-A e MMP-1, possibilitando correlacionar os achados experimentais com a resposta clínica observada. Os resultados demonstraram que o EPV promoveu aumento da proliferação de fibroblastos e queratinócitos, células essenciais para a formação do tecido de granulação e para a reepitelização, além de apresentar atividade antimicrobiana seletiva contra Staphylococcus aureus. As análises moleculares evidenciaram modulação da expressão dos genes TNF-α, IL-6 e MMP-9, sugerindo redução da resposta inflamatória exacerbada e melhor controle do remodelamento da matriz extracelular. Esses achados foram corroborados pela análise dos exsudatos das úlceras, que revelou importante ação anti-inflamatória do extrato, evidenciada principalmente pela modulação de TNF-α, além da manutenção de mediadores relacionados à angiogênese e ao remodelamento tecidual, como VEGF-A e MMP-1. Em conjunto, os resultados demonstram que a própolis verde brasileira exerce ação multifatorial, combinando atividade antimicrobiana, estímulo à proliferação celular e modulação da resposta inflamatória, favorecendo a progressão das diferentes fases da cicatrização e reforçando seu potencial como alternativa terapêutica promissora para o tratamento de úlceras cutâneas crônicas.

Palavras-chave: Citocinas. Cicatrização. Queratinócitos. Úlcera Cutânea. Própolis.

ABSTRACT

The management of chronic cutaneous ulcers remains a major clinical challenge due to persistent inflammation, high microbial burden, impaired wound healing, and the multiple comorbidities commonly associated with these lesions, all of which compromise tissue repair and negatively impact patients' quality of life. In this context, the search for alternative therapies based on natural compounds has gained increasing attention because of their therapeutic potential, low cost, and wide availability compared with conventional treatments. Among these compounds, Brazilian green propolis stands out for its anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties, which are mainly attributed to its high content of bioactive phenolic compounds. In a previous pilot clinical study conducted by our research group (CAAE: 48002021.0.0000.5514), a significant reduction in the area of leprosy-related cutaneous ulcers treated with an ointment containing Brazilian green propolis extract (BPE) was observed, highlighting its potential as a wound-healing agent. Building upon these findings, the present study aimed to investigate the biological mechanisms underlying this therapeutic response. To this end, the ability of BPE, at concentrations ranging from 0.25 to 125 µg/mL for 48 hours, to stimulate the proliferation of human fibroblasts and keratinocytes was evaluated in vitro using the colorimetric MTT assay followed by spectrophotometric analysis. Additionally, its antimicrobial activity against the skin microbiota and clinical isolates of Staphylococcus aureus was investigated using the disk diffusion method (CAAE: 44416021.3.0000.5514), as well as its effects on the expression of the TNF-α, IL-6, and MMP-9 genes. Furthermore, wound exudates collected from ulcers treated during the clinical study were analyzed using Luminex technology to quantify TNF-α, VEGF-A, and MMP-1, allowing the experimental findings to be correlated with the observed clinical response. The results demonstrated that BPE enhanced the proliferation of fibroblasts and keratinocytes, two cell types that play essential roles in granulation tissue formation and re-epithelialization. Moreover, BPE exhibited selective antimicrobial activity against Staphylococcus aureus. Molecular analyses revealed modulation of TNF-α, IL-6, and MMP-9 gene expression, suggesting attenuation of the exacerbated inflammatory response and improved regulation of extracellular matrix remodeling. These findings were further supported by the analysis of wound exudates, which demonstrated a significant anti-inflammatory effect of the extract, primarily evidenced by the modulation of TNF-α, while preserving mediators associated with angiogenesis and tissue remodeling, including VEGF-A and MMP-1. Collectively, these findings demonstrate that Brazilian green propolis exerts a multifactorial therapeutic effect by combining antimicrobial activity, stimulation of cell proliferation, and modulation of the inflammatory response, thereby promoting the progression of the different phases of wound healing and reinforcing its potential as a promising therapeutic alternative for the treatment of chronic cutaneous ulcers.

Keywords: *Cytokines. Wound Healing. Keratinocytes. Skin Ulcer. Propolis.*

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIAÇÕES

CAAE Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

PUSH Pressure Ulcer Scale for Healing

TNF Tumor Necrosis Factor (Fator de Necrose Tumoral)

TNF-α Fator de Necrose Tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor alpha)

IL-6 Interleucina 6

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)

MMP Matrix Metalloproteinase (Metaloproteinase de Matriz)

MMP-1 Metaloproteinase de Matriz 1 (Colagenase-1)

MMP-9 Metaloproteinase de Matriz 9 (Gelatinase B)

MEC Matriz Extracelular

EPV Extrato de Própolis Verde

HFF1 Human Foreskin Fibroblast 1 (Fibroblastos de prepúcio humano – linhagem HFF1)

HaCaT Human Adult Low Calcium High Temperature Keratinocytes (Linhagem imortalizada de queratinócitos humanos)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática das fases do processo cicatricial.

Figura 2 – Compostos fenólicos e flavonoides com respectivas ações biológicas e fórmulas químicas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 12
2. OBJETIVOS 26
3. CAPÍTULO 1: ARTIGO SUBMETIDO 27
4. CONCLUSÂO.....50
REFERÊNCIAS

1. INTRODUÇÃO

Esta tese de doutorado é um desdobramento direto do estudo clínico inicial conduzido durante o mestrado, intitulado “Avaliação clínica da atividade cicatrizante de pomada contendo própolis verde em pacientes com úlceras em membros inferiores decorrentes de hanseníase”. A pesquisa foi realizada na Associação Filantrópica Humanitas, em São Jerônimo da Serra, Paraná, e delineada como um ensaio clínico randomizado, cego e controlado por placebo, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sob o CAAE nº 48002021100005514.

Após o recrutamento dos participantes, procedeu-se à randomização entre grupo investigacional (pomada de própolis verde Humanitas) e grupo controle (base da pomada). Durante 60 dias, foram realizadas oito avaliações clínicas seriadas, contemplando registro fotográfico das lesões, realização de decalques e aplicação da escala PUSH (Pressure Ulcer Scale for Healing) para acompanhamento da evolução cicatricial. Participaram sete indivíduos curados da hanseníase com presença de feridas crônicas em membros inferiores, sendo seis do sexo masculino e um do sexo feminino, com média de idade de 64,3 anos e tempo médio de lesão de 7,6 anos. Ao todo, foram acompanhadas 13 feridas, das quais seis receberam tratamento com pomada de própolis verde Humanitas e sete receberam apenas a base da formulação.

Durante o acompanhamento clínico, observou-se que os pacientes tratados com a pomada de própolis verde Humanitas apresentaram redução importante da área das lesões, além de melhora significativa no aspecto macroscópico das feridas ao longo das avaliações. Esses achados também foram evidenciados pelos escores obtidos por meio da aplicação da escala PUSH, demonstrando resultados promissores em relação ao processo cicatricial das lesões tratadas. Ressalta-se que todas as feridas avaliadas neste estudo apresentaram reparo tecidual por cicatrização de segunda intenção.

Além dos resultados clínicos obtidos publicados no estudo intitulado “Randomized clinical evaluation of the healing activity of green propolis ointment in individuals with lower limb ulcers resulting from leprosy: preliminary results of a pilot study” por ROSA et al. (2024), a pesquisa possibilitou a coleta de exsudato das lesões, material biológico que constituiu a base inicial para o desenvolvimento da presente tese. Nesse contexto, esta pesquisa de doutorado representa a continuidade e o aprofundamento de uma investigação previamente iniciada, ampliando as análises experimentais e contribuindo para uma compreensão mais abrangente dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos na atividade cicatrizante da própolis verde brasileira em feridas crônicas.

1.1 Úlceras cutâneas

As feridas crônicas representam um relevante desafio para os sistemas de saúde pública em âmbito mundial, em virtude de sua elevada prevalência, complexidade fisiopatológica e importante impacto socioeconômico. Essas lesões caracterizam-se pela interrupção do processo fisiológico normal de cicatrização, permanecendo em um estado inflamatório persistente e desregulado, frequentemente associado à destruição progressiva do tecido, presença de tecido necrótico, elevada carga microbiana e comprometimento vascular local. Tal condição favorece a perpetuação da lesão e dificulta a restauração adequada da integridade cutânea, contribuindo para a cronificação do processo cicatricial. Diversas condições clínicas e fatores sistêmicos estão relacionados ao desenvolvimento dessas feridas, destacando-se as úlceras de etiologia venosa, arterial, diabética, traumática e infecciosa, além de fatores associados como insuficiência vascular, neuropatias, doenças metabólicas e imunológicas. Nesse contexto, a elevada incidência dessas lesões, somada à complexidade dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos em sua fisiopatologia, reforça a necessidade de aprofundamento científico acerca dos processos inflamatórios, imunológicos e reparativos que participam da cronificação tecidual, assim como do desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes e direcionadas para o manejo clínico dessas lesões (ALMEIDA et al., 2023).

Nas últimas décadas, observa-se um aumento expressivo na prevalência e incidência das úlceras crônicas, fenômeno diretamente relacionado ao envelhecimento populacional, ao aumento da expectativa de vida e à crescente ocorrência de doenças crônicas não transmissíveis, como diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, obesidade e doenças vasculares periféricas. Essas lesões acometem predominantemente os membros inferiores, especialmente regiões abaixo do joelho, e são definidas pela ausência de cicatrização em um período superior a seis semanas, podendo persistir por meses ou até anos. Além da elevada morbidade associada, as úlceras crônicas constituem importante causa de incapacidade funcional, dor persistente, limitação da mobilidade e comprometimento significativo da autonomia dos pacientes. Paralelamente, o manejo prolongado dessas lesões impõe elevado ônus econômico aos sistemas de saúde, em razão da necessidade de acompanhamento contínuo, uso prolongado de curativos especializados, antibioticoterapia, intervenções cirúrgicas e frequentes hospitalizações. Somam-se a isso os impactos psicossociais decorrentes da cronicidade da doença, incluindo isolamento

social, alterações emocionais, ansiedade, depressão e redução substancial da qualidade de vida dos indivíduos acometidos (ABBADE et al., 2020).

Pessoa com feridas crônicas frequentemente necessitam de acompanhamento multiprofissional contínuo, envolvendo médicos, enfermeiros, fisioterapeutas, nutricionistas e outros profissionais da saúde, em decorrência da elevada complexidade clínica e da longa duração do tratamento dessas lesões. O caráter persistente e recidivante das úlceras favorece afastamentos prolongados das atividades laborais e limitações progressivas da capacidade funcional, podendo culminar em aposentadorias precoces e incapacidade permanente para o trabalho. Esse cenário repercute significativamente não apenas sobre os indivíduos acometidos e seus familiares, mas também sobre os sistemas previdenciário e de saúde pública, ampliando os custos diretos e indiretos relacionados ao tratamento e à assistência contínua. Adicionalmente, as repercussões biopsicossociais dessas lesões incluem dor crônica, alterações do sono, restrição das atividades cotidianas, dependência funcional, comprometimento da autoestima e insegurança relacionada à manutenção do vínculo empregatício e da interação social. Dessa forma, o caráter debilitante das feridas crônicas, associado ao elevado impacto econômico e social decorrente de seu manejo, evidencia a necessidade de fortalecimento das políticas públicas voltadas à prevenção, diagnóstico precoce e implementação de estratégias terapêuticas mais eficazes, capazes de reduzir a morbidade associada e melhorar a qualidade de vida desses pacientes (GRAVES et al., 2022).

1.2 Cicatrização de feridas agudas e crônicas

Quando um tecido sofre uma lesão, desencadeia-se imediatamente uma complexa sequência de eventos bioquímicos, celulares, moleculares e vasculares coordenados pelo próprio organismo, com o objetivo de restaurar a integridade estrutural e funcional da área acometida. Esse processo envolve uma interação dinâmica entre células inflamatórias, mediadores químicos, componentes da matriz extracelular e fatores de crescimento, atuando de maneira integrada para promover a remoção de tecidos desvitalizados e a subsequente reparação tecidual. Inicialmente, ocorre uma resposta inflamatória aguda destinada à contenção do dano, eliminação de agentes infecciosos e remoção de debris celulares. Posteriormente, com a redução progressiva do processo inflamatório, caracterizada pelo desaparecimento do exsudato e dos sinais locais e sistêmicos da inflamação, o organismo passa a favorecer os mecanismos de reparo e

reorganização dos tecidos previamente lesados ou necrosados, permitindo a progressão das etapas subsequentes da cicatrização (LEARNED et al., 2023).

A recuperação tecidual pode ocorrer por dois mecanismos biológicos fundamentais: regeneração e cicatrização, cuja predominância depende da capacidade proliferativa das células envolvidas, do tipo de tecido acometido e da extensão da lesão. A regeneração caracteriza-se pela substituição das células lesadas por células estrutural e funcionalmente idênticas às originais, possibilitando a completa restauração da arquitetura e da função tecidual. Esse mecanismo ocorre principalmente em tecidos compostos por células com elevada capacidade proliferativa. Em contrapartida, a cicatrização corresponde à substituição do tecido lesado por tecido conjuntivo fibroso, resultando na formação de uma cicatriz permanente, frequentemente associada a alterações estruturais e funcionais locais. Dessa forma, a natureza do reparo tecidual está diretamente relacionada ao potencial regenerativo do tecido afetado, à intensidade da agressão e às condições sistêmicas do organismo (FILHO, 2021). Do ponto de vista clínico e morfológico, a cicatrização pode ocorrer por primeira ou segunda intenção. A cicatrização por primeira intenção, também denominada intenção primária, ocorre em feridas com mínima perda tecidual, ausência de infecção significativa, reduzido edema e bordas aproximadas, condições que favorecem rápida reepitelização, menor deposição de tecido de granulação e formação de cicatriz menos exuberante. Em contraste, a cicatrização por segunda intenção ocorre em lesões extensas, com perda significativa de tecido, bordas afastadas ou presença de contaminação e infecção. Nesses casos, observa-se intensa formação de tecido de granulação, maior deposição de matriz extracelular e prolongamento do processo reparativo, culminando frequentemente em cicatrizes maiores e alterações funcionais mais evidentes (KUMAR et al., 2023).

O processo de cicatrização é classicamente dividido em três fases interdependentes e parcialmente sobrepostas: inflamatória, proliferativa e de remodelamento ou maturação. A **fase inflamatória** inicia-se imediatamente após a lesão e caracteriza-se, inicialmente, por vasoconstrição transitória e ativação plaquetária, mecanismos essenciais para a hemostasia e redução da perda sanguínea local. As plaquetas liberam diversos mediadores químicos e fatores de crescimento que desencadeiam a cascata de reparação tecidual e promovem o recrutamento celular. Em seguida, ocorre vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, favorecendo a migração de leucócitos para o sítio lesionado. A infiltração celular é mediada por mecanismos de quimiotaxia induzidos por citocinas pró-inflamatórias, especialmente o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), importante regulador da resposta inflamatória local. Essa citocina atua amplificando a atividade de neutrófilos, macrófagos, queratinócitos e fibroblastos, além de estimular a

expressão de fatores de crescimento envolvidos na angiogênese, deposição de matriz extracelular e síntese de colágeno (MEDEIROS e DANTAS-FILHO, 2017). Paralelamente, o TNF-α exerce papel relevante na modulação da sobrevivência celular, participando da indução de apoptose e contribuindo para a manutenção da homeostase tecidual e controle da proliferação celular (VAN LOO e BERTRAND, 2023).

Além do TNF-α, a interleucina-6 (IL-6) desempenha papel central na resposta inflamatória inicial da cicatrização. Produzida principalmente por macrófagos, neutrófilos, fibroblastos e queratinócitos, essa citocina participa do recrutamento e da ativação de células inflamatórias, estimula a síntese de proteínas de fase aguda e contribui para a transição entre as fases inflamatória e proliferativa. Em condições fisiológicas, sua expressão é transitória e favorece a proliferação de fibroblastos, a migração de queratinócitos e a formação do tecido de granulação. Entretanto, a persistência de níveis elevados de IL-6 mantém o estado inflamatório ativo e está associada ao atraso da cicatrização e ao desenvolvimento de feridas crônicas (PEÑA; MARTIN, 2024; LACINA et al., 2024).

Na **fase proliferativa**, observa-se intensa atividade celular voltada à reconstrução do tecido lesionado. Esse período caracteriza-se principalmente pela fibroplasia, processo marcado pela migração, proliferação e ativação de fibroblastos, células responsáveis pela síntese e deposição de componentes da matriz extracelular, especialmente colágeno e elastina. Simultaneamente, ocorre a formação de tecido de granulação, constituído por fibroblastos, matriz extracelular recém-formada e neovasos sanguíneos. A angiogênese desempenha papel essencial nessa etapa, garantindo o suprimento de oxigênio e nutrientes necessários ao metabolismo celular e à progressão do reparo tecidual. A formação de novos vasos sanguíneos ocorre a partir de capilares pré-existentes e é fortemente estimulada pelo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um dos principais mediadores envolvidos na proliferação e migração das células endoteliais. Além disso, nessa fase ocorre a reepitelização da superfície da ferida, promovida pela migração e proliferação de queratinócitos, contribuindo para o restabelecimento da barreira cutânea (FALANGA et al., 2022).

A última fase, a de **remodelação**, dá-se a mudança do tipo e composição do colágeno, tendo uma produção maior do tipo 1 do que o 2, essas mudanças geram uma maior resistência ao tecido que substitui as células lesadas. As células fagocitárias vão sofrendo apoptose, e o tecido de granulação passa a ser constituído por um tecido conjuntivo cada vez mais denso e menos vascularizado (KUMAR et al., 2023). Este processo se dá pela ação das metaloproteinases de matriz (MMPs), que exercem papel fundamental no processo de

remodelação durante a cicatrização e o reparo de feridas, atuando principalmente na degradação e reorganização da matriz extracelular (MEC). Durante a fase de resolução da cicatrização, essas enzimas participam da remoção de fibras de colágeno previamente existentes para possibilitar a formação e reorganização de novas fibras, processo essencial para a remodelação tecidual adequada. Entre as principais metaloproteinases envolvidas nesse processo destacam-se a MMP-1 e a MMP-9. A MMP-1, também denominada colagenase-1, promove a degradação dos colágenos fibrilares dos tipos I e III, permitindo a reorganização da matriz extracelular e favorecendo a migração de fibroblastos e queratinócitos durante a cicatrização. Já a MMP-9, conhecida como gelatinase B, atua principalmente na degradação do colágeno tipo IV e de componentes da membrana basal, facilitando a angiogênese, a migração celular e a reepitelização. Em condições fisiológicas, a atividade dessas enzimas é rigorosamente controlada, contribuindo para o remodelamento adequado da matriz extracelular (PEÑA; MARTIN, 2024; LOPES et al., 2024).

Além disso, as MMPs também regulam a ativação de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, influenciando diretamente a migração celular, a reepitelização, a contração da ferida e a diferenciação celular. Estas são elementos-chave nesse processo devido à sua capacidade de degradar componentes da matriz extracelular e favorecer a reorganização do tecido lesionado facilitando a migração de fibroblastos no leito da ferida e a contração do colágeno, conduzindo ao fechamento da ferida (KANDHWAL et al., 2022).

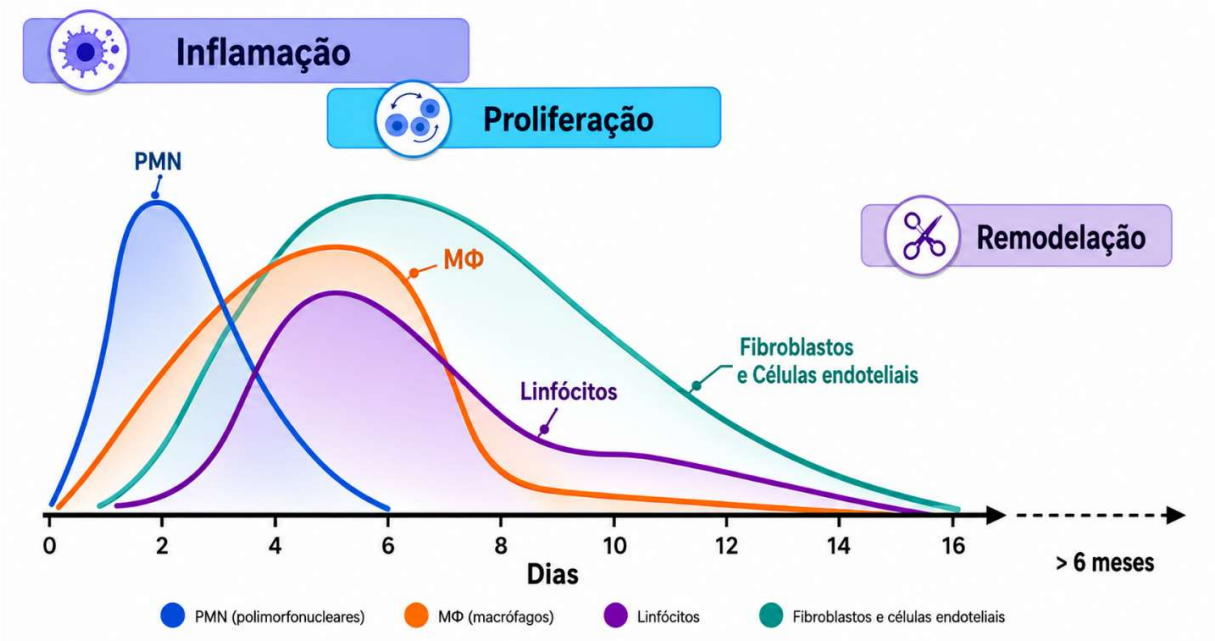


FIGURA 1. Representação esquemática das fases do processo cicatricial.

Fonte: Elaborado pelo autor com base em KANDHWAL et al. (2022).

Sob condições ideais de cicatrização de feridas como controle apropriado de umidade, presença e equilíbrio de fatores e mediadores necessários (JUNKER et al., 2013 e OUSEY et al., 2016), as feridas cicatrizam completamente de maneira oportuna e organizada, tanto funcional quanto anatomicamente. Este tipo de ferida é conhecido como ferida aguda ou não crônica. Um atraso na progressão espaço-temporal ordenada da cicatrização de feridas, em qualquer um dos estágios de cicatrização, especialmente no estágio inflamatório, faz com que a pele perca algumas de suas propriedades funcionais e estruturais, desenvolvendo-se as feridas crônicas (FIRLAR et al., 2022).

O desenvolvimento de uma ferida crônica é geralmente causado por uma série de parâmetros desfavoráveis de cicatrização de feridas (LAWTON, 2019), como falta de umidade (JUNKER et al., 2013 e OUSEY et al., 2016), uma superabundância de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF/TNF-α) (ABDO et al., 2020), acúmulo elevado de MMPs, angiogênese restrita (RAZIYEVA et al., 2021) e modulação autofágica prejudicada (SYLAKOWSKI e WELLS, 2021; REN et al., 2022). Tais parâmetros podem influenciar a cicatrização de feridas, impedindo o início do estágio proliferativo que por sua vez pode resultar em uma inflamação persistente de tempo de cicatrização prolongado (RAZIYEVA et al., 2021).

Nesse contexto, destaca-se que a persistência de elevadas concentrações de IL-6, MMP-1 e MMP-9 constitui uma das principais características do microambiente das feridas crônicas. A manutenção da expressão de IL-6 perpetua o recrutamento de células inflamatórias, enquanto o excesso de MMP-1 e MMP-9 promove degradação exacerbada da matriz extracelular, do colágeno e de fatores de crescimento essenciais ao reparo tecidual. Esse desequilíbrio impede a progressão ordenada para as fases proliferativa e de remodelamento, comprometendo a formação do tecido de granulação, a reepitelização e a reorganização da matriz extracelular, prolongando o processo cicatricial. Dessa forma, essas moléculas são reconhecidas não apenas como biomarcadores da cicatrização, mas também como potenciais alvos terapêuticos para o tratamento de feridas crônicas (PEÑA; MARTIN, 2024; LACINA et al., 2024; LOPES et al., 2024).

Observa-se que lesões destrutivas em qualquer órgão seguem mecanismos de cicatrização semelhantes aos observados nas feridas cutâneas. Quando a área lesionada é extensa ou

apresenta infecção, o processo reparativo torna-se mais intenso, com maior formação de tecido de granulação. Diversos fatores interferem diretamente na eficiência do reparo, incluindo idade, estado nutricional, temperatura, distúrbios hematológicos, presença de infecção local, diabetes, uso de corticosteróides e qualidade da irrigação sanguínea. É amplamente reconhecido que feridas, sobretudo as abertas, podem ser facilmente colonizadas por bactérias; entretanto, técnicas adequadas de higienização são capazes de reduzir essa colonização e prevenir quadros infecciosos. Diante dessas dificuldades, inúmeros profissionais da saúde vêm buscando estratégias e intervenções capazes de otimizar e acelerar a cicatrização, especialmente no manejo de feridas crônicas (FILHO, 2021).

1.3 Autofagia na cicatrização de úlceras crônicas

A autofagia desempenha um papel essencial de manutenção em diferentes estágios sucessivos de cicatrização de feridas cutâneas; desde os estágios de homeostase e inflamatório até os estágios proliferativos e de remodelação. A autofagia pode atuar como o principal modulador da cicatrização de feridas cutâneas, tornando agudas as feridas crônicas. A autofagia é um processo mecanicamente diversificado envolvido na degradação e reciclagem de materiais supérfluos e potencialmente perigosos (por exemplo, agregados de proteínas prejudiciais, proteínas danificadas e organelas, componentes celulares aberrantes) (LEVINE e KROEMER, 2019; KLIONSKY et al., 2021).

Durante a fase inflamatória da cicatrização, a autofagia participa diretamente da defesa imunológica inata, contribuindo para o reconhecimento e eliminação de microrganismos invasores. Nesse contexto, destaca-se a xenofagia, uma forma seletiva de autofagia responsável pela degradação intracelular de patógenos. Esse mecanismo reconhece bactérias recobertas por ubiquitina, como *Staphylococcus aureus*, direcionando-as para degradação lisossomal e limitando efetivamente sua proliferação intracelular. A fusão entre autofagossomos e lisossomos promove a destruição do patógeno e contribui para o controle da carga microbiana local, reduzindo a perpetuação do processo inflamatório (MIJALJICA et al., 2023). Além de sua função antimicrobiana, a autofagia atua como importante mecanismo citoprotetor durante a fase inflamatória, promovendo a sobrevivência celular frente às condições adversas presentes no microambiente da ferida crônica. Citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio, hipóxia e elevada carga microbiana podem induzir intenso estresse celular e desencadear

necrose ou apoptose exacerbada. Nesse cenário, a autofagia contribui para a manutenção da viabilidade celular ao remover organelas danificadas e reduzir o acúmulo de componentes celulares tóxicos, preservando a funcionalidade de queratinócitos, fibroblastos, macrófagos e outras células envolvidas no reparo tecidual. Dessa maneira, esse mecanismo exerce importante papel na limitação do dano tecidual secundário e na modulação da intensidade da resposta inflamatória (RIPSZKY et al.,2022; PALACKIC et al., 2022).

Além disso, a autofagia desempenha papel central na modulação da resposta inflamatória por meio da regulação da produção e liberação de citocinas inflamatórias, incluindo o TNF-α. Embora essa citocina seja essencial para o recrutamento celular, ativação de neutrófilos e macrófagos e indução de fatores de crescimento necessários ao reparo tecidual, sua expressão exacerbada e persistente pode prolongar o estado inflamatório e comprometer a progressão adequada da cicatrização. Nesse contexto, a autofagia atua como mecanismo regulador capaz de limitar respostas inflamatórias excessivas, contribuindo para a transição ordenada entre as fases inflamatória e proliferativa do reparo tecidual (ABDO et al., 2020; REN et al., 2022).

Durante a fase proliferativa, a autofagia participa ativamente da regeneração tecidual ao favorecer a proliferação, diferenciação e migração celular. Estudos demonstram que a ativação da via autofágica promove a atividade de fibroblastos e queratinócitos, células fundamentais para a deposição de matriz extracelular, reepitelização e fechamento da ferida. Além disso, a autofagia exerce papel relevante na angiogênese, estimulando a sobrevivência e funcionalidade das células endoteliais e contribuindo para a formação de novos vasos sanguíneos. Esse processo é essencial para garantir o aporte adequado de oxigênio, nutrientes e fatores de crescimento ao tecido em reparação, favorecendo a progressão eficiente da cicatrização (SYLAKOWSKI e WELLS, 2021; REN et al., 2022).

Paralelamente, a angiogênese representa um dos eventos centrais da fase proliferativa e depende diretamente da atuação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), responsável por estimular proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais. O VEGF também participa indiretamente da deposição de MEC ao favorecer a atividade metabólica dos fibroblastos e a síntese de colágeno. Entretanto, o desequilíbrio entre fatores angiogênicos e enzimas proteolíticas, especialmente as MMPs, pode resultar em degradação excessiva da MEC e comprometer a estabilidade do tecido em formação. Nas úlceras crônicas, a hiperatividade das MMPs frequentemente contribui para destruição contínua da MEC, atraso no fechamento da ferida e manutenção do estado inflamatório crônico (SYLAKOWSKI e WELLS, 2021 e FILHO, 2021).

Na fase de remodelamento, a autofagia contribui para o equilíbrio dinâmico entre síntese e degradação dos componentes da MEC, participando da reorganização estrutural do tecido cicatricial. Esse mecanismo auxilia na manutenção adequada da deposição de colágeno, elastina e outras proteínas estruturais, promovendo maior organização das fibras colágenas e contribuindo para a maturação da cicatriz. A regulação da autofagia nessa etapa é fundamental para evitar deposição excessiva de MEC, fibrose exacerbada ou degradação descontrolada do tecido recém-formado, permitindo um fechamento tecidual mais eficiente e funcional (SYLAKOWSKI e WELLS, 2021; REN et al., 2022).

Nesse contexto, compostos bioativos capazes de modular a autofagia têm despertado crescente interesse terapêutico. Entre eles, destaca-se o Artepelin C, um composto fenólico presente na própolis verde brasileira, amplamente investigado por suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e moduladoras da autofagia. Estudos sugerem que o Artepelin C atua como potente indutor autofágico, promovendo a degradação de proteínas danificadas e componentes celulares disfuncionais, além de contribuir para a restauração da homeostase celular em ambientes inflamatórios crônicos (SYLAKOWSKI e WELLS, 2021; REN et al., 2022). Adicionalmente, esse composto parece exercer efeitos regulatórios sobre importantes mediadores da cicatrização, reduzindo níveis exacerbados de TNF-α, favorecendo a angiogênese mediada por VEGF e contribuindo para o equilíbrio funcional das MMPs. Dessa maneira, o Artepelin C apresenta potencial terapêutico promissor na modulação da resposta inflamatória e no favorecimento do reparo tecidual em úlceras crônicas, podendo contribuir para uma cicatrização mais eficiente e funcional (LEVINE e KROEMER, 2019; KLIONSKY et al., 2021).

1.4 Própolis e potencial farmacológico cicatrizante

No contexto das terapias complementares e alternativas, os produtos naturais têm despertado crescente interesse científico e clínico em razão de suas propriedades farmacológicas, ampla disponibilidade e potencial custo-benefício quando comparados a terapias convencionais. Nas últimas décadas, a utilização de compostos bioativos de origem natural tem sido amplamente investigada como estratégia terapêutica para diferentes condições inflamatórias e degenerativas, incluindo o tratamento de feridas cutâneas agudas e crônicas. Esse interesse decorre, principalmente, da capacidade desses compostos em modular múltiplas vias biológicas envolvidas na inflamação, no estresse oxidativo, na resposta imunológica e no reparo tecidual.

Entre os produtos naturais mais estudados nesse contexto, destaca-se a própolis, substância amplamente reconhecida por suas propriedades biológicas e farmacológicas, incluindo atividades anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, imunomoduladora e cicatrizante, fatores que contribuem para sua elevada aceitação terapêutica e crescente aplicação biomédica (ZEPPA et al., 2025).

A própolis é definida como um produto apícola de composição química complexa, produzido por abelhas da espécie *Apis mellifera* Linnaeus, 1758, a partir da coleta de materiais resinosos, gomosos e balsâmicos provenientes de exsudatos vegetais, brotos, cascas, folhas e estruturas florais de diferentes espécies botânicas. Durante sua elaboração, esses compostos vegetais são misturados a secreções salivares, enzimas, cera e partículas de pólen, originando uma substância biologicamente ativa utilizada pelas abelhas na proteção física e microbiológica da colmeia. Na colônia, a própolis desempenha importante função de defesa, atuando no selamento de frestas, manutenção da assepsia interna e proteção contra microrganismos patogênicos, fungos e agentes invasores externos (da ROSA et al., 2022).

A composição química da própolis apresenta elevada variabilidade, sendo diretamente influenciada pela origem botânica, sazonalidade, localização geográfica, condições climáticas e biodiversidade regional. Consequentemente, sua coloração pode variar entre tons de marrom escuro, verde, amarelo, avermelhado e castanho-esverdeado, refletindo diferenças qualitativas e quantitativas em seus constituintes químicos. De maneira geral, a própolis é composta predominantemente por resinas vegetais, ceras, óleos essenciais, compostos fenólicos, flavonoides, ácidos aromáticos, terpenos, vitaminas e minerais. Dentre esses componentes, os compostos fenólicos e flavonoides destacam-se como os principais responsáveis por suas atividades biológicas, especialmente por sua capacidade antioxidante e moduladora da resposta inflamatória (da ROSA et al., 2022).

A própolis verde brasileira é produzida pela espécie de abelha *Apis mellifera* Linnaeus a partir da coleta de resinas das folhas de *Baccharis dracunculifolia*, uma planta nativa do Brasil popularmente conhecida como “alecrim-do-campo” (BESERRA et al., 2021). Como um insumo de grande interesse científico, pesquisadores relatam a existência de mais de trezentas substâncias identificadas em suas amostras (ZHANG et al., 2015). Notadamente, a própolis verde brasileira produzida nas regiões de São Paulo e Minas Gerais destaca-se por apresentar concentrações superiores de compostos fenólicos totais e flavonoides totais em relação às demais própolis disponíveis no mercado (DOS SANTOS et al., 2022). Essa composição química particular é constituída principalmente por derivados prenilados do ácido p-cumárico e pelo

Artepelin C, possuindo uma assinatura de flavonoides que não está presente nas variantes da Europa, América do Norte e Ásia (da ROSA et al., 2022).

Os compostos fenólicos e os flavonoides são apontados como os principais responsáveis pelos múltiplos benefícios fisiológicos desse tipo de própolis. Estas substâncias atuam diretamente na ação e absorção de vitaminas, exercem papel antioxidante e auxiliam ativamente nos processos de cicatrização (YANG et al., 2022). Adicionalmente, conferem ao extrato funções antimicrobiana e moduladora do sistema imunológico (YANG et al., 2022; DOS SANTOS et al., 2022), além de propriedades anti-inflamatórias (BESERRA et al., 2021) e antitumorais (CARDOSO et al., 2021). Somado a isso, a própolis verde brasileira possui o Artepelin C como o seu constituinte mais abundante (BESERRA et al., 2021), um composto amplamente reconhecido por sua capacidade de indução da autofagia celular (UEDA et al., 2017).

Considerando a complexidade química da própolis verde brasileira e a diversidade de moléculas bioativas que compõem sua matriz resinosa, torna-se essencial sistematizar essas substâncias e suas respectivas ações farmacológicas para melhor compreender seu potencial terapêutico. Embora muitos estudos descrevam individualmente os efeitos de ácidos fenólicos, flavonoides e prenilflavonoides presentes nesse produto apícola, ainda persiste a necessidade de reunir essas informações de forma sintética e comparativa, facilitando a visualização das propriedades que emergem da interação entre seus componentes. Com esse propósito, a seguir apresenta-se a Figura 2 contendo os principais compostos identificados na própolis verde brasileira, acompanhados de suas ações biológicas documentadas.

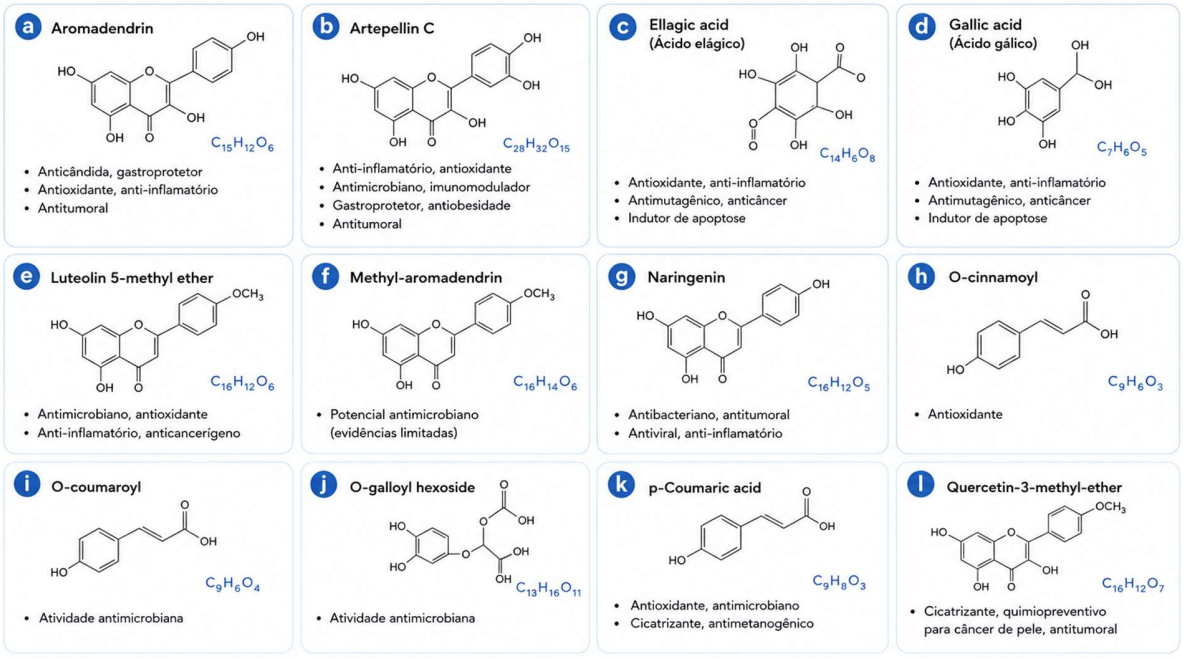


FIGURA 2. Principais compostos fenólicos e flavonoides da própolis verde brasileira com respectivas ações biológicas e fórmulas químicas.

Fonte: Elaborado pelo autor com base em BESERRA et al., 2021 e da ROSA et al., 2022.

Dentre os diversos efeitos terapêuticos da própolis verde brasileira, sua eficácia no tratamento de feridas cutâneas tem sido amplamente estudada, especialmente em úlceras diabéticas, venosas, cirúrgicas e queimaduras. Isso se deve às suas propriedades antibacterianas, antioxidantes, anti-inflamatórias e cicatrizantes (SAWAYA et al., 2011 e SILVEIRA et al., 2021). Recentemente, estudos indicam que esses benefícios também podem ser aplicados no tratamento de úlceras resultantes da hanseníase (BESERRA et al., 2021 e ROSA et al., 2024).

Apesar dos resultados promissores obtidos pelo estudo clínico piloto conduzido por ROSA et al. (2024), destaca-se a necessidade de investigações adicionais, com o objetivo de fortalecer a validade científica dos achados e subsidiar a elaboração de protocolos terapêuticos mais eficazes e individualizados. Nesse contexto, ressalta-se a relevância de estudos que investiguem de forma aprofundada a dinâmica funcional de fibroblastos e queratinócitos, com o intuito de aprimorar estratégias terapêuticas voltadas à regeneração tecidual. Essas células exercem

papéis cruciais no processo de cicatrização: os fibroblastos, de origem mesenquimal, são responsáveis pela síntese de colágeno e pela remodelação da matriz extracelular, conferindo integridade e resistência ao tecido recém-formado; já os queratinócitos, células epiteliais especializadas, atuam na reepitelização e na restauração da barreira cutânea. A interação entre esses elementos celulares e mediadores bioquímicos, como citocinas e fatores de crescimento, modula diretamente as diferentes fases da cicatrização. Assim, compreender os mecanismos que regulam essa interação, especialmente em contextos terapêuticos envolvendo substâncias bioativas como a própolis verde brasileira, é fundamental para o desenvolvimento de intervenções mais eficazes e direcionadas (FERREIRA et al., 2024).

É crucial investigar a ação do EPV não apenas contra patógenos oportunistas, mas também em cepas da flora normal da pele. Isso porque a flora comensal desempenha papel importante na manutenção do equilíbrio microbiológico cutâneo e na proteção contra colonização por microrganismos patogênicos. Assim, testar a atividade da própolis verde brasileira nessas cepas permite avaliar sua seletividade e segurança, evitando efeitos deletérios sobre bactérias benéficas que contribuem para a barreira cutânea e imunidade local (HUANG et al., 2025).

Dando continuidade ao estudo clínico realizado na dissertação do mestrado mencionado no início desta introdução, o Capítulo I focou em investigar *in vitro* a ação proliferativa do extrato de própolis verde brasileira em diferentes concentrações em Fibroblastos de prepúcio humano (HFF1) e Queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT). Além disso, foi avaliado o potencial antimicrobiano da própolis verde brasileira contra isolados clínicos, bem como foram quantificadas enzimas e citocinas presentes nos exsudatos das feridas tratadas no estudo clínico *in vivo* anterior, permitindo uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na cicatrização mediada pela própolis verde brasileira.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o efeito da própolis verde brasileira nas fases inflamatória e proliferativa do processo de cicatrização de úlceras cutâneas.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a atividade do extrato de própolis verde brasileira na proliferação e na migração de queratinócitos e fibroblastos cultivados *in vitro*;
- Avaliar o potencial antimicrobiano da própolis verde brasileira;
- Verificar a ação do extrato de própolis verde brasileira sobre fatores de crescimento e citocinas pró e anti-inflamatórias que atuam no processo de reparo tecidual no exsudato coletado de úlceras cutâneas decorrentes da hanseníase.

CAPÍTULO 1: Artigo submetido à revista Biomolecules.

The Multifaceted Therapeutic Profile of Green Propolis in Wound Repair: Orchestrating Epithelial Regeneration, Extracellular Matrix Remodeling, and Inflammatory Resolution

O estudo busca preencher essa lacuna por meio de uma abordagem abrangente e translacional, integrando caracterização fitoquímica, avaliação microbiológica, ensaios funcionais celulares, análises moleculares e avaliação de biomarcadores clínicos. Especificamente, caracterizamos a composição química da própolis verde brasileira por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-HRMS), avaliamos sua atividade antimicrobiana frente a isolados bacterianos clinicamente relevantes, investigamos seus efeitos sobre a proliferação de fibroblastos e queratinócitos, analisamos a expressão de genes envolvidos na inflamação e no remodelamento da matriz extracelular e quantificamos mediadores inflamatórios em exsudatos de feridas obtidos de pacientes previamente incluídos em um ensaio clínico randomizado. A maioria dos estudos anteriores concentrou-se em atividades biológicas isoladas ou em observações descritivas, deixando uma importante lacuna no entendimento dos eventos moleculares coordenados que sustentam seu potencial terapêutico.

biomolecules

MDPI

Article

The Multifaceted Therapeutic Profile of Green Propolis in Wound Repair: Orchestrating Epithelial Regeneration, Extracellular Matrix Remodeling, and Inflammatory Resolution

Cristiano da Rosa[1], Larissa Kaori Maquedano[1], Dina Cardoso dos Santos[1], Ana Clara Martins Quaresma[1], Ian Lucas Bueno[1], Yasmin Ladeira Ramos[1], Fernando Augusto de Lima Marson[2], Raquel Girardello[1], Manoela Marques Ortega[3], Patrícia de Oliveira Carvalho[3], Karen Y. Sánchez-Luquez[3], Giovanna Barbarini Longato[1]

[1] Laboratory of Molecular Pharmacology and Bioactive Compounds, Postgraduate in Health Sciences, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, São Paulo, Brazil.

[2] Laboratory of Molecular Biology and Genetics, Postgraduate in Health Sciences, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, São Paulo, Brazil.
[3] Multidisciplinary Research Laboratory, Postgraduate Degree in Health Sciences, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, São Paulo, Brazil.
* Correspondence: cristiano.rosa@usf.edu.br

Abstract

Chronic skin ulcers remain a major therapeutic challenge due to impaired healing and associated comorbidities, highlighting the need for effective and affordable therapies. Green propolis extract (GPE) has shown promising wound-healing properties, although its mechanisms of action remain incompletely understood. This study investigated the anti-inflammatory, regenerative, and antimicrobial effects of a topical GPE ointment by analyzing clinical wound exudates from a previous pilot trial, evaluating cell proliferation and gene expression in human keratinocytes and fibroblasts, and assessing antimicrobial activity against skin pathogens. GPE treatment significantly reduced TNF-α protein levels in wound exudates compared with placebo ($p < 0.05$), indicating an early anti-inflammatory effect. In vitro, GPE promoted concentration-dependent proliferation of fibroblasts and keratinocytes and modulated the transcriptional kinetics of MMP-9 and IL-6 in HaCaT keratinocytes, suggesting coordinated regulation of extracellular matrix remodeling and inflammatory signaling. GPE also exhibited selective antimicrobial activity against Staphylococcus aureus. These findings demonstrate that GPE promotes wound repair through complementary anti-inflammatory, regenerative, and antimicrobial mechanisms, supporting its potential as a topical therapeutic strategy for chronic wound management and providing a rationale for further clinical studies to confirm its long-term efficacy.

Keywords: Wound healing; Chronic wounds; Brazilian green propolis; Anti-inflammatory activity; Antimicrobial activity.

1. Introduction

Under optimal wound-healing conditions, the repair process occurs through a coordinated and well-regulated sequence of events. This requires adequate moisture control, as well as the presence and balance of essential mediators, growth factors, and cellular responses. When these conditions are maintained, wounds progress through the healing phases in a timely and organized manner, resulting in complete anatomical and functional restoration. Such wounds are classified as acute, or non-chronic, wounds [1,2].

In contrast, chronic wounds arise when there is a delay or disruption in the orderly spatiotemporal progression of tissue repair. This impairment may occur at any stage of the healing process, but it is particularly associated with prolonged or dysregulated inflammation. As a result, the skin may fail to fully recover its structural and functional properties, leading to persistent, non-healing lesions [3].

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date
Revised: date
Accepted: date
Published: date

Copyright: © 2026 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license.

The development of a chronic wound is generally caused by a series of unfavorable wound healing parameters [4], including lack of moisture [1,2], overabundance of inflammatory cytokines, tumor necrosis factor (TNF/TNF-α) [5], elevated accumulation of metalloproteinases (MMPs), restricted angiogenesis [6] and impaired autophagic modulation [7,8]. Those factors can influence the wound healing process, preventing the start of the proliferative stage [6], which may result in persistent inflammation with prolonged healing time [9].

Among alternative therapies, natural products have been extensively investigated because of their biological properties, availability, and low cost. Among them, propolis stands out as a promising compound due to its well-documented pharmacological potential and broad applicability in tissue repair. Propolis is a general term used to designate a chemically complex resinous material produced by honeybees from substances collected from plant buds, flowers, and exudates. During its production, these plant-derived materials are enzymatically modified and subsequently combined with bee salivary secretions, wax, and pollen, resulting in a final product with highly variable physicochemical characteristics. Among these characteristics, coloration is particularly influenced by the botanical source and geographical origin of the collected material, ranging from dark brown to greenish or reddish-brown tones [10].

Green propolis is produced by *Apis mellifera* bees from resins collected primarily from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*, a plant native to Brazil and popularly known as "alecrim-do-campo" [11]. Considering the pharmacological properties of propolis and its potential role in tissue repair, our research group conducted a randomized pilot clinical study to investigate the wound-healing effects of green propolis in leprosy-related ulcers. The results demonstrated a significant reduction in lesion area in the group treated with a propolis-containing ointment (G1) compared with the control group (G2) from weeks 1 to 6, with a noticeable difference during the first two weeks of treatment [12].

Although green propolis has been widely described for its antimicrobial, anti-inflammatory, and wound-healing properties [13,14], the mechanisms underlying its role in tissue repair remain only partially understood. Important gaps persist regarding its effects on cell viability and proliferation, selectivity against skin-associated pathogens, and modulation of cytokines, growth factors, matrix metalloproteinases, and genes involved in inflammation and extracellular matrix remodeling [15-17]. These processes are particularly relevant in chronic wounds, where persistent inflammation, impaired angiogenesis, excessive matrix degradation, and delayed progression to the proliferative phase contribute to impaired tissue repair [18].

Therefore, based on the promising clinical results previously observed by our research group in leprosy-related ulcers treated with green propolis ointment, the present study aimed to investigate biological responses potentially associated with the healing effects of Brazilian green propolis in

chronic wounds. Specifically, we evaluated its cytotoxic and metabolic effects on fibroblasts and keratinocytes, antimicrobial activity against clinical bacterial isolates, modulation of inflammatory and remodeling-related mediators in wound exudates, and gene expression of markers associated with inflammation and extracellular matrix remodeling.

2. Materials and Methods

2.1. Obtention of Green Propolis Extract (GPE)

The hydroalcoholic propolis extract was supplied by the Humanitas Philanthropic Association, located in the city of São Jerônimo da Serra in the state of Paraná, Brazil (23°43′40″ S, 50°44′27″ W). The research was registered in the National Genetic Heritage Management System and Associated Traditional Knowledge (SISGEN) under number AFDE9B6. The rotaevaporation and freeze-drying processes of the hydroalcoholic propolis extract were carried out. Subsequently, the powdered extract was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) at a concentration of 100.000 μg/mL. In the present study, this green propolis extract will hereafter be referred to as Humanitas GPE or simply GPE.

2.2. Ultra-High Performance Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry Based Compound Annotation

Dried GPE (1 mg) was reconstituted in 1 mL of methanol/water solution (1:1, v/v) before liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS) analysis. Water was purified on a Milli-Q system from Millipore (Medford, MA, USA). HPLC-grade acetonitrile (ACN) was from Honeywell (Morristown, NJ, USA). Data were acquired using an ACQUITY FTN liquid chromatograph coupled to a XEVO-G2XSQTOF mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA) using MassLynx 4.1 software. An ACQUITY UPLC HSS T3 (Waters, 50 × 2.1 mm, 1.8 μm) was used. The mobile phase consisted of: (A) 0.1% formic acid and (B) acetonitrile at a flow rate of 0.20 mL.min-1 with a linear gradient (in % B): 0–8.0 min: 25%; 8.0–9.0 min: 100%; 9.0–9.1 min: decrease to 25% (with a further 0.8 min for column re-equilibration), resulting in a 10 min analysis. The injection volume was 1 μl. For the electrospray ionization source, the parameters were set as follows: negative mode with capillary voltage of 2.0 kV, sampling cone of 40,000, source temperature of 140 °C, desolvation temperature of 550 °C, cone gas flow of 50 L/h, and desolvation gas flow of 900 L/h. The acquisition scan range was from 50 to 1200 Da. Leucine encephalin (molecular weight = 555.62; 200 pg/μL in 1:1 ACN:H2O) was used as a lock mass for accurate mass measurements, and a 0.5 mM sodium formate solution was used for instrument calibration. Each sample was analyzed three times. To monitor the stability of the system, quality control (QC) samples were inserted before the batch and inserted between injections.

2.3. Total Phenolic Composition by the Folin-Ciocalteu Method

The analyses for determination of total phenolic compounds in GPE were performed by the Folin–Ciocalteu's spectrophotometric method using gallic acid as standard [19]. Ethanol 80% was used to solubilize the extracts to obtain a concentration of 20 mg/mL. The volume of 0.5 mL of the extract solution was withdrawn and mixed with 2.5 mL of aqueous Folin–Ciocalteu solution (10%) and 2.0 mL of 7.5% sodium carbonate. The solution was placed in a thermoregulated bath at 50 °C for 5 min and then the absorbance was measured in a spectrophotometer (Lambda 25 UV/vis Systems—PerkinElmer, Washington, DC, USA) at 765 nm. The total phenolic compounds concentrations were determined by comparison with a gallic acid calibration curve under the same experimental conditions. All analyses were performed in triplicate, and the results were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram of sample (mg GAE/g).

2.4. Antimicrobial Activity of Green Propolis

The antimicrobial activity of GPE was tested using the disk diffusion technique against clinical bacterial isolates of the species *Staphylococcus aureus*, *Coagulase Negative Staphylococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, and *Klebsiella pneumoniae*. The isolates were subcultured for two consecutive days on TSA agar. The isolates were selected based on their antibiotic sensitivity profile pre-determined by the clinical routine laboratory of the Hospital Universitário São Francisco na Providência Divina (HUSF). Bacterial isolates that showed resistance to the main antibiotics in clinical use for the respective species were chosen. The storage of clinical isolates had prior authorization from the USF Research Ethics Committee, under CAAE number: 44416021.3.0000.5514. Bacterial inocula were prepared on the 0.5 McFarland scale (1.5×10^8 Colony Forming Units [CFU]) in solution saline 0.75%. Each solution was inoculated onto a Mueller Hinton agar plate using a sterile swab. A sterile disc was dispensed onto the surface of the plate and 10 uL of propolis was pipetted onto the disc. The results were analyzed by visual inspection, observing possible inhibition halos around the propolis discs.

2.5. Cell Viability Assay

The cytotoxic and metabolic activity of GPE on the HaCaT (keratinocytes) and HFF-1 (fibroblasts) lineage was evaluated using the MTT colorimetric method, which is based on the mitochondrial enzymatic activity of cells to infer cell viability. Cells were cultured in RPMI medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin, and 1% sodium pyruvate. Cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2. Cells were seeded in 96-well plates at a density of approximately 5 × 103 cells per well, in a final volume of 0.1 mL of culture medium per well. After 24 hours, the GPE was diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) at 0.1g/mL and tested at concentrations between 0.25 and 125 μg/mL, (100 μL/compartment), in triplicate. Then, the plate was incubated for 48 hours at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 and a humid

environment. After 48 hours of treatment with DMSO (negative control) and GPE, the cells were stained with MTT and the absorbance was read using a spectrophotometer at 540 nm. Cell viability was expressed as percentage relative to the negative control.

2.6. Gene Expression Analysis by Quantitative Polymerase Reaction (qPCR)

The keratinocytes cell line (HaCaT) was cultured in the same conditions previously described. Cells were seeded in 6-well plates at a density of approximately 3×10^5 cells per well, in a final volume of 2 mL of culture medium per well. HaCaT cells were treated with GPEs (4% and 8% w/v), placebo control (DMSO at the same final concentration) was included in all experiments. The culture medium was replaced every 24 hours to maintain treatment stability. Cells were exposed for 7 and 14 days, and each condition was performed in triplicate (three biological replicates). Then, the cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) to remove residual medium and debris. Total RNA was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration and purity were assessed using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA), according to the manufacturer's instructions. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 1 μg of total RNA using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, USA). qPCR assays were conducted using the QuantStudio system (Applied Biosystems) and the qPCR BIOSyGreen Mix Separate-ROX kit (Cat. No. PB20.14-05) in the three biological replicates. Each 10 μL reaction mixture contained: 5 μL of SYBR Green Master Mix (+ ROX), 0.4 μL of each primer (10 μM) (Table 1), 1.5 μL of cDNA, and 3 μL of RNase-free water. The amplification protocol consisted of an initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. A melting curve analysis (60–95 °C) was performed to verify the specificity of amplification products. Relative mRNA expression levels of MMP9, IL-6, and TNF-α were analyzed with GAPDH as the internal reference gene. Relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method and was normalized to the negative control (untreated cells).

Table 1. Oligonucleotide primer sequences used for qPCR gene expression analysis.

Genes	Forward Sequence (5' → 3')	Reverse Sequence (5' → 3')
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	CCACTTGATTTTGGAGGGAT
MMP9	CACTGTCCACCCCTCAGAGC	GCCACTTGTCGGCGATAAGG
TNF-α	AGCCCATGTTGTAGCAAACC	GCTGGTTATCTCTCAGCTCC
IL-6	AAAGAGGCACTGGCAGAAAA	TTTCACCAGGCAAGTCTCCT

2.7. Quantification of Enzymes and Cytokines in Exudate

Exudate samples were collected from ulcerative lesions of leprosy patients enrolled in a previously published randomized clinical trial conducted at the wound care clinic of the philanthropic association

Humanitas, located in São Jerônimo da Serra, Paraná, Brazil (registered in the Brazilian Registry of Clinical Trials as number RBR-2k228rg). Detailed information regarding patient recruitment, inclusion and exclusion criteria, randomization procedures, blinding, baseline wound characteristics, concomitant treatments, and clinical outcomes has been reported elsewhere [12]. Briefly, a total of 18 wounds were allocated to either the propolis ointment group (G1) or the control ointment group (G2), and wound exudate samples were collected according to the methodology described below.

Initially, the ulcer was cleansed with 0.9% (w/v) sodium chloride saline solution and gently dried with sterile gauze. The lesion was then covered with a transparent semi-occlusive polyurethane dressing, and the patient remained at rest for 30 to 60 minutes to allow natural tissue exudation.

The exudate accumulated between the ulcer bed and the dressing was collected using a micropipette with a sterile disposable tip and transferred to 2 mL LoBind plastic tubes containing a protease inhibitor. The samples were properly identified and kept in a refrigerated box until arrival at the laboratory. Subsequently, they were centrifuged at 14,000 × g for 10 minutes at 4°C to pellet cellular debris. The supernatant was then collected and stored at −80°C until analysis. This protocol was adapted from previously described wound exudate collection procedures and optimized for cytokine preservation and downstream analysis [20].

This procedure was performed immediately before treatment and repeated 7 and 14 days after treatment, aiming to investigate the role of green propolis in different phases of the wound-healing process.

For analyte quantification, 25 μL of each sample were added to the wells of a 96-well plate for the measurement of VEGF, TNF-α, and MMP-1, according to the manufacturer's protocol. The assay was performed using the Luminex MAGPIX system, and data were analyzed with Milliplex Analyst v5.1 software, both from Millipore.

2.8. Statistical Analysis

LC–MS Data Processing and Metabolite Annotation

Raw LC–MS data were processed using Progenesis QI v2.0 software (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK) for peak detection, alignment, deconvolution, integration, and compound annotation based on MSE fragmentation data. Metabolite annotation was performed using the Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS), MassBank/Vaniya-Fiehn Natural Products Library, ReSpect, and RIKEN Plant Metabolome databases, applying precursor mass tolerance ≤5 ppm and fragment mass tolerance ≤10 ppm. Compound identification was considered putative according to mass accuracy, isotope similarity, and fragmentation scores, corresponding to level 2 annotations according to the Metabolomics Standards Initiative (MSI).

Metabolomic data preprocessing and statistical analyses were performed using MetaboAnalyst 4.0 (McGill University, Montreal, QC, Canada). Data

were normalized using Probabilistic Quotient Normalization (PQN) with quality control (QC) samples as reference, log-transformed, and auto-scaled prior to analysis. Multiple testing correction was performed using the false discovery rate (FDR) method when appropriate.

In Vitro Experiments

Results from cell viability and gene expression assays were expressed as mean ± standard deviation (SD). Data normality was assessed using the Shapiro–Wilk test, and comparisons among groups were performed using one-way analysis of variance (ANOVA). Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Exudate Analysis

For exudate-derived cytokine measurements, comparisons between treatment and placebo groups at each time point were performed using the Mann–Whitney U test. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Where applicable, adjustment for multiple comparisons was performed using the Benjamini–Hochberg procedure.

All analyses were conducted using GraphPad Prism version 8 (GraphPad Software Inc., USA).

3. Results

3.1. *Chemical Composition*

Humanitas GPE exhibited high concentrations of total phenolic compounds (TPC) and total flavonoids (TF) . To support the putative identification of key molecules in green propolis, the total phenolic content was quantified using the Folin–Ciocalteu spectrophotometric method, yielding 127.4 ± 8.6 mg GAE/g. The major compounds identified in Humanitas GPE included p-coumaric acid, gallic acid, aromadendrin, naringenin, and their methylated derivatives. Glycosylated compounds, such as O-cinnamoyl O-galloyl hexoside and O-coumaroyl O-galloyl hexoside, were also detected (Figure 1 and Table 2).

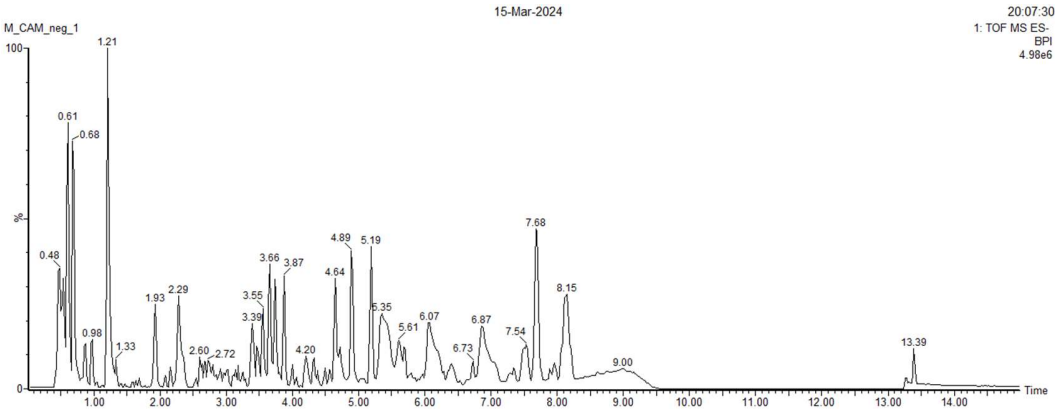


Figure 1. LC-MS of Humanitas GPE (negative mode ionization).

Table 2. Putative chemical composition of Humanites green propolis determined by LC-MS.

Compound[a]	Molecular Formula	IM	m/z	RT (min)	ME (ppm)
Aromadendrin	$C_{15}H_{12}O_6$	neg	287.0540	2.29	3.48
Methyl-aromadendrin	$C_{16}H_{14}O_6$	neg	301.0695	4.20	5.65
Gallic acid	$C_7H_6O_5$	neg	169.0128	0.98	5.33
Naringenin	$C_{15}H_{12}O_5$	neg	271.0595	3.66	4.06
Methyl-naringenin	$C_{16}H_{14}O_5$	neg	285.0778	5.19	5.26
o-cinnamoyl *O*-galloyl hexoside	$C_{22}H_{22}O_{11}$	neg	461.1087	1.21	−0.65
o-coumaroyl *O*-galloyl hexoside	$C_{22}H_{22}O_{12}$	neg	477.1013	0.61	4.19
p-coumaric acid	$C_9H_8O_3$	neg	163.0392	0.68	5.33
Artepillin C	$C_{19}H_{24}O_3$	neg	299.1631	7.68	5.35
Quercetin-3-methyl ether	$C_{16}H_{12}O_7$	neg	315.0504	4.89	0.32
Luteolin 5-methyl ether	$C_{16}H_{12}O_6$	neg	299.0551	3.87	1.67

a: putative identification, IM: ionization mode, *m/z*: mass-to-charge ratio, RT: retention time, ME: mass error

3.2. *Antimicrobial Activity of Green Propolis*

There was strong activity against clinical isolates of Staphylococcus aureus, all of which were methicillin-resistant (MRSA), and a lower activity against coagulase-negative Staphylococcus species. In contrast, no inhibitory activity was observed against the other tested microrganisms, including Gram-negative species (Figure 2). This finding is clinically relevant, as it suggests a more selective antimicrobial effect of GPE against S. aureus, a major skin-colonizing pathogen commonly associated with impaired wound healing. The absence of activity against other tested species, such as Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, and Enterococcus faecalis, may indicate a narrower antibacterial spectrum, with greater specificity toward Gram-positive bacteria, particularly MRSA strains.

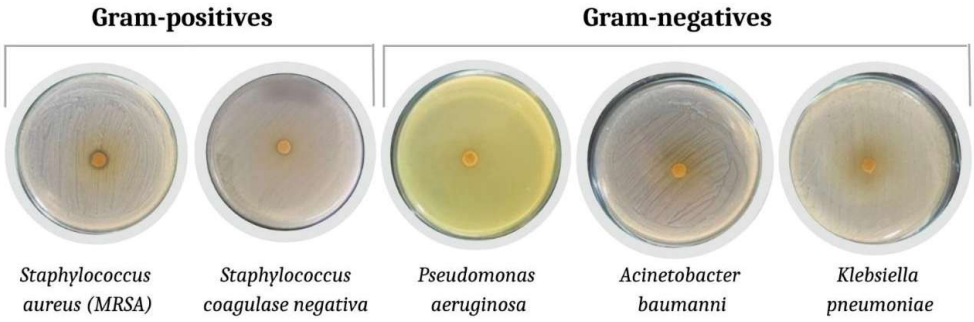


Figure 2. Assessment of the antimicrobial activity of GPE based on the inhibition halos observed in agar plates inoculated with Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Enterococcus faecalis, coagulase-negative staphylococci, and Staphylococcus aureus.

3.3. *Proliferative Activity*

GPE exhibited a concentration-dependent biological response characterized by either proliferative or cytostatic effects depending on the concentration applied. As shown in Figure 3A, lower concentrations of the extract (up to 16 μg/mL) promoted HFF-1 fibroblast proliferation, reaching approximately 175% relative to control. At higher concentrations, a progressive reduction in cell proliferative activity was observed, suggesting the onset of a cytostatic effect.

A similar pattern was observed in HaCaT keratinocytes cells, as shown in Figure 3B. The extract induced a proliferative response up to 50 μg/mL,

reaching approximately 150% relative to control. At concentrations above this threshold, a reduction in cell proliferative activity was observed, indicating a possible cytostatic effect.

These findings indicate that GPE exerts a stimulatory effect on cell proliferation at lower concentrations, whereas higher concentrations attenuate this response, suggesting a concentration-dependent cytostatic effect. Therefore, the biological effects of this extract should be interpreted with caution, as the cellular response is strongly dependent on the concentration applied (Figure 3).

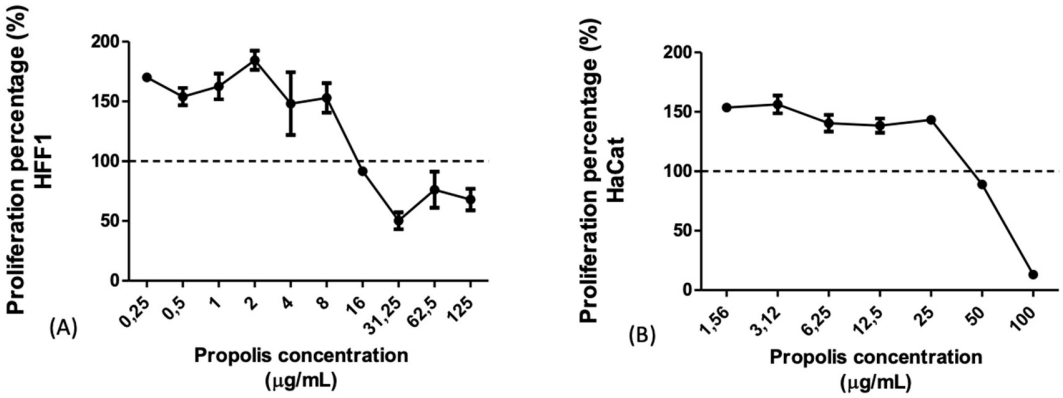


Figure 3. Cell growth percentage of HFF-1 (fibroblasts) and HaCaT (keratinocytes) in response to different concentrations of GPE.

3.4. *Gene Expression Analysis*

Treatment with GPE modulated the expression of inflammatory mediators and extracellular matrix remodeling-related genes in HaCaT keratinocytes in a concentration- and time-dependent manner (Figure 4).

Regarding matrix remodeling, MMP9 expression at day 7 showed a vehicle control group mean relative expression of approximately 0.25-fold, while cells treated with 4% GPE showed a modest, non-significant increase (mean of ~0.5-fold). Notably, treatment with 8% GPE induced a marked upregulation in MMP9 mRNA levels, reaching a mean expression of approximately 1.8-fold, which was significantly higher than the control group ($p = 0.031$). After 14 days of prolonged treatment, the modulatory effects of GPE on this gene became more pronounced at the higher concentration; MMP9 expression in the placebo control group exhibited a mean relative expression of approximately 0.35-fold, remaining relatively low and unchanged compared to the 4% GPE-treated group (mean of ~0.25-fold). In contrast, cells exposed to 8% GPE for 14 days exhibited a substantial and

significant increase in gene expression, reaching a mean of approximately 1.3-fold ($p = 0.004$), representing nearly a fourfold elevation compared to its respective control.

For the inflammatory cytokine IL-6, gene expression was significantly upregulated after 7 days of treatment with the lower concentration of GPE. While the vehicle control group exhibited a mean relative expression of approximately 0.25-fold, treatment with 4% GPE increased transcription to a mean of approximately 1.1-fold ($p = 0.041$). Cells treated with 8% GPE at this time point showed an intermediate mean expression level (~0.9-fold), which did not differ significantly from the control group. By day 14, IL-6 expression remained low in both the placebo control group (mean of ~0.3-fold) and cells treated with 4% GPE (mean of ~0.35-fold). However, prolonged treatment with 8% GPE significantly increased IL-6 mRNA levels to a mean expression of approximately 1.0-fold, corresponding to a sustained and significant upregulation relative to the control ($p = 0.001$).

Conversely, a different kinetic profile was observed for TNF-α transcription. After 7 days of treatment, TNF-α gene expression remained statistically unaltered among the groups, indicating that short-term exposure to GPE had a limited effect on its transcription. For this gene, the vehicle control group presented a mean relative expression of approximately 0.7-fold, while cells treated with 4% and 8% GPE exhibited mean expression levels of approximately 0.55-fold and 0.9-fold, respectively. However, after 14 days of exposure, TNF-α expression in the placebo control group increased to a mean of approximately 1.45-fold, whereas treatment with 4% GPE significantly reduced transcription to a mean relative expression of approximately 0.8-fold ($p = 0.017$). Cells treated with 8% GPE showed intermediate levels (mean of ~0.95-fold), which were not significantly different from the control group, suggesting a potential anti-inflammatory effect specific to the 4% concentration during prolonged exposure.

Overall, GPE exerted distinct concentration-dependent effects on inflammatory and remodeling genes. Lower concentrations (4%) were associated with a significant reduction in TNF-α expression after prolonged treatment, suggesting anti-inflammatory activity. Conversely, the higher concentration (8%) induced sustained upregulation of IL-6 and MMP9, indicating the activation of pathways involved in extracellular matrix remodeling and tissue regeneration. These findings support the potential role of GPE in modulating biological processes relevant to skin repair and wound healing.

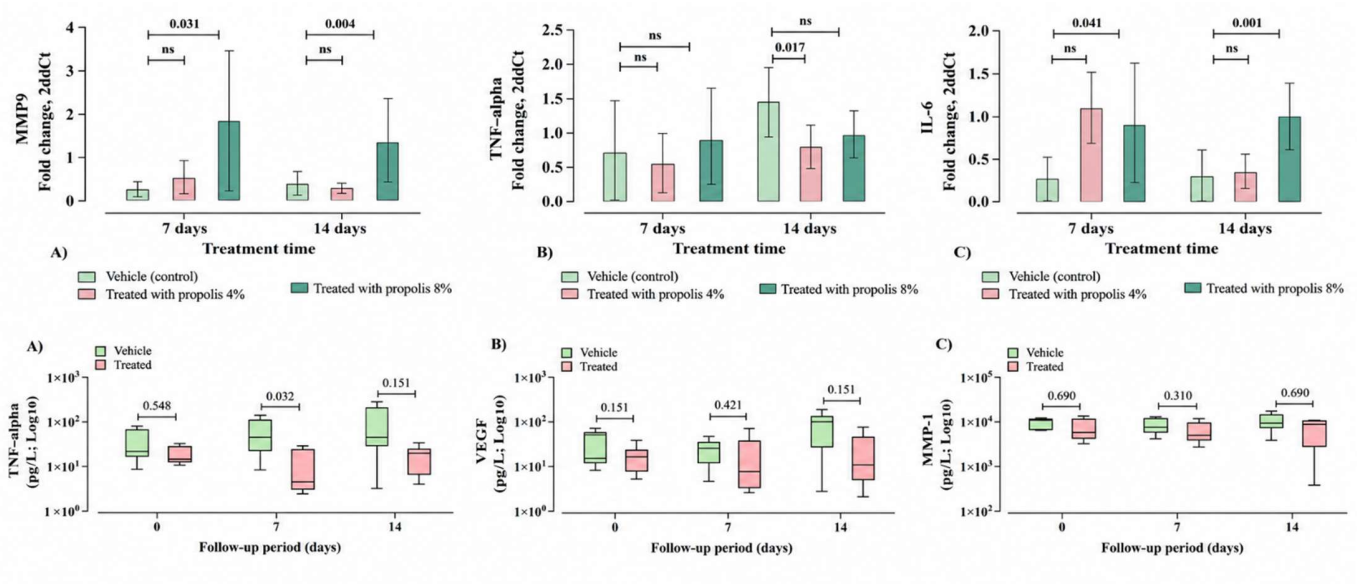


Figure 4. Effect of green propolis extract (GPE) on the gene expression of matrix metalloproteinase and inflammatory mediators in HaCaT keratinocytes. Relative mRNA expression levels of (A) MMP9, (B) TNF-alpha, and (C) IL-6 were evaluated by qPCR after 7 and 14 days of treatment. HaCaT cells were exposed to placebo (control), 4% GPE, or 8% GPE. Data are expressed as fold-change ($2^{-\Delta}$) relative to the control group and represented as mean ± standard deviation (SD). Statistical significance between groups was determined using Mann–Whitney U test; p-values are indicated above the brackets, and ns denotes non-significant differences ($p > 0.05$).

3.5. *Quantification of Cytokines*

The results obtained for cytokine expression in chronic wound exudates are consistent with those observed in gene expression analyses. On day 7, a significant reduction in TNF-α levels was observed in the investigational group compared with the placebo group ($p < 0.05$), suggesting a potential early anti-inflammatory effect of the green propolis-containing ointment during the initial phase of wound healing. In contrast, VEGF and MMP-1 levels did not show statistically significant differences between groups at the analyzed time points (Figures 5 and 6), indicating that the primary effect of the formulation at this stage may be more closely associated with modulation of inflammatory mediators rather than direct regulation of angiogenic or matrix-degrading pathways.

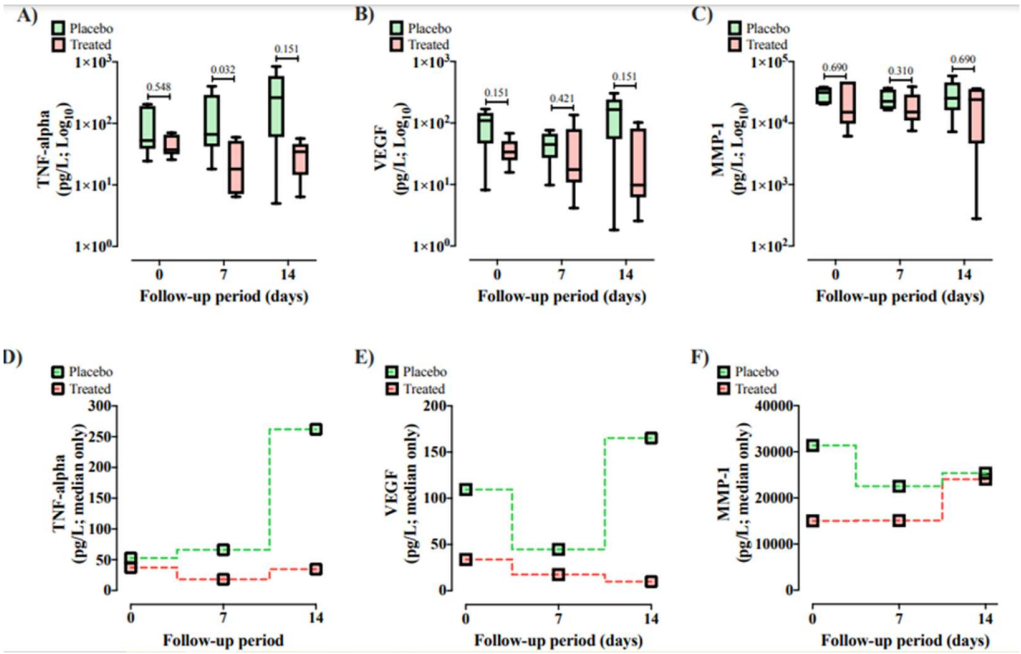


Figure 5. Association of the expression of TNF-alpha, VEGF and MMP-1 obtained from wound exudate with the response to propolis treatment in participants with leprosy. A) TNF-alpha expression profile – there was a significant difference between the groups at T7. B) VEGF expression profile – no significant differences occurred between groups. C) MMP-1 expression profile – no significant differences occurred between groups. D) Median value of TNF-alpha expression. E) Median VEGF expression value. F) Median value of MMP-1 expression.

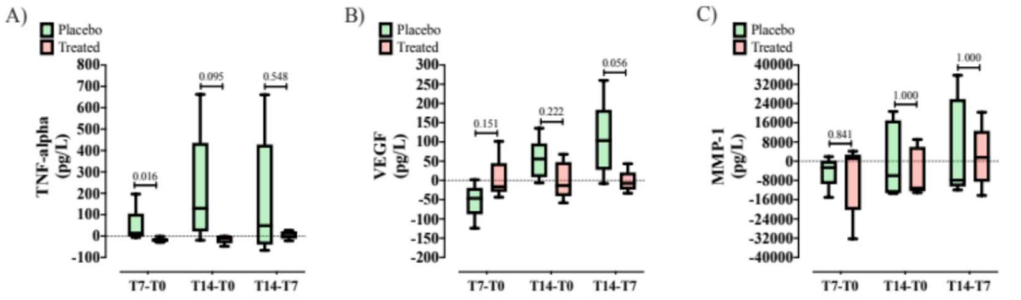


Figure 6. Association of the expression of TNF-alpha, VEGF and MMP-1 obtained from wound exudate with the response to propolis treatment in participants with leprosy. A) Difference in TNF-alpha expression on the 7th and 14th day in relation to day 0 (start of treatment). B) Difference in VEGF expression on the 7th and 14th day in relation to day 0 (start of treatment). C) Difference in MMP-1 expression on the 7th and 14th day in relation to day 0 (start of treatment).

4. Discussion

The observed GPE biological activities may be partially explained by the chemical profile of the analyzed extract. LC-MS annotation revealed the presence of phenolic acids and flavonoids, including artepillin C, naringenin, aromadendrin derivatives, and quercetin-related compounds. GPE is particularly characterized by artepillin C, a compound associated with anti-inflammatory, antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties. Rather than acting individually, these compounds may exert synergistic effects on pathways involved in inflammation control and tissue repair. In this regard, the detection of artepillin C not only supports the chemical characterization of the analyzed extract but also corroborates its classification as Brazilian green propolis [21].

The presence of phenolic acids and flavonoids values is higher than those reported for other propolis types. For example, Brazilian brown propolis typically presents values around 119.2 mg GAE/g, whereas dark propolis presented values around 90.2 mg GAE/g [22].Previous studies have reported that total phenolic contents for green propolis ranging between 22.58 and 61.62 mg GAE/g [21], suggesting that the analyzed sample exhibits a relatively high phenolic concentration under the conditions evaluated. According to Teixeira et al. (2023) [23], Brazilian propolis extracts from Minas Gerais submitted to pretreatment at moderate temperature (50 °C) combined with ultrasound exhibited a significant increase in total phenolic content (194.12 ± 3.40 to 439.05 ± 0.90 mg GAE/g) [23]. Thus, the high phenolic content observed in the analyzed extract, along with the presence of marker compounds such as artepillin C, reinforces both remarkable antioxidant potential and the distinctive chemical profile of Humanitas Brazilian green propolis when compared with other propolis types worldwide.

Persistent microbial colonization is an important barrier to wound healing, particularly in chronic ulcers, where pathogens contribute to sustained inflammation and tissue damage [24]. In the present study, GPE showed selective antimicrobial activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA), with limited activity against Gram-negative bacteria. This finding is clinically relevant because S. aureus is one of the most common pathogens in chronic wounds and is associated with biofilm formation, persistent inflammation, and delayed tissue repair. Beyond direct antimicrobial action, the biological significance of controlling S. aureus may extend to wound microenvironment regulation.

In addition to antimicrobial activity, GPE induced concentration-dependent effects on fibroblast and keratinocyte proliferation. Lower concentrations stimulated cell growth, whereas higher concentrations attenuated proliferation, suggesting a biphasic biological response. Fibroblasts are involved in the synthesis of the extracellular matrix and the

deposition of collagen, while keratinocytes regulate re-epithelialization and the restoration of skin integrity [25]. Therefore, the stimulation of these cell populations at lower concentrations suggests that green propolis may promote cellular processes associated with the proliferative phase of wound healing.

The inflammatory phase of wound healing is characterized by the coordinated production of cytokines that regulate leukocyte recruitment, pathogen clearance, and the subsequent transition to tissue repair [26]. Treatment with GPE modulated the expression of inflammatory mediators and extracellular matrix remodeling enzymes in HaCaT keratinocytes in a concentration- and time-dependent manner, while clinical evaluation of chronic wound exudates revealed a significant attenuation in TNF-alpha protein levels during the early phase of topical therapy. Together, these findings suggest that GPE exerts a pivotal role in modulating the inflammatory microenvironment, thereby creating a molecular milieu favorable for accelerated tissue repair.

Among the evaluated inflammatory mediators, TNF-alpha exhibited the most consistent and biologically relevant response to treatment. Although transcript changes were not statistically significant after 7 days of in vitro exposure, a significant downregulation was detected after 14 days in cells treated with 4% GPE. This finding is particularly relevant because TNF-alpha acts as a master regulator of inflammation and is characteristically elevated in non-healing chronic wounds, where it perpetuates chronic leukocyte activation, exacerbates oxidative stress, and drives extracellular matrix degradation. The reduction in TNF-alpha gene expression observed in keratinocytes is further corroborated by the clinical findings, which showed significantly lower TNF-alpha concentrations in wound exudates from patients receiving the propolis-containing ointment after 7 days of treatment. This synchrony between transcription kinetics and protein-level analyses strengthens the evidence that GPE exerts robust anti-inflammatory effects both at the cellular and tissue levels [27].

The observed modulation of TNF-α may be related to the well-documented bioactive compounds present in Brazilian green propolis, including artepillin C, Naringenin and Gallic acid. These compounds have been reported to interfere with NF-κB signaling, a key pathway controlling the transcription of numerous pro-inflammatory cytokines, including TNF-α [11]. Suppression of NF-κB activation may therefore represent one of the mechanisms underlying the anti-inflammatory effects observed in the present study. Such modulation is particularly important in chronic wounds, where sustained activation of inflammatory pathways contributes to delayed healing and tissue destruction [28].

In contrast to the transcription profile observed for TNF-alpha, IL-6 expression was significantly upregulated following GPE treatment,

particularly at higher concentrations. Although IL-6 is traditionally classified as a pro-inflammatory cytokine, its kinetic role in wound healing is intricate and context-dependent. During the early stages of cutaneous repair, IL-6 plays a pivotal role in driving keratinocyte migration, orchestrating re-epithelialization, and priming innate immune responses [29]. Experimental studies have demonstrated that IL-6 deficiency profoundly impairs wound closure and leads to aberrant or delayed tissue regeneration [30]. Therefore, the increased IL-6 expression observed in GPE-treated keratinocytes, especially after prolonged exposure to 8% GPE, may not necessarily indicate a detrimental inflammatory response. Instead, it likely reflects the activation of reparative signaling cascade involved in epithelial regeneration and tissue remodeling. Intriguingly, the concomitant downregulation of TNF-alpha and upregulation of IL-6 suggest that GPE does not simply exert a blanket suppression on inflammation, but rather promotes a finely-tuned, balanced cellular response that supports optimal tissue repair.

A similar concentration-dependent effect was observed for MMP9 gene expression. Matrix metalloproteinase-9 plays a critical role in cutaneous wound healing by proteolytically cleaving components of the extracellular matrix and the basement membrane, thereby facilitating keratinocyte migration and tissue remodeling [31]. While excessive and sustained MMP9 activity is a hallmark of chronic, non-healing wound pathologies, transient upregulation during the proliferative phase is fundamentally essential for normal re-epithelialization [32]. The significant upregulation of MMP9 observed after treatment with 8% GPE may therefore indicate the induction of physiological remodeling mechanisms rather than pathological matrix degradation. This interpretation is supported by the absence of concomitant TNF-alpha elevation at the same concentration and by the overall favorable inflammatory profile induced by the treatment.

Interestingly, despite the upregulated expression of MMP9 in keratinocytes, no significant differences were detected in Mmp1 protein levels within chronic wound exudates. This discrepancy may be explained by the distinct biological functions and regulatory mechanisms that govern different subfamilies of matrix metalloproteinases. Whereas MMP9 is a gelatinase primarily involved in basement membrane remodeling and keratinocyte migration, Mmp1 functions as a collagenase that predominantly participates in the degradation of fibrillar collagen structures [33]. Furthermore, transcriptional changes observed in isolated keratinocytes in vitro do not necessarily translate directly into measurable alterations in protein concentrations within the complex and dynamic wound microenvironment, where multiple cell types contribute to cytokine and protease production.

Similarly, VEGF concentrations remained unchanged between treatment groups. VEGF is a major regulator of angiogenesis and is typically induced under hypoxic conditions during tissue repair [34]. The absence of significant

differences suggests that the beneficial effects of GPE during the evaluated period may be mediated primarily through inflammatory modulation rather than direct stimulation of angiogenic pathways. Alternatively, VEGF regulation may occur at different stages of healing that were not captured by the selected time points.

A plausible mechanism is that propolis at moderate concentrations primarily exerts anti-inflammatory effects by suppressing NF-κB activity, reducing transcription of TNF-α and possibly modulating IL-6 responses. Over prolonged exposure, especially at higher concentrations, propolis or its metabolites may engage additional signaling cascades (e.g. MAPK, AP-1) that favor expression of remodeling genes such as MMP9. This shift could represent a transition from inflammation control to initiation of repair and matrix reorganization.

In this regard, the presence of exudate in the wound bed warrants consideration. Wounds treated with GPE showed a marked improvement in the PUSH score related to wound appearance, with an almost complete absence of exudate compared with the placebo group. Although exudate is a physiological component of the inflammatory phase, its persistence is commonly associated with prolonged inflammation and may impair progression to subsequent stages of healing [35-37]. Therefore, the reduced exudate observed in the GPE-treated wounds, together with the significant decrease in inflammatory cytokines, suggests attenuation of the chronic inflammatory state characteristic of non-healing wounds. This modulation may facilitate progression toward the proliferative and remodeling phases of tissue repair.

Because cytokine quantification was performed using wound exudate samples, collection was limited to the first two weeks of treatment. During this period, exudate volume decreased substantially, precluding further sampling and limiting the longitudinal evaluation of healing-related cytokines. Although plasma analysis could theoretically allow longer-term monitoring, it may not accurately reflect the local wound microenvironment because circulating cytokine levels are influenced by systemic factors, including hormonal fluctuations, circadian rhythms, physiological variability, and cortisol levels [38]. Consequently, the absence of significant changes in VEGF and metalloproteinases should be interpreted with caution, as the restricted sampling period may have limited the detection of later biological effects. Extended local monitoring could provide a more comprehensive understanding of the dynamics of these mediators and their relationship with progression toward a healing profile resembling acute wound repair.

It is also important to consider that, the various extrinsic and intrinsic factors directly linked to the tissue repair process, such as the anatomical location of the injury, skin type, race, age of the patient, as well as hygiene

conditions, nutritional status, exercise practice and cultural and working conditions [39], may influence the individual response time to treatment. Considering that a previous clinical study conducted by our research group demonstrated the healing effects of GPE in chronic ulcers resulting from leprosy through morphometric analyses, the findings of the present study further support the hypothesis that this extract may contribute to biological mechanisms involved in tissue repair. This potential appears to be related to its proliferative effect on fibroblasts and keratinocytes, its antimicrobial activity against skin-colonizing bacteria that may impair wound healing, and its anti-inflammatory action, which may favor a more balanced cytokine profile during the healing process.

Although this proposed mechanism may help explain the time- and dose-dependent effects of green propolis on inflammatory and remodeling-related gene expression, several limitations should be acknowledged. First, the use of a single cell line, HaCaT keratinocytes, limits the interpretation of these findings to keratinocyte biology. Therefore, validation in primary keratinocytes, fibroblasts, and 3D skin models would strengthen the generalizability of the results. Second, only mRNA expression was evaluated, meaning that post-transcriptional regulation, protein expression, and enzymatic activation remain to be investigated. Third, upstream signaling pathways, such as NF-κB, MAPK, and STAT3, were not assessed, which prevents a direct mechanistic link between propolis exposure and gene regulation and finally, Although the use of healthy cells provides a useful basal reference, it does not fully recapitulate the altered molecular and inflammatory context of injured or diseased tissue, which may influence cellular responses to propolis.

Therefore, these findings suggest that the main therapeutic effects of green propolis in chronic ulcers occur during the first week of treatment, corresponding to the inflammatory phase of wound healing. Future studies should investigate the effects of longer treatment periods and evaluate whether combining green propolis with therapies targeting the proliferative and remodeling phases could further enhance the healing of chronic wounds

5. Conclusions

The present study combined chemical characterization, antimicrobial testing, cellular assays, gene-expression analysis, and wound exudate profiling to investigate the biological mechanisms potentially underlying the beneficial effects of Brazilian green propolis in chronic wound healing. Collectively, our findings suggest that green propolis may contribute to tissue repair through a coordinated modulation of inflammatory responses, selective antimicrobial activity against skin-associated pathogens, and stimulation of cellular responses involved in tissue remodeling.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

GPE	Green Propolis Extract
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
IL-6	Interleukin 6
MMP-9	Matrix Metalloproteinase 9
MMP-1	Matrix Metalloproteinase 1
HaCaT	Human Adult Low Calcium High Temperature keratinocyte cell line
HFF-1	Human Foreskin Fibroblast-1
LC-MS	Liquid Chromatography–Mass Spectrometry
UPLC	Ultra-Performance Liquid Chromatography
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High-Resolution Mass Spectrometry
ACN	Acetonitrile
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
SISGEN	National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge
QC	Quality Control
FBS	Fetal Bovine Serum
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay
RT-qPCR	Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction
PBS	Phosphate-Buffered Saline
RNA	Ribonucleic Acid
mRNA	Messenger RNA
cDNA	Complementary DNA
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
SYBR Green	DNA-binding fluorescent dye used in qPCR
ROX	Passive Reference Dye
RNase	Ribonuclease
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
MAGPIX	Multiplex bead-based detection system (Luminex)
PQN	Probabilistic Quotient Normalization
FDR	False Discovery Rate
SD	Standard Deviation
ANOVA	Analysis of Variance
MRSA	Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus
CFU	Colony Forming Units
TSA	Tryptic Soy Agar
GAE/g	Gallic Acid Equivalents per gram
ppm	Parts Per Million
m/z	Mass-to-Charge Ratio
RT	Retention Time

ME	Mass Error
IM	Ionization Mode
Da	Dalton
μg/mL	Micrograms per milliliter
μL	Microliter
mg/mL	Milligrams per milliliter
NF-κB	Nuclear Factor kappa B
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
AP-1	Activator Protein 1
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
GNPS	Global Natural Products Social Molecular Networking
MSI	Metabolomics Standards Initiative
MSE	Data-independent MS acquisition mode (Waters)
TPC	Total Phenolic Content
TF	Total Flavonoids
RBR	Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (Brazilian Registry of Clinical Trials)
CAAE	Certificate of Presentation for Ethical Consideration
HUSF	Hospital Universitário São Francisco na Providência Divina
USF	Universidade São Francisco
GPE	Green Propolis Extract
TNF-α	Tumor Necrosis Factor alpha
IL-6	Interleukin 6
MMP-9	Matrix Metalloproteinase 9
MMP-1	Matrix Metalloproteinase 1
HaCaT	Human Adult Low Calcium High Temperature keratinocyte cell line
HFF-1	Human Foreskin Fibroblast-1
LC-MS	Liquid Chromatography–Mass Spectrometry
UPLC	Ultra-Performance Liquid Chromatography
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography
HRMS	High-Resolution Mass Spectrometry
ACN	Acetonitrile
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
SISGEN	National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge
QC	Quality Control
FBS	Fetal Bovine Serum

References

1. Junker JP, Kamel RA, Caterson EJ, Eriksson E. Clinical Impact Upon Wound Healing and Inflammation in Moist, Wet, and Dry Environments. Adv Wound Care (New Rochelle). 2013;2(7):348–56. doi: 10.1089/wound.2012.0412.

2. Ousey K, Cutting KF, Rogers AA, Rippon MG. The importance of hydration in wound healing: reinvigorating the clinical perspective. J Wound Care. 2016;25(3):122–30. doi: 10.12968/jowc.2016.25.3.122.
3. Firlar I, Altunbek M, McCarthy C, Ramalingam M, Camci-Unal G. Functional Hydrogels for Treatment of Chronic Wounds. Gels. 2022;8(2):127. doi: 10.3390/gels8020127.
4. Lawton S. Skin 1: the structure and functions of the skin. Nurs Times. 2019;115(12):30–3.
5. Abdo J, Sopko NA, Milner SM. The applied anatomy of human skin: A model for regeneration. Wound Med. 2020;28:100179. doi: 10.1016/j.wndm.2020.100179.
6. Raziyeva K, Kim Y, Zharkinbekov Z, Kassymbek K, Jimi S, Saparov A. Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. Biomolecules. 2021;11(5):700. doi: 10.3390/biom11050700.
7. Sylakowski K, Wells A. ECM-regulation of autophagy: The yin and the yang of autophagy during wound healing. Matrix Biol. 2021;100-101:197–206. doi: 10.1016/j.matbio.2021.01.001.
8. Ren H, Zhao F, Zhang Q, Huang X, Wang Z. Autophagy and skin wound healing. Burns Trauma. 2022;10:tkac026. doi: 10.1093/burnst/tkac026.
9. Bogliolo L, Brasileiro-Filho G. Patologia. 8th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.
10. Marcucci MC. Biological and Therapeutic Properties of Chemical Própolis Constituents. Quim Nova. 1996;19(5):29-36. doi: 10.1590/S0100-40421996000500010.
11. Beserra FP, Gushiken LFS, Hussni MF, Ribeiro VP, Bonamin F, Jackson CJ, et al. Artepillin C as an outstanding phenolic compound of Brazilian green propolis for disease treatment: A review on pharmacological aspects. Phytother Res. 2021;35(5):2274–86. doi: 10.1002/ptr.6989.
12. Rosa CD, et al. Randomized clinical evaluation of the healing activity of green propolis ointment in individuals with lower limb ulcers resulting from leprosy: preliminary results of a pilot study. Pharmaceuticals. 2025;18(1):71. doi: 10.3390/ph18010071.
13. Silva-Carvalho R, Baltazar F, Almeida-Aguiar C. Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. Evid Based Complement Alternat Med. 2015;2015:206439. doi: 10.1155/2015/206439.
14. Quintino RL, Reis AC, Fernandes CC, Martins CHG, Colli AC, Crotti AEM, et al. Brazilian Green Propolis: Chemical Composition of Essential Oil and Their In Vitro Antioxidant, Antibacterial and Antiproliferative Activities. Braz Arch Biol Technol. 2020;63:e20190081. doi: 10.1590/1678-4324-2020190081.
15. Huang C, Leavitt T, Bayer LR, Orgill DP. Effect of negative pressure wound therapy on wound healing. Curr Probl Surg. 2014;51(7):301–31. doi: 10.1067/j.cpsurg.2014.04.001.
16. Huang C, Zhuo F, Guo Y, Wang S, Zhang K, Li X, et al. Skin microbiota: pathogenic roles and implications in atopic dermatitis. Front Cell Infect Microbiol. 2025;14:1518811. doi: 10.3389/fcimb.2024.1518811.
17. Sforcin JM. Biological properties and therapeutic applications of propolis. Phytother Res. 2016;30(6):894–905. doi: 10.1002/ptr.5605.
18. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. Sci Transl Med. 2014;6(265):265sr6. doi: 10.1126/scitranslmed.3009337.
19. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Vitic. 1965;16(3):144–58. doi: 10.5344/ajev.1965.16.3.144.
20. Cutting KF. Wound exudate: composition and functions. Br J Community Nurs. 2003;8(9):S4–9. doi: 10.12968/bjcn.2003.8.Sup3.11577.
21. Park YK, Alencar SM, Aguiar CL. Chemical Composition of Natural Products and Propolis. J Agric Food Chem. 2002;50(9):2502-6. doi: 10.1021/jf011432b.
22. Vieira ALS, Correia VTDV, Ramos ALCC, da Silva NHA, Jaymes LAC, Melo JOF, et al. Evaluation of the Chemical Profile and Antioxidant Capacity of Green, Brown, and Dark Propolis. Plants (Basel). 2023;12(18):3204. doi: 10.3390/plants12183204.

23. Teixeira TD, Machado BAS, Barreto GA, dos Anjos JP, Leal IL, Nascimento RQ, et al. Extraction of Antioxidant Compounds from Brazilian Green Propolis Using Ultrasound-Assisted Associated with Low- and High-Pressure Extraction Methods. Molecules. 2023;28(5):2338. doi: 10.3390/molecules28052338.
24. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management. Clin Microbiol Rev. 2001;14(2):244-69. doi: 10.1128/cmr.14.2.244-269.2001.
25. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. Nature. 2008;453(7193):314–21. doi: 10.1038/nature07039.
26. Peña OA, Martin P. Cellular and molecular mechanisms of skin wound healing. Nat Rev Mol Cell Biol. 2024;25(4):599–616. doi: 10.1038/s41580-024-00715-1.
27. Oryan A, Alemzadeh E, Moshiri A. Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. Biomed Pharmacother. 2018 Feb;98:469-483. doi: 10.1016/j.biopha.2017.12.069.
28. Dai Y, Chen Y. Targeting persistently activated inflammatory microenvironment to promote chronic wound healing. Front Immunol. 2025;16:1708358. doi: 10.3389/fimmu.2025.1708358.
29. Krzyszczyk P, Schloss R, Palmer A, Berthiaume F. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. Front Physiol. 2018 May 1;9:419. doi: 10.3389/fphys.2018.00419.
30. Lin ZQ, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. J Leukoc Biol. 2003 Jun;73(6):713-21. doi: 10.1189/jlb.0802397.
31. Martins-Green M, Petreaca M, Wang L. Chemokines and Their Receptors Are Key Players in the Orchestra That Regulates Wound Healing. Adv Wound Care (New Rochelle). 2013;2(7):327-47. doi: 10.1089/wound.2012.0380.
32. Fu K, Zheng X, Chen Y, Wu L, Yang Z, Chen X and Song W (2022) Role of matrix metalloproteinases in diabetic foot ulcers: Potential therapeutic targets. Front Pharmacol. 2022. 13:1050630. doi: 10.3389/fphar.2022.1050630.
33. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, Ramirez-Acuña JM, Perez-Romero BA, Guerrero-Rodriguez JF, Martinez-Avila N, Martinez-Fierro ML. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. Int J Mol Sci. 2020 Dec 20;21(24):9739. doi: 10.3390/ijms21249739.
34. Shi Z, Yao C, Shui Y, Li S, Yan H. Research progress on the mechanism of angiogenesis in wound repair and regeneration. Front Physiol. 2023;14:1284981. doi: 10.3389/fphys.2023.1284981.
35. Brandão ES. Enfermagem em dermatologia: cuidados técnico, dialógico e solidário. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2006.
36. Dealey C. Cuidando de feridas: um guia prático para as enfermeiras. 3rd ed. Sao Paulo: Atheneu; 2008.
37. Orosco SS, Martins EAP. Avaliação de feridas: uma descrição para sistematização da assistência. Enfermagem Atual. 2005;5(1):39-46.
38. Koelman L, Pivovarova-Ramich O, Pfeiffer AFH. Cytokines for evaluation of chronic inflammatory status in ageing research: reliability and phenotypic characterisation. Immun Ageing. 2019;16(1):11. doi: 10.1186/s12979-019-0151-1.
39. Jorge AS, Dantas SRPE. Abordagem multiprofissional do Tratamento de feridas. Sao Paulo: Atheneu; 2003.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

3. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o extrato de própolis verde brasileira apresenta importante potencial terapêutico no processo de cicatrização de úlceras cutâneas, atuando de forma integrada sobre diferentes mecanismos biológicos envolvidos nas fases inflamatória e proliferativa do reparo tecidual. A combinação das análises clínicas, moleculares, microbiológicas e celulares permitiu uma compreensão mais abrangente dos efeitos da própolis, evidenciando que sua ação vai além da atividade antimicrobiana, envolvendo também a modulação da resposta inflamatória e o estímulo direto às células responsáveis pela regeneração da pele.

Os achados mostraram que o extrato promove a proliferação de fibroblastos e queratinócitos, exerce atividade antimicrobiana seletiva contra *Staphylococcus aureus* e reduz mediadores inflamatórios associados à cronificação das feridas, especialmente o TNF-α. Além disso, a modulação da expressão de genes relacionados ao remodelamento da matriz extracelular e à resposta inflamatória reforça a hipótese de que a própolis verde brasileira favorece uma transição mais eficiente entre as fases da cicatrização, contribuindo para um ambiente biológico mais propício ao reparo tecidual.

Em conjunto, os resultados corroboram os achados clínicos previamente observados em pacientes com úlceras decorrentes da hanseníase, fortalecendo as evidências de que a própolis verde brasileira constitui uma alternativa terapêutica promissora para o tratamento de feridas crônicas. Seu perfil multifatorial de ação, associado ao baixo custo, ampla disponibilidade e potencial segurança, destaca esse produto natural como uma estratégia complementar de grande interesse para a prática clínica.

Por fim, embora os resultados sejam consistentes e ampliem significativamente o conhecimento sobre os mecanismos de ação da própolis verde brasileira, novos estudos clínicos com maior número de participantes, acompanhamento em longo prazo e investigação de vias moleculares adicionais são necessários para consolidar sua aplicação terapêutica e possibilitar sua incorporação em protocolos clínicos baseados em evidências.

REFERÊNCIAS

ABBADE, L. P. F. et al. Consensus on the diagnosis and management of chronic leg ulcers - Brazilian Society of Dermatology. Anais Brasileiros de Dermatologia, v. 95, p. 1–18, 2020.

ABDO, J.; SOPKO, N. A.; MILNER, S. M. The applied anatomy of human skin: a model for regeneration. Wound Medicine, v. 28, p. 100179, 2020.

ALMEIDA, N. C.; BORGES, M. M. S.; MARCELINO, G. R.; ROCHA, P. R. S. O uso de ferramentas na avaliação de feridas crônicas de membros inferiores: revisão integrativa. Revista de Enfermagem UFPE On Line, Recife, v. 17, n. 1, 2023. DOI: 10.5205/1981-8963.2023.254453.

BESERRA, F. P. et al. Artepillin C as an outstanding phenolic compound of Brazilian green propolis for disease treatment: a review on pharmacological aspects. Phytotherapy Research, v. 35, p. 2274–2286, 2021. DOI: https://doi.org/10.1002/ptr.6875.

CARDOSO, E. O. et al. Brazilian green propolis: a novel tool to improve the cytotoxic and immunomodulatory action of docetaxel on MCF-7 breast cancer cells and on women monocyte. Phytotherapy Research, v. 36, n. 1, p. 448–461, 2022. DOI: 10.1002/ptr.7345.

DA ROSA, C. et al. Healing potential of propolis in skin wounds evidenced by clinical studies. Pharmaceuticals, v. 15, n. 1143, 2022.

DOS SANTOS, F. F. et al. A review on the anti-inflammatory activities of Brazilian green, brown and red propolis. Journal of Food Biochemistry, v. 46, n. 10, e14350, 2022. DOI: 10.1111/jfbc.14350.

FALANGA, V. et al. Chronic wounds. Nature Reviews Disease Primers, v. 8, n. 50, 2022. DOI: https://doi.org/10.1038/s41572-022-00377-3.

FERREIRA, A. C. G. R. et al. Skin healing: a literature review. Journal Archives of Health, v. 5, n. 3, p. 1–10, 2024.

FILHO, G. B. Bogliolo - Patologia. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021. E-book. ISBN 9788527738378.

FIRLAR, I. et al. Functional hydrogels for treatment of chronic wounds. Gels, v. 8, n. 2, p. 127, 2022.

GRAVES, N.; PHILLIPS, C. J.; HARDING, K. A narrative review of the epidemiology and economics of chronic wounds. British Journal of Dermatology, v. 187, n. 2, p. 141–148, 2022. DOI: 10.1111/bjd.20692.

HUANG, C. et al. Skin microbiota: pathogenic roles and implications in atopic dermatitis. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 14, 2025.

JUNKER, J. P. et al. Clinical impact upon wound healing and inflammation in moist, wet, and dry environments. Advances in Wound Care, v. 2, n. 7, p. 348–356, 2013.

KANDHWAL, M. et al. Role of matrix metalloproteinase in wound healing. American Journal of Translational Research, v. 14, n. 7, p. 4391–4405, 2022.

KLIONSKY, D. J. et al. Autophagy in major human diseases. The EMBO Journal, v. 40, n. 19, 2021.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Robbins e Cotran patologia: bases patológicas das doenças. 10. ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2023.

LACINA, Lukáš; KOLÁŘ, Michal; PFEIFEROVÁ, Lucie; GÁL, Pavel; SMETANA JUNIOR, Karel. Wound healing: insights into autoimmunity, ageing, and cancer ecosystems through inflammation

and IL-6 modulation. Frontiers in Immunology, Lausanne, v. 15, art. 1403570, 2024. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1403570.

LAWTON, S. Skin 1: the structure and functions of the skin. Nursing Times, v. 115, n. 12, p. 30–33, 2019.

LEARNED, A.; ROBINSON, S. A.; NGUYEN, T. T. Comprehensive care of lower-extremity wounds. Surgical Clinics of North America, v. 103, n. 4, p. 745–765, 2023. DOI: 10.1016/j.suc.2023.04.015.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective. Cell, v. 176, n. 1–2, p. 11–42, 2019.

LOPES, Fernanda Barbosa; SARANDY, Mariáurea Matias; NOVAES, Rômulo Dias; et al. Inflammatory responses in the wound healing process: a systematic review. Antioxidants, Basel, v. 13, n. 7, art. 823, 2024. DOI: 10.3390/antiox13070823.

MEDEIROS, A. C.; DANTAS-FILHO, A. M. Healing of surgical wounds. Journal of Surgical and Clinical Research, v. 7, n. 2, p. 87–102, 2017.

MIJALJICA, D. et al. Autophagy is the key to making chronic wounds acute in skin wound healing. Autophagy, v. 19, n. 9, p. 2578–2584, 2023.

OUSEY, K. et al. The importance of hydration in wound healing: reinvigorating the clinical perspective. Journal of Wound Care, v. 25, n. 3, p. 122–130, 2016.

PALACKIC, A. et al. Therapeutic strategies to reduce burn wound conversion. Medicina, v. 58, n. 7, p. 922, 2022.

PEÑA, Oscar A.; MARTIN, Paul. Cellular and molecular mechanisms of skin wound healing. Nature Reviews Molecular Cell Biology, London, v. 25, n. 8, p. 599–616, 2024. DOI: 10.1038/s41580-024-00715-1.

RAZIYEVA, K. et al. Immunology of acute and chronic wound healing. Biomolecules, v. 11, n. 5, p. 700, 2021.

REN, H. et al. Autophagy and skin wound healing. Burns & Trauma, v. 10, 2022.

RIPSZKY, A. T. et al. The Yin and Yang dualistic features of autophagy in thermal burn wound healing. International Journal of Immunopathology and Pharmacology, v. 36, 2022.

ROSA, C. D. et al. Randomized clinical evaluation of the healing activity of green propolis ointment in individuals with lower limb ulcers resulting from leprosy: preliminary results of a pilot study. Pharmaceuticals, v. 17, n. 1622, 2024.

SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; MARCUCCI, M. C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. Chemistry Central Journal, v. 5, n. 1, p. 153–157, 2011.

SILVEIRA, A. C. et al. Propriedades biológicas e potencial terapêutico da própolis: uma revisão integrativa da literatura. Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research, v. 35, n. 1, p. 65–77, 2021.

SYLAKOWSKI, K.; WELLS, A. ECM-regulation of autophagy: the yin and the yang of autophagy during wound healing. Matrix Biology, v. 100–101, p. 197–206, 2021.

UEDA, T. et al. The effects of Brazilian green propolis that contains flavonols against mutant copper-zinc superoxide dismutase-mediated toxicity. Scientific Reports, v. 7, n. 1, p. 2882, 2017.

VAN LOO, G.; BERTRAND, M. J. M. Death by TNF: a road to inflammation. Nature Reviews Immunology, v. 23, p. 289–303, 2023. DOI: https://doi.org/10.1038/s41577-022-00792-3.

YANG, J. et al. Research progress on therapeutic effect and mechanism of propolis on wound healing. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2022, p. 5798941, 2022. DOI: 10.1155/2022/5798941.

ZHANG, Junhua; ONAKPOYA, Igho J.; POSADZKI, Paul; EDDOUKS, Mohamed. The Safety of Herbal Medicine: From Prejudice to Evidence. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2015, Article ID 316706, p. 1–3, 2015. DOI: 10.1155/2015/316706

ZEPPA, L.; AGUZZI, C.; MORELLI, M. B. Exploring the therapeutic potential of natural compounds and plant extracts in human health. Biomolecules, 2025.