

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências de Botucatu

IBB/ UNESP

Relatório Anual

Ação Antibacteriana, Imunomoduladora e Cicatrizante Do Extrato
Padronizado De Própolis Vermelha e Da Fração Rica Em Benzofenonas:
Predições Computacionais e Desenvolvimento De Produto Tópico Para
Tratamento De Infecções Cutâneas

Processo FAPESP Número **2023/01436-9**

Dr. Nicolas Ripari

Supervisor: Professor Titular José Maurício Sforcin

Relatório de projeto de
pós-doutorado apresentado
ao Instituto de Biociências
de Botucatu como requisito
anual para
pós-doutorandos

Botucatu- Agosto 2024

Resumo

Feridas de difícil cicatrização representam um sério problema de saúde pública por recorrentes infecções bacterianas em ambiente hospitalar. Dentre os principais patógenos multi-droga resistentes destas infecções, está o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Indivíduos portadores de diabetes, obesidade e acamados que sofrem com úlcera por pressão, acabam desenvolvendo infecções cutâneas por MRSA que podem tornar-se invasivas e levar a sérios problemas, como sepse. O presente relatório apresenta os resultados do primeiro ano de pós-doutorado (processo FAPESP 2023/01436-9) do participante junto ao setor de microbiologia e imunologia do departamento de ciências químicas e biológicas do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP. Foram realizados experimentos com isolados clínicos de MRSA provenientes de infecções cutâneas. Testes de microdiluição em caldo para determinar concentração inibitória e bactericida mínima (MIC e MBC) de extratos de própolis vermelha e seus componentes isolados, teste de sinergismo entre Gutiferona E, Oblongifolina A e antimicrobianos foram realizados a fim de propor possíveis formulações. Avaliação de viabilidade de monócitos THP-1 diferenciados em macrófagos resultou na triagem do composto Gutiferona E e duas formulações utilizando Gutiferona e antimicrobianos. Testes antibiofilme com cepas de MRSA ATCC 33591 e USA300, foram realizados com estas fórmulas além de avaliação de atividade bactericida de macrófagos contra a cepa MRSA isolada de ferida, USA300. Gutiferona E e duas das fórmulas obtidas impediram a formação de biofilme das cepas e aumentaram de forma significativa, a capacidade de *killing* bacteriano por macrófagos THP-1 previamente imunossuprimidos e desafiados com a USA300. As MICs e MBCs de Gutiferona E foram baixas indicando alto potencial antibacteriano/bactericida desta benzofenona.

Além do mais, um possível mecanismo de ação da Gutiferona E foi analisado por *molecular docking* sobre a principal enzima de resistência do MRSA, a PBP2a mostrando alta afinidade com o sítio ativo e alostérico desta enzima. Isto indica que o mecanismo de ação antibacteriano do composto seja bloqueando a ação desta enzima na construção da parede bacteriana, matando a bactéria por lise osmótica. Atualmente, estão sendo realizados testes de migração celular com estas formulações sobre culturas 2D e 3D de queratinócitos e fibroblastos. Perspectivas para o segundo ano de projeto são confeccionar hidrogel com a fórmula que obtiver resultados satisfatórios e testar sua permeação cutânea em projeto de bolsa de pesquisa no exterior (BEPE), já submetido. Artigo científico com os resultados presentes neste relatório já está em vias de submissão.

Introdução

Feridas de difícil cicatrização representam um sério problema de saúde pública, principalmente para pessoas com comorbidades como diabetes e obesidade (Greenhalgh, 2003). Essa situação não só compromete a saúde pública como também causa prejuízos de cerca de 300 bilhões de dólares anualmente nos EUA (Burgess et al., 2021), devido à infecções de pele recorrentes.

O *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA - do inglês *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) é um dos patógenos mais frequentes que causam infecções profundas em feridas (Zhou et al., 2024), apresentando o gene *mecA* como *fingerprint*. Este gene codifica a proteína de ligação de penicilina (PBP - do inglês *Penicillin Binding Protein*) 2a (Lade & Kim 2023). As PBPs são enzimas essenciais na *cross-linking* da parede bacteriana, prevenindo assim a lise osmótica da bactéria em soluções hipotônicas (De Lencastre et al., 1994). Os antibióticos/ antimicrobianos β -lactâmicos previnem a ação das PBPs, afetando a construção efetiva do peptidoglicano da parede e resultando na morte bacteriana durante sua divisão (Bertonha et al., 2023). Contudo, o uso extensivo de penicilinas no século XX levou a uma ampla resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos devido a mudanças conformacionais no sítio ativo da PBP2a (Tasneem et al., 2022), impedindo que o antimicrobiano exerça sua ação.

Contudo, os β -lactâmicos continuam sendo a classe mais acessível de antimicrobianos contra infecções cutâneas/invasivas adquiridas em hospitais e causadas por MRSA dentre outras bactérias (Lima et al., 2020). O tratamento das feridas inclui o debridamento e limpeza da pele infectada associado ao uso de antimicrobianos ou desinfetantes tópicos (Han & Ceilley, 2017). Quando os antimicrobianos não conseguem interromper a infecção cutânea por MRSA,

infecções profundas e invasivas podem aparecer, levando à sepse e morte (Lee et al., 2018). Além disso, o MRSA pode apresentar evasão do sistema imunológico e escape da fagocitose (Tasneem et al., 2022).

A cepa MRSA USA300 foi isolada de feridas e demonstrou ser a principal causa de infecção cutânea, principalmente em indivíduos imunossuprimidos (Burnham & Kollef 2018). Além do PBP2a, essa cepa apresenta outros fatores de resistência a diversas classes de antimicrobianos, como por exemplo, formação de biofilme (Nair et al., 2014; Linz et al., 2023; Kaushik et al., 2024).

Esse problema destaca a necessidade de encontrar novas formulações antimicrobianas tópicas ou sistêmicas que exerçam uma ação direta sobre o MRSA e/ou uma ação imunomoduladora sobre a imunidade inata de pacientes infectados (Watkins et al., 2012). Curiosamente, produtos de origem natural com potencial farmacológico geralmente apresentam diversas propriedades biológicas (Criollo-Mendoza et al., 2023). Além disso, moléculas originárias de produtos naturais são promissoras na química médica (Harvey et al., 2015) e produtos apícolas como a própolis representam uma grande fonte dessas moléculas (Sforcin, 2016).

A própolis exibe muitas propriedades farmacológicas devido à sua complexa composição química, que reflete as condições fitogeográficas onde foi coletada. A própolis vermelha brasileira (BRP - do inglês *Brazilian Red Propolis*) possui uma grande variedade de moléculas antimicrobianas (Freitas et al., 2017), incluindo a gutiferona E (GUT E) que pertence à classe das benzofenonas e apresenta reconhecida ação biológica *in vitro* (Wu et al., 2014; Freires et al. 2016; Conceição et al., 2023). Nosso grupo realizou análises *in silico* com benzofenonas isoladas de BRP e observou que gutiferona e oblongifolina pareciam ser agentes promissores

para ligar-se ao sítio ativo de PBP2a (Ripari, et al. 2023). Análises *in silico* são métodos importantes para descobrir novos ligantes dentro de uma gama de atividades biológicas que ainda têm mecanismos de ação desconhecidos. Entre essas ferramentas, *molecular docking* e a dinâmica molecular têm sido usadas para esse propósito (Sharma et al., 2017), visando identificar a afinidade das moléculas com seus alvos para prever quais compostos provavelmente podem exibir, por exemplo, atividade antimicrobiana, imunomoduladora e cicatrizante (Zhu et al., 2024).

Macrófagos são células capazes de combater agentes bacterianos nos tecidos em que residem (Aitcheson et al., 2021). Moléculas derivadas de própolis podem afetar a sobrevivência bacteriana e estimular a atividade antibacteriana do macrófago, podendo contribuir para a resolução de infecções persistentes no hospedeiro. A linhagem celular humana imortalizada THP-1 tem sido amplamente utilizada em ensaios laboratoriais que mimetizam as atividades de monócitos humanos (Aitcheson et al., 2014). Ela pode ser diferenciada em macrófagos quando incubada com agentes como forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (Daigneault et al., 2010), para investigar a ação moduladora de drogas ou compostos que podem afetar a ação antibacteriana de macrófagos (Gill et al., 2016).

O presente relatório contém os resultados do primeiro ano de pós-doutorado do participante enquanto junto ao departamento de ciências químicas e biológicas, setor de microbiologia e imunologia, sob supervisão do Professor Titular José Maurício Sforcin. Avaliamos os efeitos do extrato padrão de própolis vermelha (SRPE, do inglês - *Standardised Red Propolis Extract*), uma fração rica em benzofenonas (BRF, do inglês - *Benzophenone-Rich Fraction*), gutiferona E (GUT E) e oblongifolina A (OBL A) sozinhos ou em combinação com antimicrobianos

diretamente sobre MRSA isolado de feridas cutâneas. Após isso, algumas formulações foram preparadas para observar sua ação antibacteriana e imunomoduladora. Uma possível ação citotóxica e imunomoduladora sobre células THP-1 foi observada após estimulação com PMA, avaliando a produção de citocinas e a atividade de *killing* bacteriano por macrófagos desafiados com a cepa MRSA USA300. Esta atividade bactericida foi analisada usando macrófagos suprimidos por dexametasona (DEX) antes de receberem tratamentos. Predições computacionais por *molecular docking* também foram realizadas com GUT E e antimicrobianos visando observar sua interação com o sítio ativo e alostérico de PBP2a.

Atualmente, junto ao setor de morfologia do departamento de biologia estrutural e funcional - IBB/ UNESP, estamos analisando o potencial migratório de GUT E em culturas 2D e 3D de queratinócitos e fibroblastos humanos para formular um hidrogel com a concentração ótima antimicrobiana e auxiliadora de macrófagos de já encontrada. Ao obter resultados de morfometria satisfatórios (juntamente com dados de citotoxicidade e genotoxicidade), serão confeccionados hidrogéis com formulações baseadas com GUT E contendo ou não nanocarreadores, que podem ser considerados como intensificadores de permeação cutânea (Rabiei et al., 2020). Estes hidrogéis serão confeccionados pelo participante na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCF/ USP) com o auxílio do Professor Titular Jairo Kenupp Bastos, no mês de setembro/ 2024. Além do mais, foi submetido uma proposta de Bolsa de Estágio em Pesquisa no Exterior (BEPE) para a mesma instituição de fomento (FAPESP) para que, junto à universidade do Porto/ Portugal, o participante possa testar a permeação destes hidrogéis em camada sintética de *stratum corneum*.

Os resultados obtidos no atual relatório já encontram-se em vias de submissão em formato de artigo de pesquisa para periódico científico. Por este motivo, padronizamos alguns termos e nomes para a língua inglesa, com objetivo de evitar problemas de interpretação.

Metodologia

Extrato de própolis vermelha padronizado (SRPE)

O estudo foi registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o registro AF234D8. A própolis vermelha foi adquirida da Associação dos Apicultores de Canavieiras (COAPER), Bahia, Brasil. O BRP foi extraído em solução hidroalcoólica (7:3). O frasco foi mantido em agitador (Innova 4300TM) a 37 °C por 24 h), seguido de filtração. A extração foi repetida três vezes e, os extratos combinados foram concentrados em rotaevaporador a vácuo e liofilizados, seguido de análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) para verificação do seu perfil cromatográfico.

Isolamento de benzofenonas preniladas

O isolamento e a análise das benzofenonas preniladas foram realizados de acordo com Aldana-Mejia et al. (2021) e Ccana-Ccapatinta et al. (2020), com algumas modificações. O extrato bruto foi ressuspenso em uma solução de metanol/água (9:1, v/v), filtrado e particionado com heptano P.A. para extrair benzofenonas preniladas por partição líquido-líquido. A fração de heptano foi analisada por HPLC-DAD e submetida à cromatografia líquida a vácuo (VLC). Um

gel de sílica (40-60 μm , Sigma-Aldrich®, EUA) foi usado como fase estacionária na proporção de 10 g de sílica por grama de fração rica em benzofenonas (BRF). A fase estacionária foi compactada em uma coluna de vidro de 13 cm x 11 cm de diâmetro interno. Misturas de heptano: acetato de etila com polaridades crescentes (100:0 $\rightarrow$ 0:100) foram usadas como fase móvel. As subfrações obtidas de VLC foram avaliadas por cromatografia comparativa em camada fina (TLC) usando placas 60F 254 (Merck, Alemanha) e heptano: acetato de etila como fase móvel (6:4) para eluição. As placas cromatográficas foram reveladas com solução de anisaldeído sulfúrico. As subfrações com perfis de eluição semelhantes em TLC foram agrupadas e analisadas por HPLC-DAD para monitorar a presença de benzofenonas preniladas.

HPLC-DAD analítico

O extrato, fração ou compostos isolados foram dissolvidos em metanol grau HPLC a 1 mg/mL em microtubos de 1,5 mL, filtrados com filtros de politetrafluoretileno (0,45 μm) e armazenados em frascos para análise por HPLC-DAD. A análise foi realizada utilizando um sistema de HPLC Waters® 2695 equipado com bombas binárias modelo 1525, injetor automático modelo 2707 e detector de arranjo de diodos modelo 2998 acoplados ao computador através do software Empower 3. A fase estacionária consistiu de uma coluna Supelco Ascentis Express C18 (2,7 μm $\times$ 150 mm $\times$ 4,6 mm) acoplada a uma pré-coluna analítica Synergi Polar-RP (4,0 $\times$ 3,0 mm, 4 μm). A fase móvel consistiu de água purificada (Millipore) acidificada com ácido fórmico (0,1%; Synth®) (A) e acetonitrila grau HPLC (SK Chemicals) (B) a uma vazão de 1 mL/min, com um volume de injeção de 10 μL . A eluição da fase móvel foi baseada em gradiente, partindo da condição inicial de

20% B, passando de 20-50% (em 40 min), 50-100% B (até 90 min), 100% B (até 95 min) e retornando à condição inicial de 20% B (totalizando 100 min). A detecção foi realizada entre 210-600 nm, e os cromatogramas foram monitorados entre 240 e 315 nm.

HPLC preparativa

Conjuntos de subfrações enriquecidas em benzofenonas foram submetidos à HPLC preparativa para isolar os compostos de interesse. Assim, foi utilizado um sistema de HPLC Shimadzu (Prominence) equipado com detector UV/Vis (Shimadzu), bombas LC-6AD, desgaseificador DGU-20A5 e coletor automático FCR-10^a, com o sistema interligado ao computador através do software LC-Solution Single. Foi utilizada a coluna Synergi Polar-RP (4 µm, 250 × 21,5 mm; Phenomenex®); a fase móvel consistiu de água purificada (Millipore) acidificada com ácido fórmico (0,1%; Synth®) na bomba A e metanol grau HPLC (Tedia®) na bomba B, com vazão de 10 mL/min. A condição inicial foi de 70% de B, seguida de variação de B de 70 a 100% em 30 min, mantida em 100% de B por 3 min, e então retornada à condição inicial, reequilibrando a coluna por 35 min.

Identificação por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Após o isolamento, a identidade dos compostos foi confirmada por RMN (RMN de ¹H e ¹³C) em um BruckerAdvance (Santa Barbara, CA, EUA) DRX 400 operado a 500 MHz. As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl₃) para gutiferona E/xantoquimol mais 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) para oblongifolina.

Isolados de MRSA

Quatro isolados de MRSA obtidos de feridas de pacientes foram fornecidos pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, e suas identidades foram confirmadas pelo sistema VITEK® e PCR em tempo real para detecção do gene *mecA*. As cepas de MRSA USA300, ATCC 33591 e MSSA ATCC 29213 foram fornecidas pelo Setor de Microbiologia e Imunologia, IBB, UNESP em criovials à -80 °C .

Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC)

O método de microdiluição em caldo foi adotado para determinar a MIC de cada variável de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory of Standards Institute* (CLSI, 2015). Resumidamente, as cepas de MRSA foram cultivadas em placas de Petri contendo Ágar Mueller Hinton (MHA) por 20 h/37 °C. Depois, as cepas foram ajustadas para a escala de 0,5 McFarland em NaCl (0,9%) para obter 10⁸ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL e diluídas (1:100) em Caldo Mueller Hinton (MHB) (10⁶ UFC/mL).

Os antimicrobianos vancomicina (VA), cefoxitina (FOX), imipenem (IPM) e ertapenem (ETP) foram diluídos em água destilada estéril, e ceftarolina (CPT) em dimetilsulfóxido (DMSO) estéril.

GUT E, OBL A, SRPE e BRF (2 mg/mL) foram diluídos em DMSO estéril. Alíquotas foram diluídas 1:10 em MHB antes de realizar diluições seriadas 1:1 em placas de fundo em “U” de 96 poços em um volume final de 100 µL por poço. Após a diluição, isolados e cepas MRSA e MSSA 29213 (1:100 - MHB) foram inoculadas nos poços (100 µL) e incubadas por 20 h/37 °C.

Após, 10 µL de cada poço foram semeados em placas de Petri contendo ágar BHI para uma nova incubação (24 h/37 °C) para determinar a concentração bactericida mínima (MBC) das concentrações testadas. A viabilidade bacteriana foi revelada pela adição de 30 µL/poço de resazurina aquosa (0,01%). MIC₅₀ e MIC₉₀ foram calculados de acordo com Schwarz et al. (2010). Os valores de MBC foram determinados pela contagem de UFC. Os poços que receberam as concentrações que inibiram 99,9% do crescimento bacteriano na subcultura de ágar BHI foram determinados como o valor de MBC.

Ensaio de sinergismo por checkerboard

Após realizar a microdiluição em caldo, foi avaliado um possível sinergismo entre GUT E e antimicrobianos. GUT E em combinação com OBL A também foi analisado.

O método de *checkerboard* consiste em uma diluição seriada (1:1) do poço A1 para o poço G1 de uma alíquota de estoque de GUT E a partir de MIC x 8 em MHB. O mesmo procedimento foi realizado com antimicrobianos ou OBL A a partir do poço H8 para H2. Depois, diluição seriada cruzada (1:1) foi realizada nos outros poços usando uma micropipeta multicanal da coluna 1 (poços A1 - G1) até a coluna 8 (A8 - G8) e da linha H (H2 - H8) até a linha A (A2 - A8), montando uma placa com diferentes concentrações de GUT E juntamente com antimicrobianos ou OBL A (apenas uma combinação por placa).

Cada placa com sua combinação apropriada foi inoculada com as cepas USA300, ATCC 33591 ou MSSA ATCC 29213 (controle). A determinação de sinergismo, antagonismo ou indiferença foi calculada pelo índice de concentração inibitória fracionada - FICI, de acordo com a fórmula: $FICI = A/MICA + B/MICB$, onde

“A” corresponde à MIC da combinação de GUT E associada ao antimicrobiano ou OBL A. MIC_A corresponde à MIC de GUT E, “B” corresponde à MIC do antimicrobiano ou OBL A associado a GUT E, e MIC_B corresponde à MIC de antimicrobiano ou OBL A.

O sinergismo foi considerado quando $FICI \leq 0,5$. O efeito aditivo foi considerado quando $FICI = 0,51$ a $1,5$. A indiferença foi considerada quando $FICI = 1,51$ a $3,9$. $FICI \geq 4$ foi considerado antagonismo (Nikolic et al., 2022).

Formulações baseadas em MIC

Após a obtenção da MIC e MBC das variáveis, foram preparadas formulações com as combinações que apresentaram efeitos sinérgicos ou aditivos com suas respectivas MIC_{90} , como candidatas a formulas de pomada tópica. Essas combinações foram denominadas BRP150, BRP28, BRP153, BRP29 e BRPLUS, testadas pelo ensaio de microdiluição em caldo, e sua composição está apresentada na Tabela 1. As formulações são denominadas com o prefixo BRP - *Brazilian Red Propolis* - e o peso final em $\mu\text{g/mL}$. As formulações que exerceram resultados positivos foram diluídas em RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) para ensaios posteriores com células THP-1.

Table 1. Formulações para futuros estudos de medicamento tópico.

Formulation	SRPE ($\mu\text{g/mL}$)	VA ($\mu\text{g/mL}$)	GUT ($\mu\text{g/mL}$)	IPM ($\mu\text{g/mL}$)
BRP150	125	4,6	25	-
BRP28	-	-	25	6,25
BRP153	125	-	25	6,25
BRP29	-	4,6	25	-
BRPlus	125	-	50	-

Avaliação anti-biofilme

A ação das formulações na formação de biofilme de MRSA foi realizada de acordo com Mohammed et al. (2018). As cepas de MRSA USA300, ATCC 33591 (produtoras de biofilme) e MSSA 29213 (controle) foram inoculadas em Tryptic Soy Agar 1% glicose (TSA 1%) por 20 h/37 °C.

As cepas foram ajustadas espectrofotometricamente para a escala de 0,5 McFarland (absorvência 0,8 - 1,2 a 625 nm) em Tryptic Soy Broth 1% glicose (TSB 1%) calibrado com o mesmo meio de cultura.

Placas de 96 poços de fundo chato foram inoculadas com as cepas (0,5 McFarland - 100 µL) e com concentrações de 75%, 50% e 25% das MICs apresentadas por cada formulação, em triplicatas.

Após incubação por 48 h/37 °C, as células foram lavadas com PBS 3 vezes (150 µL) e deixadas para secar por 4 h para a fixação de 20 minutos em metanol e secagem à temperatura ambiente *overnight*. As placas foram lavadas em água corrente para retirar o excesso de células mortas e os biofilmes fixados foram suspensos em ácido acético (33%). As placas foram analisadas utilizando leitor de placas de incubação EPOCH em leituras 3x3 por poço, o que permite gerar uma leitura média em pontos distintos de cada poço, aumentando a precisão dos resultados. A porcentagem de inibição do biofilme em cada poço foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = [1 - (\text{teste}/\text{controle})] \times 100.$$

Células THP-1, diferenciação em macrófagos e modelo imunossupressor

A linhagem celular THP-1 imortalizada foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brasil). As células foram recuperadas de tubos criogênicos armazenados a -80 °C e cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB a 37 °C/ 5% de CO₂ até atingir 90% de confluência.

Para diferenciar monócitos THP-1 em macrófagos, 10⁵ células por poço foram incubadas com PMA (20 ng/poço) por 24 h antes do tratamento com GUT E e as formulações.

Dexametasona (DEX - 10 µM) foi usada para suprimir a atividade dos macrófagos 3 h antes de adicionar os tratamentos.

Ensaio MTT para avaliar a viabilidade celular

O ensaio MTT foi adotado para verificar se as formulações poderiam exercer um efeito citotóxico sobre os macrófagos. As células foram incubadas com os estímulos por 18 h/37 °C. Lipopolissacarídeo (LPS – 100 ng/ml) foi usado como controle positivo, e o solvente DMSO foi testado nas concentrações usadas nos tratamentos.

Após a incubação, uma solução padrão de MTT (300 µL) em RPMI 1640 (10% SFB) foi adicionada aos poços para incubação (37 °C, 5% CO₂). Após 3 h, o MTT foi removido dos poços e 200 µL de DMSO foram adicionados para solubilizar os cristais de formazan. As placas foram lidas em um leitor de placas (540 nm) e as porcentagens de viabilidade celular foram calculadas considerando o grupo controle como células 100% viáveis.

Quantificação de citocinas

Após incubar os macrófagos com os estímulos por 18 h/37 °C, os sobrenadantes foram coletados para avaliar a produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10 por análise de ensaio imunoenzimático (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, EUA).

Co-cultura de macrófagos suprimidos por DEX com a cepa MRSA USA300 para avaliar a atividade bacteriana dos macrófagos

As células THP-1 foram tratadas com PMA conforme descrito acima. Após 24 h, a solução de PMA foi removida dos poços e DEX 10 μ M (250 μ L) foi adicionado às culturas de células por 3 h. Em seguida, 250 μ L dos tratamentos diluídos em RPMI 1640 foram adicionados por 18 h. Os sobrenadantes foram removidos e os macrófagos foram desafiados pela cepa MRSA USA300 (razão bactérias:macrófago = 50:1) por 90 min.

Depois, os sobrenadantes foram descartados e os poços foram lavados com água destilada estéril fria para romper a membrana do macrófago, liberando as bactérias fagocitadas ou não. Um volume de 500 μ L foi obtido após cada lavagem de poço e 100 μ L desse volume foram pipetados e semeados em ágar BHI. As placas de Petri foram incubadas a 37 °C/48 h para contar as UFC e determinar a porcentagem de atividade bactericida dos macrófagos de acordo com a fórmula:

$[1 - (\text{UFC média das placas experimentais} / \text{UFC média das placas de controle})] \times 100$.

Análise de afinidade de ligação e encaixe molecular de PBP2a a potenciais inibidores

A estrutura cristalina de PBP2a foi obtida do Protein Data Bank (PDB), entrada 3ZFZ. Todos os átomos não essenciais, como moléculas de água e heteroátomos, foram removidos usando ChimeraX (Pettersen et al., 2021). Átomos de hidrogênio foram adicionados à estrutura para manter estados de protonação adequados em pH 7,4 usando o serviço da web APBS (Jurrus et al., 2018). Os ligantes GUT E e IPM foram recuperados do banco de dados PubChem usando os CIDs 5352088 e 104838, respectivamente. O Chemaxon MarvinSketch 23.17 (<https://chemaxon.com>) foi empregado para otimizar a geometria e adicionar os átomos de hidrogênio para reproduzir os estados de protonação corretos desses ligantes em condições fisiológicas. Posteriormente, PBP2a e as estruturas dos ligantes foram convertidas em PDBQT usando PyRx (Dallakyan e Olson, 2015) para garantir a compatibilidade com AutoDock Vina. O sítio de ligação foi identificado com base na posição da ceftarolina cocrystalizada (Otero et al., 2013). A caixa de grade foi centralizada nos resíduos dos sítios ativo e alostérico com dimensões suficientes para cobrir cada bolso de ligação em sua totalidade. Os parâmetros da grade foram definidos da seguinte forma: - Sítio ativo: center_x = 28,345, center_y = 31,945, center_z = 87,298, size_x = 13,631, size_y = 23,336, size_z = 14,252; - Sítio alostérico: center_x = 14,586, center_y = 28,326, center_z = 24,013, size_x = 25,615, size_y = 27,204, size_z = 18,575. As simulações de encaixe foram conduzidas usando o AutoDock Vina versão 1.2.5 (Eberhardt et al., 2021). O parâmetro de exaustividade foi definido como 800 e num_modes como 900 para garantir uma exploração completa do espaço de ligação. As poses encaixadas foram analisadas usando o Discovery Studio v21.1 (Dassault Systèmes BIOVIA®) para visualizar interações importantes, como ligações de hidrogênio, contatos hidrofóbicos e empilhamento pi entre ligantes e resíduos de proteína. As afinidades de ligação foram previstas usando o servidor web PRODIGY (Xue et al., 2016) fornecendo a energia de interação eletrostática calculada para cada complexo pelo módulo de

refinamento HADDOCK (Honorato et al., 2024), e as poses foram comparadas com o ligante de referência cocrystalizado e selecionadas com base em seus valores estimados de ΔG .

Análise estatística

Testes de normalidade e lognormalidade foram realizados para assumir a normalidade dos dados obtidos. Quando os dados foram considerados normais, o teste de variância ANOVA foi usado seguido pelo teste de Dunnett; caso contrário, o teste de Kruskal Wallis foi usado seguido pelo teste de Dunn. Os dados foram analisados usando o software Graph Prism 5 e Graph Prism 10.

Resultados

Fração rica em benzofenonas contém principalmente gutiferona E e oblongifolina B

Figura 1 mostra que A BRF contém principalmente GUT E e oblongifolina B. Em nosso estudo com componentes isolados, utilizamos a isoforma A da oblongifolina devido à novidade da pesquisa com essa molécula como agente antimicrobiano.

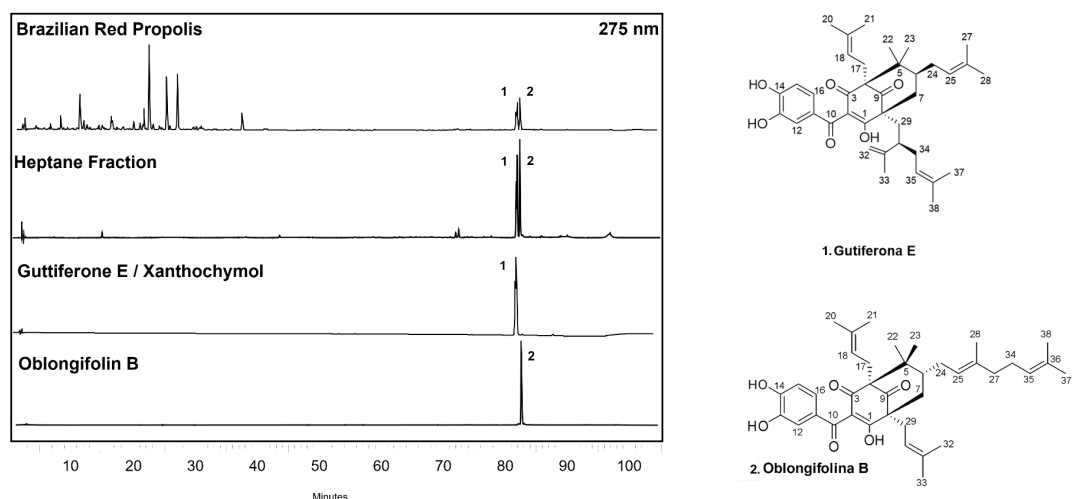


Figura 1. Perfis cromatográficos de HPLC do extrato de própolis vermelha brasileira, fração heptano e gutiferona E/xantoquimol isolados (1) e oblongifolina B (2) com suas estruturas químicas.

Isolados MRSA foram suscetíveis a SRPE, GUT E, OBL A, mas não a BRF.

A Tabela 2 mostra as médias do MIC obtido em três experimentos independentes. Os isolados de MRSA foram suscetíveis a CPT, IPM, ETP e VA, mas não a BRF e SRPE. Curiosamente, as benzofenonas predominantes em BRF (GUT E e OBL A) apresentaram MICs mais baixos do que CPT que atua em PBP2a.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM - µg/mL) de cefoxitina (FOX), ceftarolina (CPT), imipenem (IPM), ertapenem (ETP), fração rica em benzofenonas (BRF), extrato de própolis vermelho padronizado (SRPE), oblogifolina A (OBL A), gutiferona E (GUT E) e vancomicina (VA).

Isolate	FOX	CPT	IPM	ETP	BRF	SRPE	OBL A	GUT E	VA
MRSA 01	250	25 - 12,5	25 - 3,12	>50	>1040	125	62,5	25	4,06
	7,81 -		0,39 -						4,06 -
MRSA 02	250	12,5	3,12	12,5	>1040	125	62,5	12,5	1,95
MRSA 03	250	12.5 - 25	3,12	>50	>1040	125	62,5	12,5	4,06
	125 -		1,56 -	12,5 -					16,25 -
MRSA 04	500	12.5 - 25	6,25	>50	>1040	125	62,5	25	15,62
	125 -	12.5 -	1,56 -	12,5 -					2,03 -
USA300	250	> 25	0,39	6,25	>1040	125	62,5	12,5	3,90
	125 -		1,56 -	12,5 -				12.5 -	2,03 -
ATCC 33591	>500	25 - >25	>50	>50	>1040	125	62,5	25	3,90
MIC₅₀	250	12.5	3,12	6.25	-	-	-	12,5	3,906
MIC₉₀	500	25	6,25	12,5	-	125	62,5	25	4,06

Da mesma forma, os MBCs obtidos para carbapenêmicos, CPT e VA foram satisfatórios (Tabela 3). GUT E apresentou MIC menor que OBL A. Os dados mostrados nas tabelas 2 e 3 indicaram que os valores de MIC e MBC de GUT E e OBL A têm ação inibitória e bactericida, com concentrações muito próximas.

Tabela 3. Concentração bactericida mínima (MBC - µg/mL) de cefoxitina (FOX), ceftarolina (CPT), imipenem (IPM), ertapenem (ETP), fração rica em benzofenonas (BRF), extrato padronizado de própolis vermelha (SRPE), oblogifolina A (OBL A), gutiferona E (GUT E) e vancomicina (VA).

Isolate	FOX	CPT	IPM	ETP	BRF	SRPE	OBL A	GUT E	VA
MRSA01	31,25	0,78	0,78	1,56	10000	562,5	31,25	25	0,97
MRSA 02	31,25	3,12	0,78	12,5	10000	562,5	15,62	25	1,95
MRSA 03	15,62	3,12	3,12	25	5000	562,5	31,25	25	1,95
MRSA 04	>500	>25	>500	>500	5000	562,5	31,25	25	0,97
USA300	125	25	0,78	6,25	>10000	562,5	62,5	25	0,97
ATCC 33591	>500	>25	50	>50	2500	562,5	62,5	25	7,81
ATCC 29213	62,5	6,25	0,78	25	>10000	562,5	62,5	25	1,95

MRSA não apresentou sinergia com antimicrobianos cefalosporínicos, enquanto carbapenêmicos e vancomicina apresentaram efeitos sinérgicos e aditivos

A Tabela 4 mostra que GUT E + ETP, bem como GUT E + VA exerceram um efeito sinérgico contra a cepa USA300, enquanto GUT E + IPM exerceram um sinergismo sobre 33591 e 29213, e um efeito aditivo sobre a cepa USA300. GUT E + VA exibiram um efeito aditivo sobre as cepas 33591 e 29213. GUT E e OBL A mostraram efeitos antagônicos sobre ambas as cepas.

Tabela 4. Método do tabuleiro de xadrez para MRSA ATCC 33591, MSSA ATCC 29213 e MRSA USA300. Os resultados foram obtidos em três experimentos independentes combinando gutiferona E (GUT E) com ertapenem (ETP), ou imipenem (IPM), ou ceftarolina (CPT), ou cefoxitina (FOX), ou oblongifolina A (OBL A).

Strain	33591		29213		USA300	
	FICI	Interpretation	FICI	Interpretation	FICI	Interpretation
GUT E + ETP	2	I	2	I	0.5	S
GUT E + IPM	0.5	S	0.5	S	1.25	AE
GUT E + CPT	2	I	2	I	2	I
GUT E + FOX	2	I	2	I	4	A
GUT E + VA	1	AE	1.2	AE	0.5	S

GUT E + OBL A	4	A	5	A	5.7	A
--------------------------	---	---	---	---	-----	---

S – synergism, I - indifference, AE - additive effect, A - antagonism.

As formulações mostraram um alto potencial inibitório contra cepas de MRSA

Algumas formulações foram testadas pela microdiluição em caldo e GUT E foi incluído em todas elas porque não apresentou variações nos valores de MBC, mostrando uma ação bactericida maior do que SRPE, BRF e OBL A.

Embora SRPE não tenha apresentado um MIC90 melhor do que GUT E, decidimos incluí-lo em algumas fórmulas candidatas devido à alta variabilidade de componentes encontrados no extrato de própolis vermelha. BRPLUS continha o dobro da concentração de gutiferona porque exerceu uma alta ação bactericida.

A Tabela 5 mostra o MIC50 e MIC90 das formulações nos isolados de MRSA. Como GUT E e os antimicrobianos presentes nas formulações mostraram um efeito bactericida, realizamos testes de microdiluição sem subcultura para determinar apenas os MICs. Todas as formulações apresentaram valores de MIC90 satisfatórios.

Tabela 5. Concentrações inibitórias mínimas (CIM50 e CIM90 - µg/mL) das formulações que podem ser utilizadas para produzir pomadas tópicas.

Formula tion	MRSA 01	MRSA 02	MRSA 03	MRSA 04	USA300	33591	29213	MIC₅₀	MIC₉₀
BRP150	64,8	32,4 -64,8	64,8	129,6	64,8	64,8	32,4 - 64,8	32,4	64,8
BRP28	31,25 - >31,25	31,25	31,25 - >31,25	31,25 - >31,25	31,25 - >31,25	31,25 - >31,25	31,25 - >31,25	15,62	28,12
BRP153	39,12 - 78,25	39,12 - 78,25	39,12 - 78,25	78,25 - 156,5	39,12 - 78,25	78,25	39,12 - 78,25	39,12	78,25
BRP29	29,6	14,8 - 29,6	29,6	14,8 - 29,6	14,8	14,8	14,8	14,8	26,64

BRPLUS	87,5	43,75 - 87,5	87,5	175	43,75 - 87,5	43,75 - 87,5	43,75 - 87,5	43,75	87,5
---------------	------	-----------------	------	-----	-----------------	-----------------	-----------------	-------	------

BRP28, BRP29 e GUT E mostraram potencial antibiofilme sobre cepas de MRSA em concentrações mais baixas

As cepas USA 300 e ATCC 29213 foram afetada pelas formulações e também por GUT E. Nenhum dos tratamentos apresentou atividade antibiofilme estatisticamente no ATCC 33591. Vale ressaltar que todas as concentrações foram baseadas no ensaio de microdiluição em caldo onde inóculo em cada poço foi de aproximadamente 10^5 UFC/mL. Entretanto, o inóculo para formação de biofilme foi obtido diretamente da escala de 0,5 Mcfarland, correspondendo a 10^8 UFC/mL.

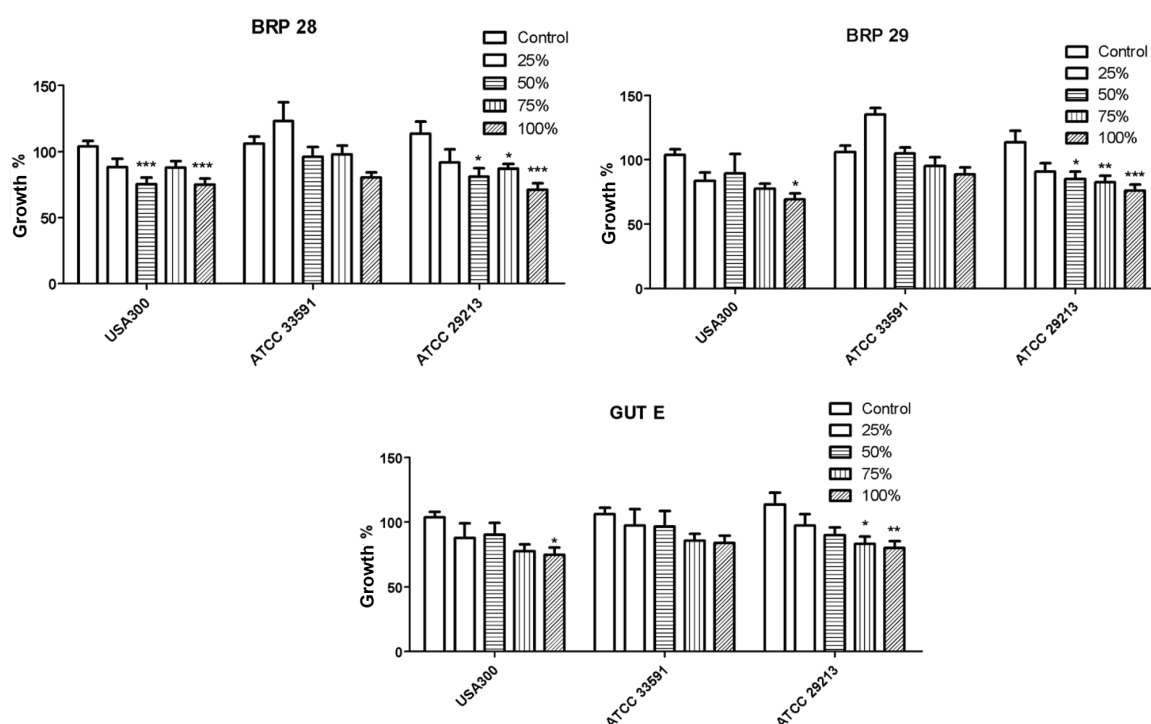


Figura 2. Capacidade antibiofilme de BRP28, BRP29 e gutiferona E (GUT E) em cepas de MRSA e MSSA. Valores representativos obtidos em três experimentos distintos. * $\leq 0,5$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$ estatisticamente diferente do controle.

Viabilidade dos macrófagos após incubação com as formulações

A Figura 3 mostra que BRP153, BRP150 e BRPLUS exerceram uma alta ação citotóxica sobre macrófagos provavelmente devido à alta concentração de GUT E. BRP28, BRP29 e GUT E não tiveram efeito sobre a viabilidade celular. Assim, apenas GUT E, BRP28 e BRP29 foram escolhidos para os próximos experimentos.

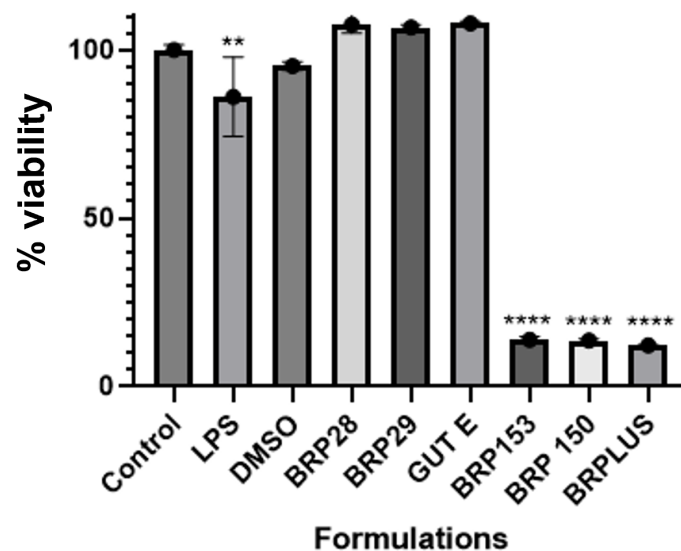


Figura 3. Porcentagem (%) de viabilidade de macrófagos após incubação com LPS (0,1 µg/ml), DMSO, gutiferona E (GUT E), as formulações (BRP28, BRP29, BRP153, BRP150 e BRPLUS). Os dados representam a média ± desvio padrão de 3 experimentos em triplicata. ** $p \leq 0,05$; **** $p \leq 0,0001$ estatisticamente diferente do controle.

GUT E, BRP28 e BRP29 não modularam a produção de citocinas

Nenhuma diferença foi observada na produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10 após a incubação de macrófagos com as formulações ou GUT E em comparação ao grupo controle (dados não mostrados).

GUT E, BRP28 e BRP29 aumentaram a atividade bactericida de macrófagos suprimidos contra a cepa MRSA USA300

Após a supressão de macrófagos com DEX, as células foram tratadas com BRP29, BRP28 e GUT E em suas concentrações anti-MRSA ideais. O perfil de imunossupressão foi revertido pelo tratamento com LPS. BRP29, BRP28 e GUT E mostraram um efeito restaurador imunológico em macrófagos suprimidos por DEX. GUT E foi o tratamento mais eficiente em relação à morte de MRSA por macrófagos. Não foram encontradas alterações significativas entre o tratamento e o grupo controle em macrófagos não suprimidos por (DEX), onde a média de controle foi de 30%, como no controle LPS + DEX (Figura 4).

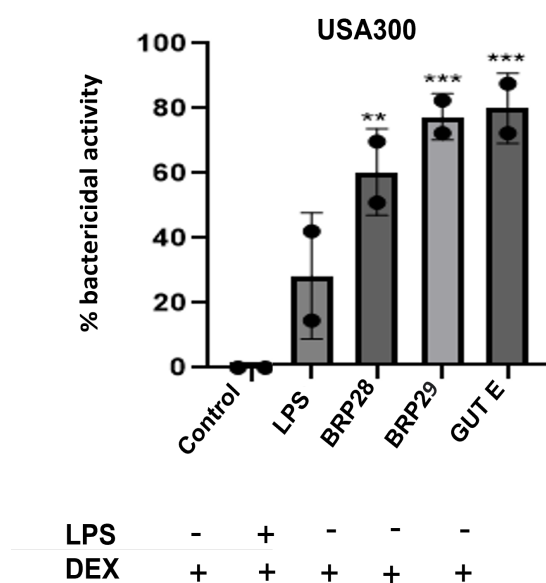


Figura 4. Porcentagem (%) da atividade bactericida de macrófagos suprimidos por dexametasona (DEX) após incubação com BRP29, BRP28 ou gutiferona E (GUT E). Os dados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes em triplicado. LPS – Lipopolissacarídeo 0,1 μ g/ml. ** $\leq$ 0,01, *** $\leq$ 0,001 estatisticamente diferente do grupo controle.

Modelo molecular de inibição de PBP2a pelos componentes da formulação

Os estudos de docking forneceram uma análise detalhada da interação entre PBP2a e três ligantes: ceftarolina, imipenem e GUT E. Dados os resultados promissores obtidos *in vitro*, este estudo avaliou GUT E e IPM como potenciais inibidores de PBP2a, um participante-chave na resistência a MRSA. A análise focou nas interações de ligação específicas nos sítios ativo e alostérico e nas energias livres de ligação (ΔG) para elucidar o potencial desses compostos (Figura 5).

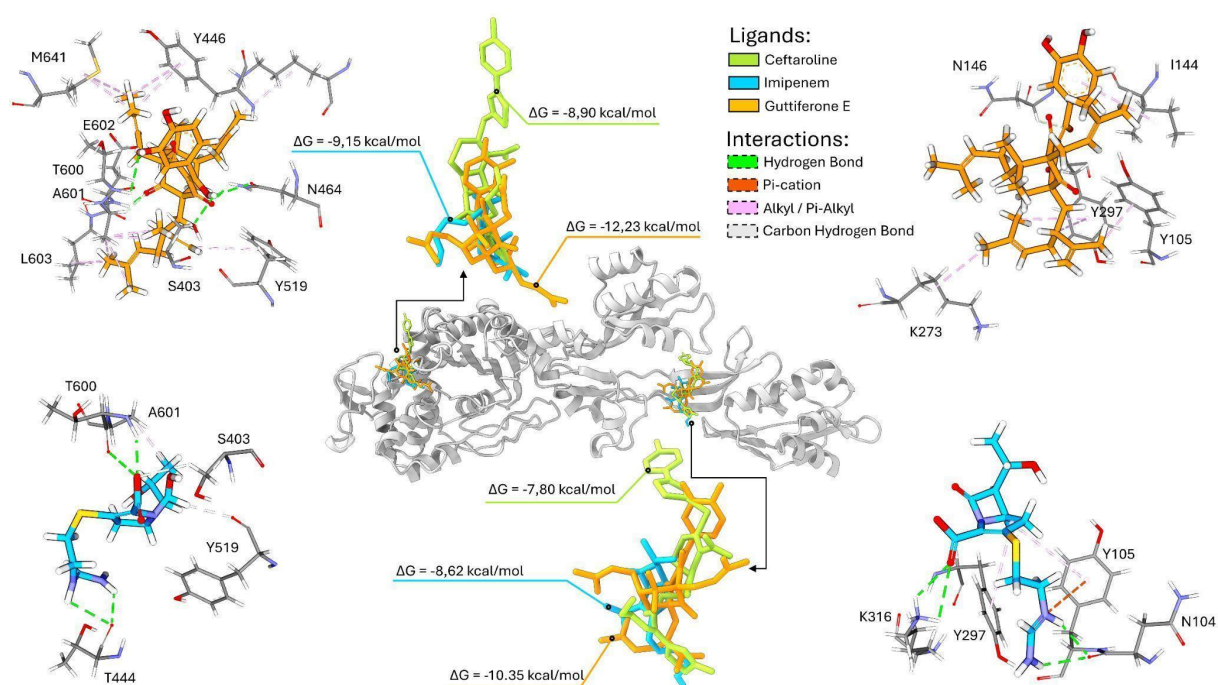


Figura 5. Mapas de interação de encaixe e energias livres de ligação de ceftarolina, imipenem (IPM) e guttiferona E (GUT E) nos sítios ativo e alostérico de PBP2a. IMP e GUT E são ampliados em superposição contra CPT redocked, destacando possíveis modos de ligação semelhantes para esses ligantes no sítio ativo (superposição ampliada superior) e sítio alostérico (superposição ampliada inferior). Superior esquerdo: GUT E no sítio ativo. Inferior esquerdo: IMP no sítio ativo. Superior direito: GUT E no sítio alostérico. Inferior direito: IMP no sítio alostérico. Centro: PBP2a com todos os ligantes superpostos em ambos os sítios ativo e alostérico.

Inicialmente, o CPT, um antibiótico cefalosporina conhecido por sua eficácia contra MRSA, foi redocados (veja material suplementar) de sua forma ligada co-cristalizada (PDB ID 3ZFZ) e usado como referência. Entre as conformações geradas, a mais semelhante à forma ligada covalentemente co-cristalizada exibiu um ΔG de -8,90 kcal/mol. Essa afinidade de ligação relativamente forte foi atribuída a múltiplas interações estabilizadoras dentro do sítio ativo de PBP2a. No sítio alostérico, a conformação doca do CPT que mais se assemelha à estrutura cristalográfica mostrou uma energia livre de ligação de -7,80 kcal/mol. Notavelmente, o CPT redocado manteve interações críticas observadas na estrutura cristalográfica, incluindo ligações de hidrogênio com resíduos T600 e S403 no sítio ativo e interações Pi-alquil com L144 no sítio alostérico (veja material suplementar).

IPM demonstrou um ΔG de -9,15 kcal/mol no sítio ativo. As previsões de encaixe revelaram padrões de interação semelhantes aos observados com CPT, com ligações de hidrogênio significativas envolvendo T600, T444, A601 e S403. No sítio alostérico, IPM exibiu uma energia livre de ligação de -8,62 kcal/mol, coordenando ligações de hidrogênio, interações Pi-cátion e Pi-alquil com resíduos como Y105, K316, Y297 e N104.

GUT E mostrou a afinidade de ligação mais promissora no sítio ativo, atingindo um $\Delta G = -12,23$ kcal/mol. Essa força de ligação excepcional é devido a uma rede de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas com resíduos-chave como M641, E602, T600, A601, S403 e Y519. O perfil de interação de GUT E sugere um mecanismo de ligação que alavanca interações polares e não polares para estabilizar o ligante dentro do sítio de ligação. GUT E também se liga ao sítio alostérico com o ΔG mais favorável neste sítio (-10,35 kcal/mol), estabelecendo

ligações de hidrogênio e contatos hidrofóbicos com resíduos N146, I144, K273, Y297 e Y105, que são essenciais para induzir mudanças conformacionais que se propagam para o sítio ativo, facilitando sua abertura.

Discussão

A busca por novos antimicrobianos que atuem contra MRSA tem sido intensa, pois os fatores de resistência aumentam notavelmente em espaços curtos de tempo. Devido à sua baixa toxicidade, os antimicrobianos β -lactâmicos foram escolhidos para tratar esse patógeno, principalmente as cefalosporinas. A vancomicina também é um antimicrobiano amplamente utilizado, mas geralmente não é a primeira escolha devido à sua toxicidade. Na busca por novos antimicrobianos contra MRSA, nosso grupo tem estudado extratos de própolis, demonstrando uma ação antibacteriana eficiente (Ripari et al., 2023).

O mecanismo de resistência ao MRSA é mediado pela ativação do gene *mecA* após a exposição ao β -lactâmico, com a expressão de uma transpeptidase monofuncional conhecida como PBP2a (Foster, 2019). A PBP2a retém a atividade essencial da transpeptidase vista nas PBPs intrínsecas (PBP1 a PBP4) de *S. aureus*. No entanto, é caracterizado por uma afinidade marcadamente menor para vários antibióticos β -lactâmicos, uma característica atribuída principalmente à conformação fechada de seu sítio ativo, o que permite que PBP2a continue sintetizando a parede celular bacteriana mesmo sob concentrações de β -lactâmicos que normalmente inibem outros PBPs (Shalaby et al., 2020). Como resultado, MRSA pode sustentar a síntese da parede celular e evitar os efeitos bactericidas desses antibióticos, prevenindo assim a lise e a morte celular.

O mecanismo predominante subjacente à resistência de MRSA a antibióticos β -lactâmicos é amplamente atribuído ao desvio do alvo. Pesquisas extensas

elucidaram que PBPs, proteínas integrais de membrana localizadas na superfície bacteriana, servem como sistemas de protease cruciais na biossíntese de paredes celulares bacterianas (Ambade et al., 2023). Consequentemente, PBPs foram identificadas como alvos primários para antibióticos β -lactâmicos, que inibem a síntese da parede bacteriana ao se ligarem aos sítios ativos de PBPs. Essa interação compromete a integridade estrutural da parede bacteriana, tornando-a incapaz de suportar a alta pressão osmótica do citoplasma (Mlynarczyk-Bonikowska et al., 2022).

Inicialmente, a ação antibacteriana do BRF foi avaliada, mas, curiosamente, não foi eficiente contra os isolados clínicos e cepas de MRSA. Em seguida, os principais compostos ativos do BRF foram isolados da própolis vermelha: GUT E e OBL A. No ensaio checkerboard, GUT E + OBL A apresentaram efeito antagônico, o que pode explicar por que o BRF não foi eficaz nos testes antimicrobianos. No entanto, essas benzofenonas sozinhas apresentaram excelentes MICs com baixa variação, especialmente GUT E, que se tornou o alvo deste estudo.

GUT E em combinação com IPM ou ETP apresentou efeitos aditivos ou sinérgicos (especialmente IPM). Um efeito sinérgico também foi observado com vancomicina. Assim, algumas formulações foram preparadas com o extrato padronizado de própolis vermelha (SRPE) e/ou GUT E com antimicrobianos, uma vez que o SRPE também mostrou atividade promissora contra os isolados. Surpreendentemente, as formulações contendo GUT E e SRPE juntos foram citotóxicas para macrófagos, como claramente visto na formulação BRPLUS. Assim, continuamos os experimentos apenas com BRP28, BRP29 e GUT E sozinhos.

GUT E mostrou a maior capacidade antibiofilme e exerceu um efeito restaurador imunológico em macrófagos suprimidos por DEX em relação à sua

capacidade de matar a cepa USA300, que é encontrada em feridas em todo o mundo e pode ser invasiva em tratamento inadequado de feridas, especialmente em indivíduos imunossuprimidos. Com relação à produção de citocinas por macrófagos suprimidos por DEX, não foram observadas diferenças entre os grupos, apesar da eficiente capacidade bactericida dessas células. Os mecanismos de ação pelos quais o GUT E e as formulações estimularam a morte bacteriana por macrófagos ainda precisam ser investigados. Investigações posteriores devem analisar a produção de espécies reativas de oxigênio ou o envolvimento de enzimas lisossomais.

A análise cristalográfica revelou que o mecanismo de reticulação do peptidoglicano PBP2a depende da ligação de um peptidoglicano nascente no domínio de ligação não penicilina a 60 Å de distância do sítio ativo. Este evento alostérico leva a várias mudanças estruturais por meio de uma série de interações de ponte salina, que se propagam sequencialmente para o sítio catalítico, culminando na exposição do resíduo catalítico Ser 403, facilitando assim a atividade catalítica (Mahasenan et al., 2017). Notavelmente, CPT, um antibiótico β -lactâmico anti-MRSA, liga-se covalentemente ao sítio ativo e não covalentemente ao sítio alostérico, imitando o efeito regulador do fragmento de peptidoglicano (Otero et al., 2013). Assim, CPT pode desencadear a abertura do sítio ativo, permitindo que uma segunda molécula CPT acil o S403 catalítico e iniba a síntese da parede (Jiao et al., 2023).

Assim, considerar o sítio alostérico PBP2a com novos antibióticos ou pequenas moléculas apresenta uma estratégia viável para superar a resistência ao MRSA. Essa abordagem poderia efetivamente interromper o mecanismo de proteção conferido pelo PBP2a, potencialmente restaurando a suscetibilidade do

MRSA aos antibióticos β -lactâmicos. Portanto, a atividade promissora mostrada pelo GUT E *in vitro* motivou uma investigação sobre a possibilidade desta benzofenona em atuar neste alvo molecular central da resistência ao MRSA.

Curiosamente, as soluções de encaixe geradas aqui sugeriram que GUT E tem um perfil de interação versátil em relação a PBP2a, exibindo uma energia livre de ligação altamente favorável tanto aos sítios ativo quanto alostérico. De fato, a afinidade de ligação robusta de GUT E superou o ΔG estimado do ligante de referência CPT. Esta afinidade superior foi observada para o ΔG estimado para sua forma ligada co cristalizada e soluções de *redocking* no sítio alostérico (dados não mostrados). Além disso, GUT E coordenou uma interface de interação em uma conformação exibindo a ocupação adequada no sítio alostérico necessária para a reorganização da proteína, cognata ao ligante de referência. Essas previsões computacionais se alinharam bem com as descobertas *in vitro*, que mostraram uma atividade inibitória significativa das formulações de GUT E contra isolados de MRSA, particularmente, o efeito sinérgico de GUT E combinado com IPM, apoiando o mecanismo de inibição de sítio duplo proposto em PBP2a. Esse mecanismo pode explicar adequadamente as concentrações inibitórias mínimas promissoras e a atividade antibiofilme aprimorada exibida pelas formulações contendo GUT E em todas as cepas de MRSA.

Inibidores não β -lactâmicos, como derivados de quinazolinona, mostraram a importância de atingir sítios ativos e alostéricos para inibição eficaz de PBP2a. Derivados de quinazolinona, identificados por meio de estudos de encaixe e relação estrutura-atividade, são inibidores potentes de PBP2a que se ligam aos sítios ativos e alostéricos, exibindo atividade antibiótica intrínseca (Bouley et al., 2016, 2015). Esses compostos, como GUT E, exploram uma combinação de ligações de

hidrogênio e interações hidrofóbicas para induzir as mudanças conformacionais necessárias para a abertura do sítio ativo. Os principais resíduos envolvidos nessas interações incluem Y297, K273, N146 e Y105, que também são coordenados por GUT E (Bouley et al., 2015).

Compostos não β -lactâmicos, como GUT E e quinazolininas que se ligam de forma não covalente ao sítio ativo, oferecem uma estratégia promissora para inibição sem necessidade de acilação. Esses inibidores não covalentes podem contornar as mudanças conformacionais desfavoráveis em PBP2a normalmente necessárias para acilação. Além disso, seu mecanismo de ligação os torna inerentemente resistentes à degradação por β -lactamases, aumentando seu potencial como inibidores eficazes.

O IPM exibiu uma maior afinidade de ligação prevista para sítios ativos e alostéricos em comparação com CPT, com estudos de encaixe sugerindo o envolvimento do IPM com resíduos críticos no sítio alostérico. No entanto, o menor tamanho molecular do IPM pode restringir sua capacidade de atingir a complementaridade de superfície ideal necessária para uma regulação alostérica eficaz do PBP2a. Essa limitação foi destacada pela ocupação reduzida do IPM no sítio alostérico quando sobreposto contra CPT e GUT E, conforme ilustrado na Figura 5, onde o IPM ocupou apenas parcialmente o sítio alostérico. Além disso, pesquisas anteriores ressaltam que a eficácia antimicrobiana do IPM contra cepas de MRSA é significativamente aumentada quando combinada com outros agentes antimicrobianos (Uete e Matsuo, 1995; Totsuka et al., 1999; Ripari et al., 2023). Apesar dessas restrições, a geometria favorável da ligação de hidrogênio estabelecida pelo IPM no sítio ativo promove o ataque nucleofílico à Ser 403 catalítico no anel β -lactâmico premeditando o complexo acil-PBP2a covalente. Esse

modelo é ainda mais apoiado pelo efeito sinérgico observado *in vitro* do IPM e GUT E, sugerindo que o GUT E provavelmente fornece a ativação alostérica permitindo que o IMP acesse o Ser 403 e inicie a formação do complexo acil-PBP2a. No geral, nossas descobertas indicaram que GUT E sozinho ou em combinação com carbapenêmicos ou vancomicina podem ser agentes promissores no combate a feridas infectadas por MRSA que afetam vários problemas em indivíduos acamados que sofrem de úlceras de pressão. É importante ressaltar que GUT E aumentou a atividade bactericida de macrófagos suprimidos por DEX. As formulações BRP28 e BRP29 podem ser avaliadas ainda mais quanto ao seu potencial de cura para combater feridas de difícil cicatrização que podem levar a infecções invasivas por MRSA e outras bactérias.

Conclusão

Guttiferona E isolada da própolis vermelha brasileira exibiu uma atividade anti-MRSA direta e indiretamente aumentou a atividade bactericida do macrófago. O *molecular docking* sugeriu que GUT E tem uma interação versátil com PBP2a, exibindo uma energia livre estimada altamente favorável de ligação tanto aos sítios ativo quanto alostérico.

Perspectivas futuras

Planeja-se, para o ano final de pós-doutorado, que o participante obtenha dados *in vitro* de migração celular, genotoxicidade e viabilidade de GUT E ou combinações em culturas de queratinócitos e fibroblastos humanos imortalizados. Se os resultados permanecerem promissores, serão confeccionados hidrogéis com as melhores fórmulas. Estes hidrogéis provavelmente serão testados quanto sua

permeação cutânea em modelo *in vitro* de *stratum corneum* sintético e modelo *ex vivo* utilizando orelha de porco, na Universidade do Porto, Porto, Portugal. Os resultados provenientes de todo o projeto poderão resultar em um hidrogel que poderá ser testado em estudos pré-clínicos. Depósito de patente será considerado se os testes pré-clínicos forem promissores para que seja iniciado estudo clínico de fase I.

Referências Bibliográficas

- Aitcheson, S. M., Frentiu, F. D., Hurn, S. E., Edwards, K., Murray, R. Z. (2021). Skin wound healing: normal macrophage function and macrophage dysfunction in diabetic wounds. *Molecules*, 26(16), 4917. doi: 10.3390/molecules26164917.
- Aldana-Mejia, J. A., Ccana-Ccapatinta, G. V., Ribeiro, V. P., Arruda, C., Veneziani, R. C., Ambrósio, S. R., & Bastos, J. K. (2021). A validated HPLC-UV method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian red propolis and *Dalbergia ecastaphyllum*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 198, 114029.
- Ambade, S.S., Gupta, V.K., Bhole, R.P., Khedekar, P.B., Chikhale, R.V. A review on five and six-membered heterocyclic compounds targeting the penicillin-binding protein 2 (PBP2a) of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Molecules*, 28:7008. 2023. doi: 10.3390/molecules28207008.
- Bertonha, A. F., Silva, C. C.L., Shirakawa, K. T., Trindade, D. M., Dessen, A. (2023). Penicillin-binding protein (PBP) inhibitor development: A 10-year chemical perspective. *Experimental Biology and Medicine*, 248(19), 1657-1670. doi: 10.1177/15353702231208407.
- Bouley, R. Kumarasiri, M., Peng, Z., Otero, L.H., Song, W., Suckow, M.A., Schroeder, V.A., Wolter, W.R., Lastochkin, E., Antunes, N.T., Pi, H., Vakulenko, S., Hermoso, J.A., Chang, M., Mobashery, S. Discovery of antibiotic (E)-3-(3-carboxyphenyl)-2-(4-cyanostyryl)quinazolin-4(3 H)-one. *Journal of the American Chemical Society*, 137:1738–1741. 2015. doi: 10.1021/jacs.5b00056.
- Bouley, R., Ding, D., Peng, Z., Bastian, M., Lastochkin, E., Song, W., Suckow, M.A., Schroeder, V.A., Wolter, W.R., Mobashery, S., Chang, M. Structure–activity

- relationship for the 4(3H)-quinazolinone antibacterials. *Journal of Medicinal Chemistry*, 59:5011–5021, 2016. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00372.
- Burgess, J. L., Wyant, W. A., Abdo Abujamra, B.A., Kirsner, R. S., Jozic, I. (2021). Diabetic wound-healing science. *Medicina*, 57(10), 1072. doi: 10.3390/medicina57101072.
- Burnham, J.P., Kollef, M.H. 2018. Treatment of severe skin and soft tissue infections: a review. *Current opinion in infectious diseases*, 31(2), 113-119. doi: 10.1097/QCO.0000000000000431.
- Ccana-Ccapatinta, G. V., Mejía, J. A. A., Tanimoto, M. H., Groppo, M., Carvalho, J. C. A. S. D., & Bastos, J. K. (2020). *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. and *Symphonia globulifera* Lf: The botanical sources of isoflavonoids and benzophenones in Brazilian red propolis. *Molecules*, 25(9), 2060..
- Conceição, M., Beserra, F. P., Mejia, J. A. A., Caldas, G. R., Tanimoto, M. H., Luzenti, A. M., Gaspari, P. D. M., Evans, N. D., Bastos, J. K., Pellizzon, C. H. (2023). Guttiferones: an insight into occurrence, biosynthesis, and their broad spectrum of pharmacological activities. *Chemico-Biological Interactions*, 370, 110313.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. CLSI Document. 2015:M7–A8.
- Criollo-Mendoza, M. S., Contreras-Angulo, L. A., Leyva-López, N., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Jiménez-Ortega, L. A., Heredia, J. B. (2023). Wound healing properties of natural products: Mechanisms of action. *Molecules*, 28(2), 598.
- Daigneault, M., Preston, J. A., Marriott, H. M., Whyte, M. K., & Dockrell, D. H. (2010). The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PloS One*, 5(1), e8668.
- Dallakyan, S., Olson, A. J. Small-Molecule Library Screening By Docking With Pyrx. Em: Hempel, J. E., Williams, C. H., Hong, C. C. (Eds.). *Chemical Biology. Methods In Molecular Biology*. New York, Ny: Springer New York, 2015. 1263:243–250.
- De Lencastre, H., De Jonge, B. L., Matthews, P. R., Tomasz, A. (1994). Molecular aspects of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 33(1), 7-24.
- Eberhardt, J. Et Al. Autodock Vina 1.2.0: new docking methods, expanded force field, and python bindings. *Journal of Chemical Information and Modeling*, V. 61, N. 8, P. 3891–3898, 23 Ago. 2021.

- Foster, T. J. Can β -lactam antibiotics be resurrected to combat MRSA? *Trends In Microbiology*, 27:26–38, 2019.
- Freires, I. A., de Alencar, S. M., Rosalen, P. L. (2016). A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 110, 267-279.
- Freitas, M. C., de Miranda, M. B., de Oliveira, D. T., Vieira-Filho, S. A., Caligiorne, R. B., de Figueiredo, S. M. (2017). Biological activities of red propolis: A review. *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery*, 11(1), 3-12.
- Gill, S. K., Islam, N., Shaw, I., Ribeiro, A., Bradley, B., Kilcoyne, M., Ceredig, R. Joshi, L. (2016). Immunomodulatory effects of natural polysaccharides assessed in human whole blood culture and THP-1 cells show greater sensitivity of whole blood culture. *International Immunopharmacology*, 36, 315-323.
- Greenhalgh, D. G. (2003). Wound healing and diabetes mellitus. *Clinics in Plastic Surgery*, 30(1), 37-45.
- Han, G., Ceilley, R. (2017). Chronic wound healing: a review of current management and treatments. *Advances in Therapy*, 34, 599-610.
- Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R., & Quinn, R. J. (2015). The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(2), 111-129.
- Honorato, R. V., Trellet, M. E., Jiménez-García, B., Schaarschmidt, J. J., Giulini, M., Reys, V., Koukos, P. I., Rodrigues, J. P. G. L. M., Karaca, E., van Zundert, G. C. P., Roel-Touris, J., van Noort, C. W., Jandová, Z., Milquiond, A. S. J., & Bonvin, A. M. (2024). The HADDOCK2. 4 web server for integrative modeling of biomolecular complexes. *Nature Protocols*, 1-23.
- Jiao, F., Bao, Y., Li, M., Zhang, Y., Zhang, F., Wang, P., Tao, J., Tong, H. H. Y., & Guo, J. (2023). Unraveling the mechanism of ceftaroline-induced allosteric regulation in penicillin-binding protein 2a: insights for novel antibiotic development against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 67(12), e00895-23.
- Jurrus, E., Engel, D., Star, K., Monson, K., Brandi, J., Felberg, L. E., Brookers, D. H., Wilson L., Chen, J., Liles, K., Chun, M., Li, P., Gohara, D. W., Dolinsky, T., Konecny, R., Koes, D. R., Nielsen, J. E., Head-Gordon, T., Geng, W., Krasny, R., Wei, G. W., Holst, M. J., McCammon, A., & Baker, N. A. (2018). Improvements to the APBS biomolecular solvation software suite. *Protein Science*, 27(1), 112-128.

- Kaushik, A., Kest, H., Sood, M., Steussy, B. W., Thieman, C., Gupta, S. (2024). Biofilm producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections in humans: clinical implications and management. *Pathogens*, 13(1), 76.
- Lade, H., Kim, J. S. (2023). Molecular determinants of β -lactam resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): an updated review. *Antibiotics*, 12(9), 1362.
- Lee, A. S., De Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1-23.
- Lima, L. M., da Silva, B. N. M., Barbosa, G., Barreiro, E. J. (2020). β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 208, 112829.
- Linz, M. S., Mattappallil, A., Finkel, D., Parker, D. (2023). Clinical impact of *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections. *Antibiotics*, 12(3), 557.
- Mahasenani, K. V. Et Al. Conformational dynamics in penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, allosteric communication network and enablement of catalysis. *Journal of the American Chemical Society*, 139:2102–2110, 2017.
- Mlynarczyk-Bonikowska, B., Kowalewski, C., Krolak-Ulinska, A., & Marusza, W. (2022). Molecular mechanisms of drug resistance in *Staphylococcus aureus*. *International journal of molecular sciences*, 23(15), 8088.
- Mohammed, Y. H. E., Manukumar, H. M., Rakesh, K. P., Karthik, C. S., Mallu, P., Qin, H. L. (2018). Vision for medicine: *Staphylococcus aureus* biofilm war and unlocking key's for anti-biofilm drug development. *Microbial Pathogenesis*, 123, 339-347.
- Nair, R., Ammann, E., Rysavy, M., Schweizer, M. L. (2014). Mortality among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 versus non-USA300 invasive infections: a meta-analysis. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 35(1), 31-41.
- Nikolic, I., Vukovic, D., Gavric, D., Cvetanovic, J., Aleksic Sabo, V., Gostimirovic, S., Narancic, J., Knezevic, P. (2022). An optimized checkerboard method for phage-antibiotic synergy detection. *Viruses*, 14(7), 1542.

- Otero, L. H. Et Al. How allosteric control of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110:16808–16813, 2013.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. Protein science, 30(1), 70-82.
- Ripari, N., Pereira, A. F. M., Júnior, A. F., Rall, V. L. M., Aldana-Mejía, J. A., Bastos, J. K., Sforcin, J. M. (2023). Brazilian red propolis in combination with β -lactams exerts an efficient antibacterial action over methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. Journal of Applied Microbiology, 134(2), 1xac080.
- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van Duijkeren, E., Johnson, A. P., Gaastra, W. (2010). Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 65(4), 601-604.
- Sforcin, J. M. (2016). Biological properties and therapeutic applications of propolis. Phytotherapy Research, 30(6), 894-905.
- Shalaby, M.-A. W. *et al.* Penicillin binding protein 2a: An overview and a medicinal chemistry perspective. European Journal of Medicinal Chemistry, 199:112312, 2020.
- Sharma, V., Ranjan, T., Kumar, P., Pal, A. K., Jha, V. K., Sahni, S., Prasad, B. D. (2017). Protein–protein interaction detection: Methods and analysis. In Plant Biotechnology, 1:391-411. Apple Academic Press.
- Tasneem, U., Mehmood, K., Majid, M., Ullah, S. R., Andleeb, S. (2022). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: A brief review of virulence and resistance. The Journal of the Pakistan Medical Association, 72(3), 509-515.
- Totsuka, K. et al. Combined effects of vancomycin and imipenem against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in vitro and in vivo. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 44:455–460, 1999.
- Uete, T., Matsuo, K. Synergistic enhancement of in vitro antimicrobial activity of imipenem and cefazolin, cephalothin, cefotiam, cefamandole or cefoperazone in combination against methicillin-sensitive and-resistant *Staphylococcus aureus*. The Japanese Journal of Antibiotics, 1995.
- Watkins, R. R., David, M. Z., Salata, R. A. (2012). Current concepts on the virulence mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Medical Microbiology, 61(9), 1179-1193.

- Wu, S. B., Long, C., Kennelly, E. J. (2014). Structural diversity and bioactivities of natural benzophenones. *Natural Product Reports*, 31(9), 1158-1174.
- Xue, L. C., Rodrigues, J. P., Kastiris, P. L., Bonvin, A. M., & Vangone, A. (2016). PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein–protein complexes. *Bioinformatics*, 32(23), 3676-3678.
- Zhou, S., Hu, X., Wang, Y., Fei, W., Sheng, Y., Que, H. (2024). The global prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients with diabetic foot ulcers: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 563-574.
- Zhu, Z., Pan, F., Wang, O., Zhao, L., Zhao, L. (2024). Antibacterial effect of sesame protein-derived peptides against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: in silico and in vitro analysis. *Nutrients*, 16(1), 175.