



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências – Campus de Botucatu



EMILLY CAMARGO LOPES

EFEITO DA GEOPRÓPOLIS E DO ÁCIDO ANACÁRDICO
EM *Staphylococcus epidermidis* MULTIRRESISTENTES
E MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS SUPRIMIDOS

BOTUCATU-SP
2025



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências – Campus de Botucatu



EMILLY CAMARGO LOPES

**EFEITO DA GEOPRÓPOLIS E DO ÁCIDO ANACÁRDICO
EM *Staphylococcus epidermidis* MULTIRRESISTENTES
E MODULAÇÃO DA ATIVIDADE DE MACRÓFAGOS SUPRIMIDOS**

Orientador: Prof. Titular José Maurício Sforcin

Co-orientador: Dr. Nicolas Ripari

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu, para realização obtenção do título de Mestre.

**BOTUCATU-SP
2025**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Lopes, Emilly Camargo.

Efeito da geoprópolis e do ácido anacárdico em
Staphylococcus epidermidis multirresistentes e modulação da
atividade de macrófagos suprimidos / Emilly Camargo Lopes.
- Botucatu, 2025

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientador: José Maurício Sforcin

Coorientador: Nicolas Ripari

Capes: 20100000

1. Ácido fenólico. 2. Geoprópolis. 3. Macrófagos. 4.
Staphylococcus epidermidis.

Palavras-chave: Ácido anacárdico; Geoprópolis; Macrófago;
Staphylococcus epidermidis.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

O trabalho avança no conhecimento básico sobre a geoprópolis produzida por meliponíneos, um de seus constituintes isolados e suas propriedades antibacteriana e imunomoduladora.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The work advances in the basic knowledge about geopropolis produced by meliponines, one of its isolated constituents and its antibacterial and immunomodulatory properties.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE EMILLY CAMARGO LOPES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL E APLICADA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 10 dias do mês de fevereiro do ano de 2025, às 14h, no(a) Anfiteatro 2 da Pós-Graduação., realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de EMILLY CAMARGO LOPES, intitulada **Efeito da geoprópolis e do ácido anacárdico em *Staphylococcus epidermidis* multirresistentes e modulação da atividade de macrófagos suprimidos**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. JOSÉ MAURICIO SFORCIN (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências do Campus de Botucatu da Unesp, Profa. Dra. KAREN INGRID TASCA (Participação Presencial) do(a) Depto. de Infectologia, Dermatologia, Diagnóstico Por Imagem e Radioterapia / FM/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. JESÚS EFRAIN ALDAY NORIEGA (Participação Virtual) do(a) CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS / UNIVERSIDAD DE SONORA, MÉXICO. Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Prof. Dr. JOSÉ MAURICIO SFORCIN

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus, pela força, sabedoria e serenidade que me acompanharam ao longo de toda esta jornada. Sem a Sua luz, nada disso teria sido possível.

Agradeço ao meu orientador, Professor José Maurício Sforcin, pela orientação, paciência, confiança depositada em mim e por sempre me desafiar a ir além. Suas valiosas contribuições e seu apoio foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Sou imensamente grata aos meus colegas de laboratório, Mariana, Jônatas, Pedro, Yuri e Arthur, pela colaboração e pela amizade que construímos ao longo dessa caminhada, pelas conversas e pelo apoio técnico. Compartilhamos momentos de aprendizado, dificuldades e vitórias, que fizeram dessa jornada um processo ainda mais enriquecedor. Foram momentos de aprendizado e descontração que tornaram os desafios mais leves.

À toda minha família, meu mais sincero agradecimento. Aos meus pais, Elaine e Antonio, pela educação, pelo amor e pela constante motivação. Vocês são minha base, minha inspiração e o alicerce de tudo que sou, meus exemplos de perseverança e amor. Sempre me incentivaram a lutar pelos meus sonhos e, por isso, sou grata todos os dias. Agradeço por estarem ao meu lado, sempre acreditando em mim.

Ao meu namorado, Iranildo, muito obrigada. Pelo amor, carinho, paciência e apoio incondicional. Você foi meu porto seguro durante todo o processo, para que eu pudesse atravessar essa fase com mais tranquilidade. Você foi minha força e sou imensamente grata por ter você na minha vida

Agradeço aos professores Ary Fernandes Junior e Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, Instituto de Biociências, UNESP, por cederem seus laboratórios e fornecerem os isolados bacterianos de *S. epidermidis* utilizados neste trabalho.

Também agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de auxílio a pesquisa concedida durante o mestrado (2023-2025). Número do processo: 88887.826902/2023-00.

*“A mente que se abre a uma nova
ideia jamais voltará ao seu tamanho
original”
- Albert Einstein*

RESUMO

A geoprópolis (GEO) é produzida por abelhas sem ferrão e possui compostos bioativos, como o ácido anacárdico (AA), o qual apresenta diferentes atividades biológicas, dentre elas a antimicrobiana. *Staphylococcus epidermidis* é uma bactéria comensal que tem se tornado um problema de saúde pública devido à sua resistência aos antimicrobianos, ocasionando falha terapêutica. Essas bactérias podem causar infecções nosocomiais, que podem ser agravadas em pacientes imunossuprimidos. Neste estudo, foi avaliada a possível ação antibacteriana da GEO produzida por *Melipona fasciculada* Smith e de seu componente isolado, AA, bem como a ação dos tratamentos em associação com antibióticos, tendo como objetivo investigar a ação antibacteriana e imunomoduladora em macrófagos tratados ou não com dexametasona (DEX). Foi avaliada a concentração inibitória mínima (MIC) e bactericida (MBC) da GEO, do AA e dos antimicrobianos (ceftarolina e gentamicina) isoladamente ou em combinação, para observar uma possível ação sinérgica. O efeito dos tratamentos foi avaliado também na capacidade da bactéria em produzir biofilme. A ação imunomoduladora dos tratamentos foi analisada em células THP-1 diferenciadas em macrófagos suprimidos ou não, avaliando a viabilidade celular, a expressão de TLR-2, de eicosanoides (PGE2 e LTBG4), de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10) e a atividade bactericida contra *S. epidermidis*. A GEO não apresentou atividade antimicrobiana no modelo analisado. Em comparação com o AA, os antimicrobianos convencionais apresentaram concentração inibitória e bactericida mínima substancialmente mais elevadas. O AA também demonstrou eficácia na inibição de biofilmes bacterianos. O ensaio de *checkerboard* revelou ausência de interação entre AA ceftarolina e antagonismo com gentamicina. O AA não afetou a expressão de TLR-2, mas aumentou a capacidade bactericida dos macrófagos suprimidos ou não com dexametasona e inibiu a produção de IL-10. Pode-se concluir que o AA apresenta ação antibacteriana e imunomoduladora, podendo ser um adjuvante eficaz no tratamento de infecções por *S. epidermidis*.

Palavras-chave: geoprópolis; ácido anacárdico; *Staphylococcus epidermidis*; macrófago; imunossupressão.

Title: Effect of geopropolis and anacardic acid on *Staphylococcus epidermidis* multi-resistant and modulation of suppressed-macrophage activity

ABSTRACT

Geopropolis (GEO) is produced by stingless bees and contains bioactive compounds such as anacardic acid (AA), which exhibit various biological activities, including the antimicrobial one. *Staphylococcus epidermidis* is a commensal bacterium that has become a public health issue due to its resistance to antimicrobials, leading to therapeutic failure. These bacteria may cause nosocomial infections, which can be exacerbated in immunosuppressed patients. In this research, the potential antibacterial action of GEO produced by *Melipona fasciculata* Smith and its isolated compound, AA, was evaluated, as well as the combination of the treatments with antibiotics, aiming at investigating their antibacterial and immunomodulatory in macrophages treated or not with dexamethasone (DEX). The minimum inhibitory concentration (MIC) and bactericidal (MBC) of GEO, AA, and antibiotics (ceftaroline and gentamicin) was assessed in isolation or in combination to observe a potential synergistic action. The effect of treatments was also evaluated on the bacteria's ability to produce biofilm. The immunomodulatory action of treatments was analyzed in THP-1 cells differentiated into macrophages, whether suppressed or not, by evaluating cell viability, TLR-2 expression, eicosanoids (PGE2 and LTB4) and cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, and IL-10) production, and the bactericidal activity against *S. epidermidis*. Data revealed that GEO exerted no antibacterial action, while AA showed a significant activity against *S. epidermidis*. In comparison to AA, antimicrobials presented substantially higher minimum inhibitory and bactericidal concentrations. AA was also efficient in inhibiting bacterial biofilms. The checkerboard assay revealed no interaction between AA and ceftaroline, and antagonism with gentamicin. AA did not affect TLR-2 expression but increased the bactericidal capacity of macrophages suppressed or not with dexamethasone, and inhibited IL-10 production. One may conclude that AA exhibits antibacterial and immunomodulatory action and may be an effective adjuvant in the treatment of *S. epidermidis* infections.

Keywords: geopropolis; anacardic acid; *Staphylococcus epidermidis*; macrophage; immunosuppression.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E ENUNCIADO DO PROBLEMA	5
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo geral	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. METODOLOGIA	14
3.1 Obtenção da amostra de geoprópolis	14
3.2 Preparação do extrato hidroalcoólico de geoprópolis e obtenção do ácido anacárdico.....	14
3.3 Teste de suscetibilidade antimicrobiana por microdiluição em caldo	14
3.4 Sinergismo entre AA e antimicrobianos pelo método de <i>checkerboard</i>	15
3.5 Atividade antibiofilme do AA.....	16
3.6 Cultura de células THP-1, diferenciação em macrófagos e protocolos experimentais	16
3.7 Viabilidade celular	16
3.8 Expressão de TLR-2.....	18
3.9 Determinação da produção de citocinas e eicosanoides	18
3.10 <i>Killing</i> de <i>S. epidermidis</i> por macrófagos.....	19
3.11 Análise estatística	19
4. RESULTADOS	20
4.1 Concentração inibitória/bactericida mínima (MIC/MBC).....	20
4.2 <i>Checkerboard</i>	21
4.3 Capacidade antibiofilme do ácido anacárdico	22
4.4 Viabilidade celular de macrófagos	22
4.5 Expressão de TLR-2.....	23
4.6 Produção de eicosanoides.....	24
4.7 Produção de citocinas.....	25
4.8 Atividade bactericida dos macrófagos.....	28
5. DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÃO	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO E ENUNCIADO DO PROBLEMA

A pele e a mucosa possuem uma microbiota diversificada, sendo a bactéria mais prevalente *Staphylococcus epidermidis*, considerada um organismo comensal, importante para o controle da colonização por bactérias virulentas. Esta bactéria pertence ao grupo coagulase-negativo e a sua virulência é menor em comparação ao grupo coagulase-positivo, como por exemplo *Staphylococcus aureus* (KLEINSCHMIDT et al., 2015). Porém, nos últimos anos, se tornou um patógeno de importância médica, por ser a principal bactéria causadora de infecções associadas a implantes e marca-passo cardíaco, sendo responsável por 30 a 40% dos quadros de bacteremia nosocomial, que normalmente ocorre após um biofilme formado em um acesso se disseminar para a circulação sanguínea, sendo comumente isolada em hemocultura. A infecção causada por *S. epidermidis* é grave e de difícil tratamento, o que pode culminar em sepse e choque séptico, especialmente em neonatos e pacientes imunocomprometidos (ASAI et al., 2021; SEVERN; HORSWILL, 2023).

Os *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN) são de complexa patogênese devido à produção de fatores de virulência, como o biofilme e produção de toxinas, que contribuem para a destruição de tecidos e estimulam respostas inflamatórias, com a produção de interferon-gama (IFN- γ), interleucina (IL)-1, IL-2, e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (PEREIRA et al., 2018). Ademais, as cepas nosocomiais de *S. epidermidis* apresentam grande prevalência de multirresistência, tornando limitadas as opções terapêuticas (KLEINSCHMIDT et al., 2015). A resistência bacteriana pode surgir devido ao uso excessivo de antimicrobianos e à transferência de genes envolvidos em fatores de resistência entre as bactérias. Esse fenômeno se torna um grave problema de saúde pública, pois reduz as opções de tratamentos eficazes para infecções causadas por bactérias resistentes. Isto pode aumentar a mortalidade entre os indivíduos afetados (COOPER; SHLAES, 2011; DE OLIVEIRA; DE PAULA; ROCHA, 2015; AGUIRRE et al., 2020). Estima-se que até 2050 mais de 10 milhões de pacientes irão a óbito devido a infecções por bactérias resistentes, causando mais mortes do que o câncer e doenças cardiovasculares (O'NEILL, 2014).

O gene *mecA* é um dos fatores de resistência de *S. epidermidis* responsável pela codificação da proteína de ligação à penicilina (PBP)2A. As PBPs são enzimas

responsáveis pelo *cross-linking* da camada peptidoglicana da parede bacteriana e recebe este nome por terem sua ação bloqueada pelas penicilinas. No entanto, a PBP2A apresenta baixa afinidade por penicilinas, conferindo resistência aos beta-lactâmicos, como cefalosporinas (PEREIRA; CUNHA, 2013; PINHEIRO et al., 2016). As cepas portadoras deste gene suscitaram o uso da vancomicina, a qual apresentou eficiência, porém com notável toxicidade, sendo necessário monitorar o tratamento, devido à ocorrência de nefrotoxicidade ou ototoxicidade em alguns pacientes (KLEINSCHMIDT et al., 2015).

S. epidermidis também apresenta variedades de outros genes de resistência a antibióticos, muitos dos quais estão localizados em elementos genéticos móveis. A resistência à meticilina, que anteriormente era o fármaco de escolha para tratar infecções causadas por estafilococos, é frequentemente adquirida por meio do gene *mecA*. Esse gene está contido em uma ilha genômica móvel conhecida como cassette cromossômico estafilocócico *mec* (SCC *mec*), sendo especialmente prevalente em cepas de *S. epidermidis* encontradas em ambientes hospitalares. Além disso, a resistência à meticilina está frequentemente associada à resistência a outros tipos de antibióticos, tendo sido registrados casos de resistência a todas as classes de antibióticos em *S. epidermidis* (SEVERN; HORSWILL, 2023), tanto pela expressão de *mecA*, como de outros genes.

Suspeita-se que *S. epidermidis* e outros SCN atuem como um reservatório primário para aquisição do SCC *mec* em *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA - na sigla em inglês). Existem evidências de transferência deste e outros elementos genéticos móveis entre estas e outras espécies de estafilococos, como *S. aureus* e *S. epidermidis*. A preocupação se intensifica devido aos níveis elevados de resistência a antibióticos e à presença de genes de virulência compartilhados entre MRSA e *S. epidermidis* resistente à meticilina (MRSE - na sigla em inglês). Essa situação representa uma ameaça constante à saúde coletiva e aos resultados do tratamento de infecções, uma vez que as opções de tratamento eficazes são limitadas periodicamente (MÉRIC et al., 2015).

Outro fator que contribui para a virulência e resistência a antibióticos é sua capacidade de formar biofilme, que ocorre devido à aderência da bactéria a superfícies através de suas estruturas adesivas e produção de uma matriz extracelular contendo polissacarídeos. Estão relacionados aos quadros de infecções crônicas por sua

capacidade de crescimento em superfícies bióticas ou abióticas, como os dispositivos médicos (HOIBY et al., 2011; BJARNSHOLT et al., 2013). Sua formação está relacionada ao aumento da incidência de bactérias patogênicas multirresistentes em pacientes sob tratamentos antimicrobianos convencionais (FRIERI; KUMAR; BOUTIN, 2017). O biofilme confere proteção aos agentes ambientais, bem como à resposta imune do hospedeiro, o que torna as bactérias mais resistentes a antibióticos em comparação às bactérias individuais, visto que dificulta a penetração do antibiótico e diminui a fagocitose e ligações de proteínas. Assim, é importante a remoção do mesmo para controle das infecções, evidenciando a necessidade de tratamentos antibiofilme específicos (BJARNSHOLT et al., 2013; FLEMMING et al., 2016; YU et al., 2021).

As bactérias pertencentes ao biofilme são menos suscetíveis aos antibióticos, já que estes poderiam se ligar aos componentes do biofilme, além da alta densidade bacteriana, o que dificulta a sua penetração (PINHEIRO et al., 2014). Assim, a combinação da antibioticoterapia a estratégias que atuem na imunidade do hospedeiro pode ser benéfica no combate aos biofilmes (BJARNSHOLT et al., 2013).

No intuito de contribuir com inovações no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes, tivemos a iniciativa de avaliar um produto das abelhas sem ferrão – a geoprópolis, bem como um componente isolado deste produto: o ácido anacárdico.

As abelhas sem ferrão (*Meliponinae*) são produtoras de própolis e geoprópolis (GEO) e podem ser encontradas em regiões subtropicais e tropicais (figura 1). A própolis é um produto elaborado pelas abelhas a partir da coleta de resinas e exudatos das plantas e misturados com secreções glandulares das abelhas. A própolis é utilizada para vedar frestas e embalsamar invasores que eventualmente adentraram e morreram na colmeia, sendo demasiadamente pesados para serem removidos pelas abelhas.



Figura 1. Própolis produzida por *Scaptotrigona* aff. *postica* (A) e geoprópolis produzida por *Melipona fasciculata* (B). Foto: Abigail Araújo.

A GEO, por sua vez, é um produto similar, mas, curiosamente, as abelhas adicionam terra, barro e outros elementos ao material obtido das plantas. Isto deve-se ao fato de que os meliponíneos voam menores distâncias da colmeia e muitas vezes coletam os materiais facilmente encontrados para elaboração da GEO. Os meliponíneos geralmente não apresentam preferência por espécies vegetais para produzir a GEO, diferentemente das abelhas africanizadas, que são mais seletivas nesse aspecto. A GEO é uma fonte importante de compostos bioativos, sendo produzida a partir de resinas vegetais, secreções salivares e cera. Este material é utilizado nas colmeias para selar pequenas frestas, controlar a passagem de ar e entrada de água, atuando também como agente antimicrobiano (VENTURIERI et al., 2003; BARTH, 2006; ARAÚJO et al., 2015).

Em 2009, demos início aos estudos em nosso laboratório sobre uma amostra de GEO proveniente do Estado do Maranhão, revelando sua ação antimicrobiana, imunomoduladora e citotóxica contra células HEP-2. A amostra foi analisada quimicamente por técnicas cromatográficas, evidenciando que seus principais componentes são AA, lupeol, amirinas, dentre outros (ARAÚJO et al., 2015). Dados do nosso grupo demonstraram seu efeito citotóxico e antiproliferativo sobre linhagens tumorais animais e humanas (CINEGAGLIA et al., 2013; ARAÚJO et al., 2015; BARTOLOMEU et al., 2016) e sobre monócitos humanos (OLIVEIRA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2019). Também foi relatada sua ação antioxidante (DUTRA et al., 2014) e moduladora do perfil de citocinas em camundongos (LIBÉRIO et al., 2011), entre outras propriedades (ABREU et al., 2006; DUAILIBE; GONÇALVES; AHID, 2007). Nosso grupo publicou recentemente um trabalho demonstrando o potencial anti-inflamatório *in vitro* da GEO, analisando células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano (HONORIO et al., 2024).

Dentre os constituintes químicos da geoprópolis, tivemos o interesse em estudar o AA, correspondente a 8,3% da amostra produzida por *Melipona fasciculata* Smith e utilizada neste trabalho. Este ácido é um composto fenólico derivado do ácido salicílico e possui estrutura química que influencia suas atividades biológicas (Figura 2), onde R 9 representa as variações da sua cadeia lateral. O AA apresenta longa cadeia alquílica lateral formada por 2 a 17 carbonos e um anel fenólico ligado a um grupo metila, podendo existir na forma saturada e monoeno, dieno ou trieno (MAMIDYALA et al., 2013; ARAÚJO et al., 2015; HOLLANDS et al., 2016; MORAIS et al., 2017).

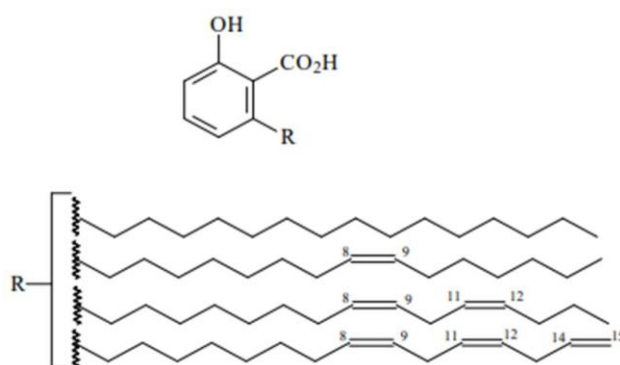


Figura 2. Estrutura química do ácido anacárdico. Fonte: Moraes et al. (2010).

Foi relatado que o AA apresenta atividade gastroprotetora, antitumoral, antioxidante e antimicrobiana (HAMAD; MUBOFU, 2015). Além disso, apresentou efeito inibitório em células eucarióticas e procarióticas, com capacidade de penetrar a bicamada lipídica da membrana bacteriana, causando a ruptura da célula (GREEN et al., 2007; MAMIDYALA et al., 2013). Quanto mais duplas ligações apresentar em sua cadeia lateral, maior é seu efeito antibacteriano (MORAIS et al., 2017). Tais observações despertaram nosso interesse em ampliar as investigações sobre a ação antimicrobiana e imunomoduladora não só da GEO, como também do AA.

Os macrófagos são células essenciais do sistema imune devido à sua capacidade de fagocitose, apresentação de antígenos, produção de mediadores antimicrobianos e secreção de citocinas que podem promover infiltração celular para o sítio infeccioso. Por outro lado, também podem levar a dano tecidual característico de processos inflamatórios, visto que a ativação excessiva de macrófagos pode favorecer o

desenvolvimento de imunopatologias (WALKER et al., 2011; NIKITINA et al., 2018; HUME; IRVINE; PRIDANS, 2019).

Em uma infecção bacteriana, os macrófagos identificam padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) através de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os receptores do tipo Toll (TLRs) (ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018). Tais receptores reconhecem PAMPs como ácidos nucleicos, proteínas, lipídios, lipoproteínas, entre outros, possuindo um domínio transmembranar e uma região intracitoplasmática para comunicação com moléculas acessórias, desencadeando a sinalização intracelular. As bactérias Gram-positivas são possuem em sua parede celular o ácido teicóico e sua presença é detectada por TLR-2 (TAKEDA; AKIRA, 2005; CHASSIN et al., 2009; WERTS, 2010; MILLER et al., 2019).

As infecções que levam a quadros de sepse podem causar mutações nos TLRs, o que indica que o equilíbrio entre a síntese e liberação de moléculas pró- e anti-inflamatórias determina a gravidade da infecção, lesão e recuperação da sepse. Os TLRs desempenham um papel crucial ao regular a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) e do nitrogênio, a função de macrófagos e leucócitos, e a síntese de eicosanoides, produzidos pelo metabolismo do ácido araquidônico e responsáveis por atrair células envolvidas na imunidade e controlar a diferenciação e sobrevivência celular, influenciando diretamente a inflamação, a resposta imune e a evolução da sepse (TAKEDA; AKIRA, 2005; CHASSIN et al., 2009; WERTS, 2010).

Os eicosanoides exercem papel regulador na produção de várias citocinas e de EROs, a expressão de TLR e ativação da via do NF- κ B (DAS, 2023). Os leucotrienos (LT) desempenham papéis cruciais em resposta às infecções, sendo broncoconstritores, aumentam a hiper-responsividade brônquica, a produção de muco e o edema de mucosa. Constituem uma família de mediadores e o LTB₄, em particular, potencializa a fagocitose, a produção de óxido nítrico por macrófagos e favorece a produção de moléculas antimicrobianas. Além disso, o LTB₄ estimula a produção de citocinas, como TNF α , IL-8 e IL-6, ampliando ainda mais a resposta inflamatória. Dessa forma, o LTB₄ se configura como um mediador essencial na resposta imune aos estímulos inflamatórios (VICENT et al., 2017). As prostaglandinas (PG) também desempenham papel fundamental na geração da resposta inflamatória. Sua biossíntese é significativamente aumentada no tecido inflamado, contribuindo para o desenvolvimento dos sinais

cardinais de inflamação aguda. As PGs são substrato para formação das diversas PGs com atividade, como PGD₂, PGE₂, PGF₂ α , prostaciclina e também dos tromboxanos (TSUGE et al., 2019).

A sinalização por TLRs em presença de patógenos bacterianos é capaz de ativar o fator de transcrição NF- κ B, culminando na expressão de fatores quimiotáticos e citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , induzindo febre e produção de proteínas de fase aguda no fígado (ACHEK; YESUDHAS; CHOI, 2016; LEE et al., 2016). Quando ativados, os macrófagos podem eliminar os patógenos devido à produção de ROS e à ação de enzimas lisossomais (WEST et al. 2011; NATHAN; CUNNINGHAM-BUSSEL, 2013; GENG et al., 2015).

As células THP-1 são originárias de uma linhagem celular imortalizada proveniente de um paciente pediátrico com leucemia monocítica aguda, sendo muito utilizada em estudos sobre as funções e mecanismos de monócitos e macrófagos, devido à sua capacidade de mimetizar monócitos humanos e poder se diferenciar em macrófagos após incubação com estímulos apropriados (QIN, 2012; CHANPUT et al., 2014).

Embora haja diversos agentes antimicrobianos utilizados para tratamento e controle de diferentes doenças infecciosas, estudos demonstram os efeitos adversos causados pelos mesmos, como o desenvolvimento da própria resistência antimicrobiana tanto pelo patógeno como pelo hospedeiro (OBEROI et al., 2015). Assim, tem sido crescente o uso de produtos naturais com propriedades medicinais na área da saúde devido à possibilidade de isolar substâncias com maior eficácia e melhor relação custo-benefício, tornando essencial a busca por novos antimicrobianos farmacologicamente eficazes e seguros (FREIRES et al., 2015; NEWMAN; CRAGG, 2016). Neste contexto, os fitoquímicos têm sido considerados uma opção terapêutica promissora em programas de atenção primária à saúde, principalmente em comunidades de baixa renda, devido ao seu fácil acesso e à redução nos gastos com medicamentos, além de acarretar menos efeitos colaterais no organismo. Produtos naturais também têm sido investigados como uma opção para tratamento de doenças com formação de biofilme, já que podem apresentar propriedade antibiofilme (ANTONIO; TESSER; MORETTI-PIRES, 2014; GOMES et al., 2016). Diversas pesquisas têm sido realizadas com produtos naturais de diferentes origens para obtenção de novas substâncias que contribuam para o controle de

infecções, o que impulsionou a descoberta de novos fármacos nos últimos anos (MISHRA; TIWARI, 2011; BROWN; WRIGHT, 2016).

Estudos anteriores possibilitaram a descoberta de substâncias que contribuem com a atividade antimicrobiana, como por exemplo o ácido clavulânico, que pode ser associado às penicilinas e cefalosporinas contra enterobactérias resistentes a β -lactâmicos, atuando como um inibidor da enzima β -lactamase (NEU, 1990; BUSH; BRADFORD, 2016).

Além da problemática ocasionada por bactérias resistentes, a infecção de indivíduos imunocomprometidos pode trazer sério risco a estes pacientes. Por esta razão, incluímos um protocolo de tratamento dos macrófagos com um agente imunossupressor (dexametasona) (EHRCHEN et al., 2019), para aprofundar o conhecimento sobre a atividade imunomoduladora da GEO e de um de seus constituintes, o AA, visando propor novas abordagens terapêuticas contra bactérias multirresistentes em indivíduos imunocomprometidos.

Estudos anteriores do nosso grupo avaliaram a ação da GEO em PBMCs, monócitos e células HEp-2 (BARTOLOMEU et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2019; HONORIO et al., 2024), porém sua ação sobre a atividade de macrófagos, em condições basais e imunossuprimidos, necessita ser elucidada, reforçando a importância deste trabalho. Ademais, a GEO foi menos estudada do que a própolis produzida por *Apis mellifera*, o que também nos motivou a ampliar o conhecimento sobre o seu potencial biológico.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a ação antibacteriana e imunomoduladora da GEO e do AA em associação ou não com antibióticos sobre *Staphylococcus epidermidis* multirresistentes e sobre monócitos THP-1 diferenciados em macrófagos suprimidos com DEX ou não.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Determinar a concentração inibitória mínima (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) da GEO e do AA, bem como dos antimicrobianos convencionais ceftarolina (CPT) e gentamicina (GEN) sobre isolados multirresistentes de *Staphylococcus epidermidis*;
- ✓ Avaliar a possível ação sinérgica da GEO e do AA com CPT e GEN sobre estes isolados;
- ✓ Analisar a capacidade antibiofilme sobre estes isolados, da GEO e do AA associados ou não aos antibióticos;
- ✓ Analisar a viabilidade metabólica dos macrófagos após tratamentos com as concentrações de AA e GEO que atuarem de forma inibitória (MIC₉₀) bem como das combinações que apresentarem efeito sinérgico;
- ✓ Avaliar o efeito imunomodulador após tratamentos de macrófagos suprimidos ou não com dexametasona (DEX), avaliando a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10) por ensaio imunoenzimático (ELISA);
- ✓ Analisar a produção de eicosanoides (PGE2 e LTB4) por ELISA;
- ✓ Analisar a capacidade bactericida dos macrófagos após incubação com os tratamentos em condições basais ou após supressão com DEX;
- ✓ Analisar, após tratamento, a expressão de TLR-2 por macrófagos por citometria de fluxo.

3. METODOLOGIA

3.1 Obtenção da amostra de geoprópolis

A GEO produzida por *Melipona fasciculata* Smith foi fornecida pelo apicultor Sr. Manuel Barros, a partir de colmeias localizadas no município de Palmeirândia (2º 39' S, 44º 55' O), pertencente à microrregião da baixada ocidental maranhense. Esta amostra apresentou como principais características organolépticas: fragmentos duros, grânulos de consistência heterogênea, inodora, cor marrom escura e sabor amargo (ARAÚJO et al., 2015). A GEO foi coletada com auxílio de espátulas esterilizadas e congelada a -20°C.

3.2 Preparação do extrato hidroalcoólico de geoprópolis e obtenção do ácido anacárdico

A amostra de GEO foi preparada a 30%, triturando 30 g e completando o volume para 100 mL de etanol 70%. O extrato foi mantido a temperatura ambiente e sob moderada agitação. Após 24 h, o material foi filtrado e a concentração final calculada, obtendo-se o peso seco do extrato hidroalcoólico de GEO (12,4 mg/mL). O extrato foi acondicionado em frasco âmbar, mantido sob refrigeração e diluído em caldo Mueller-Hinton (MHB) para obtenção das concentrações desejadas (ARAÚJO et al., 2015). O AA foi obtido comercialmente da Sigma (EUA) e diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) em alíquotas de 1 mg/mL.

3.3 Teste de suscetibilidade antimicrobiana por microdiluição em caldo

Os isolados de *S. Epidermidis* (SE01, SE02, SE03 e SE04) foram obtidos de hemoculturas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP, Campus de Botucatu e concedidos pelo laboratório da Profª Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da Cunha, Instituto de Biociências, UNESP, testadas positivas para o gene de resistência *mecA*. Também foi utilizada uma cepa padrão (ATCC 35983). O teste de suscetibilidade bacteriana foi realizado pelo método de microdiluição em caldo de acordo com o CLSI (2023). Colônias foram coletadas com auxílio de alça para serem

ajustadas em solução salina (0,9%) à escala 0,5 de McFarland (10^8 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL) para posterior diluição 1:100 (10^6 UFC/mL).

Soluções estoque de GEO (12.4 mg/mL), AA (1 mg/mL – correspondente a 2.87 mM) e antimicrobianos CPT (1 mg/mL) e GEN (50 mg/mL) foram diluídos 1:10 em MHB e posteriormente diluídos 1:1 em microplaca de 96 poços (50 μ L/poço) e diferentes concentrações foram obtidas por diluição seriada 1:1. A solução contendo as bactérias foi então adicionada em volume de 50 μ L/poço (10^5 UFC/mL) e incubada a 37 °C. Após incubação por 20 h/ 37 °C, 10 μ L de cada poço foram semeados em ágar BHI para subcultura (37 °C/20 h) a fim de determinar a MBC e, posteriormente, solução de resazurina (0,01% – 15 μ L por poço) foi adicionada para determinar a MIC de GEO, AA e antimicrobianos. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e então foi calculada a MIC₅₀ e MIC₉₀ de acordo com Schwarz et al. (2010).

3.4 Sinergismo entre AA e antimicrobianos pelo método de *checkerboard*

O possível sinergismo entre AA com os antimicrobianos CPT e GEN foi avaliado sobre a cepa ATCC 35983 pelo método de *checkerboard* (PILLAI et al., 2005). Microplacas de 96 poços foram preparadas com AA (1:10 em caldo MH) na coluna 1 (1:1 – 100 μ L), sendo o poço H em concentração 0 μ g/mL. O mesmo procedimento foi realizado na fileira G com o antimicrobiano, iniciando do poço 8 (1:1 – 100 μ L), efetuando diluições seriadas cruzadas (1:1 – 100 μ L) nas colunas 8 a 1, e fileiras G à A, adicionando os antimicrobianos em formato de tabuleiro com diferentes concentrações. Em seguida, culturas de bactérias à escala 0,5 McFarland (1:100 – em caldo MH) foram adicionadas aos poços (100 μ L). O sinergismo foi interpretado pelo índice de concentração inibitória fracionada (FICI) de acordo com a seguinte fórmula:

$$(FICI) = A/MIC_A + B/MIC_B$$

em que “A” e “B” referem-se à MIC de AA e antimicrobianos separadamente, e MIC_A e MIC_B referem-se às MICs observadas no tabuleiro de diluições cruzadas. Os resultados foram interpretados como sinergismo (FICI \leq 0,5), sem interação (FICI > 0,5-4,0) ou antagonismo (FICI > 4,0) (ODDS, 2003).

3.5 Atividade antibiofilme do AA

A avaliação da atividade antibiofilme do AA seguiu o protocolo modificado de STEPANOVIC et al. (2007) e GOODWINE et al. (2019). Placas de 96 poços contendo 100 µL de TSB 1% de glicose (Oxoid), foram preparadas contendo AA, em concentrações correspondentes a 25%, 50% e 75% da MIC₉₀ para a cepa ATCC 35983.

Em seguida, uma densidade de culturas de 0,5 na escala McFarland foi preparada em TSB 1% de glicose. Cada poço foi inoculado com 100 µL dessa cultura na fase estacionária máxima, seguida de incubação a 37°C por 48 horas. Após a incubação, os poços foram lavados três vezes com 200 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS - pH 7.4) e a placa foi deixada à temperatura ambiente por 4 h para secagem. O biofilme formado no fundo dos poços foi fixado com 150 µL de metanol por 20 minutos.

Após secagem *overnight* à temperatura ambiente, o biofilme foi corado com 150 µL de cristal violeta (1%) por 15 minutos. A placa foi lavada com água corrente para remover o excesso de corante, como recomendado para estafilococos (STEPANOVIC et al., 2007).

Os biofilmes corados foram suspensos em ácido acético a 33% (150 µL) antes da leitura em leitor de placas EPOCH2, mensurando a absorbância a 570 nm em uma matriz 3x3. A porcentagem (%) de inibição da formação de biofilme foi determinada utilizando a fórmula:

$$\% = 1 - [(m\u00e9dia da cultura teste/m\u00e9dia da cultura controle) \times 100].$$

3.6 Cultura de células THP-1, diferenciação em macrófagos e protocolos experimentais

A linhagem de células monocíticas humanas THP-1 (American Type Culture Collection TIB-202) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brasil) e cultivada em frascos de 75 cm² contendo 20 ml de meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram cultivadas a 37 °C e 5% de CO₂, até a obtenção de 70-90% de confluência. A concentração de células THP-1 foi ajustada para 1 × 10⁶ células/mL (250 mL/poço) em microplacas de 24 poços e tratadas com 20 ng de forbol 12-miristato-13 acetato (PMA)/mL por 24 h a 37 °C para diferenciação dos monócitos em macrófagos. Em seguida, foram realizados 3 diferentes protocolos experimentais, como segue:

1) No primeiro delineamento experimental, os macrófagos foram tratados com AA (31,25 µg/mL – MIC₉₀, correspondente a 89.7 µM) diluído em meio RPMI 1640 por 18 h, para verificar um possível efeito citotóxico e também para analisar sua influência na produção de citocinas em condições basais, utilizando o lipopolissacarídeo (LPS – 100 ng/mL) como controle positivo. O período de 18 h foi adotado para haver tempo hábil de ação dos tratamentos e posterior avaliação dos parâmetros estudados.

2) Na segunda etapa, o efeito dos tratamentos foi avaliado em modelo de inflamação induzida por LPS (100 ng/mL) por 3 h e posterior determinação da concentração de PGE2 e LTB4, para verificar a possível ação anti-inflamatória do AA. Estes mediadores são produzidos a curto-prazo e, portanto, foram avaliados após 3 h de adição do LPS.

3) Em outro modelo, foi induzida supressão dos macrófagos, visando analisar a possível ação imunorestauradora do AA sobre células previamente tratadas com dexametasona (DEX – 10 µM, Sigma-Aldrich). Para tal, células THP-1 foram diferenciadas em macrófagos e tratadas com DEX (10 µM) por 3 h (CHOI et al., 2006; PAWLIK et al., 2006). Em seguida, foram adicionados os tratamentos por 18 h e os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados e armazenados a –80 °C para posterior determinação da produção de citocinas e as células foram utilizadas para avaliar a atividade bactericida dos macrófagos.

3.7 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo método de redução do MTT (3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich, EUA). O princípio deste método consiste na absorção do sal MTT pelas células, o qual é reduzido no interior da mitocôndria a formazan. Após incubação das culturas celulares por 18 h com os diferentes estímulos, o sobrenadante foi removido e foram adicionados 300 µL de MTT dissolvido em meio RPMI 1640, seguido de posterior incubação a 37 °C e 5% CO₂. Após 3 h, o MTT foi retirado e foram adicionados 200 µL de DMSO para solubilização dos cristais de formazan. A leitura da densidade óptica foi realizada em leitor de ELISA com filtro de 540 nm para cálculo das porcentagens de viabilidade celular. Os resultados foram expressos em relação ao controle, considerando-o como 100%.

3.8 Expressão de TLR-2

Este protocolo foi realizado por citometria de fluxo para avaliar os efeitos do AA na expressão de TLR-2 por macrófagos. Após 18 h, as células (1×10^6 células/ml) foram distribuídas em tubos de poliestireno (Becton Dickinson, EUA), lavadas e incubadas com anticorpo monoclonal anti-TLR-2-PE (Biolegend Inc., EUA) e anti-CD14-PerCP-CY5.5 (0.3 μ L) por 30 min. Um tubo controle (autofluorescência) com células não marcadas e um tubo de controle isotípico foram incluídos em cada teste. Após incubação, as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Bioscience, EUA), sendo analisados cerca de 30.000 eventos por amostra, utilizando o software CELL QUEST (Cell Quest Software, EUA). O *gate* foi estabelecido com base nos parâmetros da porcentagem de células expressando TLR-2, bem como a mediana de intensidade de fluorescência (MIF).

3.9 Determinação da produção de citocinas e eicosanoides

A determinação da concentração de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10 foi realizada através de ensaio imunoenzimático (ELISA) com o sobrenadante coletado anteriormente. Inicialmente, foram adicionados 100 μ L de PBS e anticorpos monoclonais diluídos conforme instruções do fabricante (R & D Systems, EUA) às placas de poliestireno (Maxisorp Nunc, EUA), e incubadas *overnight* a 4 °C em câmara úmida. Após 3 lavagens dos poços com PBS acrescido de Tween 20 (0,05%), ocorreu o bloqueio dos poços com albumina sérica bovina (10% - Sigma-Aldrich, EUA) em PBS para saturação dos sítios de ligação e, em seguida, a placa foi incubada a temperatura ambiente por 1 h. Nova sequência de lavagens foi realizada e alíquotas de 100 μ L dos sobrenadantes das culturas de células foram adicionadas com posterior incubação por 2 h a temperatura ambiente. Os poços foram lavados e, ao anticorpo de detecção policlonal biotilado, foi adicionado o conjugado estreptoavidina-peroxidase, incubando-se novamente por 20 minutos. Novas lavagens foram realizadas e, para revelação, foram adicionados 100 μ L da solução contendo o substrato peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina (TMB). Após 20 minutos a temperatura ambiente, a reação enzimática foi interrompida pela adição de 50 μ L de H₂SO₄ 2N. As mensurações

foram realizadas em leitor de ELISA com filtro de 490 nm.

Para avaliação de PGE 2 e LTB4 , foi utilizado kit comercial de ELISA do tipo competitivo (Cayman Chemicals, EUA), o tratamento foi realizado após estimulação das células com LPS (100 ng/mL) por 3h. O protocolo foi realizado de acordo com as especificações do fabricante.

3.10 Killing de *S. epidermidis* por macrófagos

Após incubação com forbol 12-miristato 13-acetato (PMA - Sigma-Aldrich) por 24 h, o sobrenadante das culturas foi removido e as células foram tratadas ou não com DEX, conforme descrito no item 3.6. Em seguida, as células foram incubadas com AA (31,25 µg/mL - correspondente à MIC₉₀), com LPS (100 ng/mL) ou com DMSO em meio RPMI 1640 para nova incubação por 18 h. Os sobrenadantes foram removidos e armazenados a -80°C para quantificação de citocinas pelo método de ELISA. Os macrófagos aderentes foram desafiados com 100 µL da suspensão bacteriana contendo a cepa ATCC 35983 (1 macrófago:20 bactérias) em triplicata, seguido de incubação por 1h30min.

Posteriormente, os sobrenadantes foram descartados e 500 µL de água destilada estéril gelada foram adicionados para lisar os macrófagos. Deste volume, 100 µl foram retirados e semeados em placas de Petri contendo BHI ágar pelo método *Pour Plate*. As placas foram incubadas a 37 °C/48h, em triplicata, para contagem de UFC/mL visando determinar a porcentagem de atividade bactericida de macrófagos, de acordo com a seguinte fórmula:

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

3.11 Análise estatística

As análises foram realizadas utilizando GraphPad Prism Software 8.0. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey para citocinas e atividade bactericida e teste de Dunnet para os demais parâmetros (P < 0,05).

4. RESULTADOS

4.1 Concentração inibitória/bactericida mínima (MIC/MBC)

Neste estudo, investigamos as MICs de antimicrobianos convencionais (GEN e CPT), bem como de GEO e AA sobre diferentes cepas de *S. epidermidis*, incluindo a cepa de referência ATCC 35983 e outros isolados clínicos de hemocultura (SE01 a SE04) (Tabela 1).

Para o AA, observamos uma faixa de MIC variando de 15,625 a 31,25 µg/mL entre a cepa ATCC 35983 e os isolados clínicos SE01, SE02, SE03 e SE04.

Quanto à GEN, as MICs variaram de 625 a 2500 µg/mL para a cepa ATCC 35983 e os isolados clínicos. Para CPT, as MICs foram de 50 µg/mL para ATCC 35983, SE01, SE02 e SE03 e de 6,25 para SE04.

Por fim, o extrato hidroalcoólico de GEO apresentou MIC superior a 3100 µg/mL para todos os isolados testados e, por esta razão, não foi avaliado nos demais ensaios, não sendo possível realizar os cálculos para MIC₅₀ e MIC₉₀.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (MIC - µg/mL) de ácido anacárdico (AA), gentamicina (GEN), ceftarolina (CPT) e extrato hidroalcoólico de geoprópolis (GEO) para os isolados resistentes de *S. epidermidis*. Valores representam a variação de MICs obtidas em três experimentos independentes.

Treatments	ATCC 35983	SE01	SE02	SE03	SE04	MIC ₅₀	MIC ₉₀
AA	31,25	31,25	31,25	15,625	31,25	15,6	31,25
GEN	2500	2500	625	312,5	156,25	312,5	1250
CPT	50	50	50	50	6,25	6,25	25
GEO	>3100	>3100	>3100	>3100	>3100	-	-

Também foi investigada a MBC dos antimicrobianos convencionais, bem como de AA e GEO, sobre os diferentes isolados *S. epidermidis* (Tabela 2). Para o AA, observamos uma faixa de MBC variando de 62,5 µg/mL a >250 µg/mL sobre a cepa ATCC 35983 e entre os isolados clínicos. Em relação à GEN, todas os isolados apresentaram MBC superior a 2500 µg/mL, indicando que este antimicrobiano não exerceu efeito

bactericida contra os isolados estudados. A CPT apresentou MBC acima de 50 µg/mL para todos os isolados testados, exceto para SE04, em que a MBC foi 50 µg/mL.

GEO apresentou MBC acima de 3100 µg/mL para todos os isolados, indicando uma resistência generalizada a este produto meliponícola.

Tabela 2. Concentração bactericida mínima (MBC - µg/mL) de ácido anacárdico (AA), gentamicina (GEN), ceftarolina (CPT) e extrato hidroalcoólico de geoprópolis (GEO) para os isolados de *S. epidermidis*.

Treatments	ATCC 35983	SE01	SE02	SE03	SE04
AA	62,5	125	>250	250	>250
GEN	>2500	>2500	> 2500	>2500	>2500
CPT	>50	>50	>50	>50	50
GEO	>3100	>3100	>3100	>3100	>3100

4.2 Checkerboard

O ensaio de *checkerboard* foi realizado para avaliar a possível interação do AA com GEN e CPT contra a cepa ATCC 35983 de *S. epidermidis*.

A combinação de AA com GEN resultou em antagonismo, com FICI = 5, indicando redução na eficácia antibacteriana. A combinação de AA com CPT demonstrou ausência de interação, com FICI = 2 (Tabela 3).

Diante dos resultados obtidos, o AA foi utilizado isoladamente nos demais ensaios.

Tabela 3. Resultados obtidos pelo método de *checkerboard* entre ácido anacárdico (AA) e gentamicina (GEN) e ceftarolina (CPT) contra a cepa ATCC 35983.

	A	B	MIC _A	MIC _B	FIC _A	FIC _B	FICI	Interpretation
AA + GEN	15,6	1250	15,6	312,5	1	4	5	AT
AA + CPT	50	15,6	50	15,6	1	1	2	SI

A e B: MIC dos antimicrobianos isolados; SI: sem interação; AT: antagonismo.

4.3 Capacidade antibiofilme do ácido anacárdico

Investigamos a capacidade antibiofilme do AA contra cepa de *S. epidermidis* ATCC 35983, utilizando 75%, 50% e 25% da MIC₉₀, com o objetivo de avaliar sua eficácia na inibição do biofilme bacteriano.

Os resultados demonstraram que o AA apresentou capacidade inibitória do biofilme em todas as concentrações testadas. A maior porcentagem de inibição foi observada utilizando 75% da MIC₉₀, com média de inibição de 45,41%. Em seguida, a concentração de 50% apresentou média de inibição de 32,71%, seguida pela concentração de 25%, a qual não apresentou significância estatística (Figura 3).

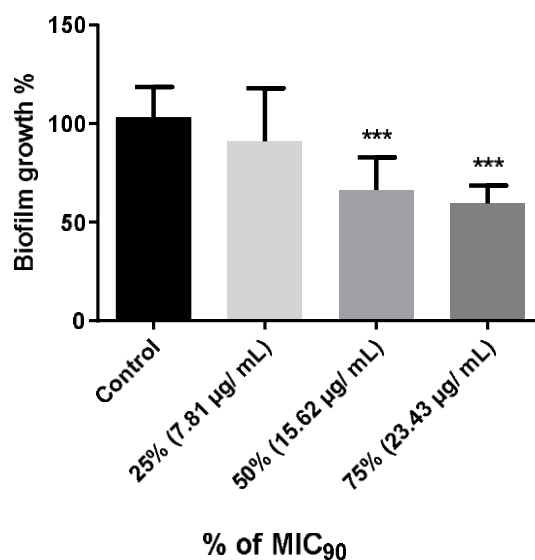


Figura 3. Porcentagem (%) de crescimento do biofilme após desafio com a MIC₉₀ nas razões de 75%, 50% e 25% do ácido anacárdico (AA) sobre a cepa ATCC 35983. ***P < 0.001 vs controle.

4.4 Viabilidade celular de macrófagos

Com base nos resultados obtidos nos testes antimicrobianos, a GEO não foi avaliada nos ensaios imunológicos e utilizamos a melhor concentração de AA (31,25 µg/mL) obtida nos ensaios microbiológicos para avaliar sua capacidade imunomoduladora. Inicialmente, investigamos o efeito do AA na atividade metabólica

de células THP-1 diferenciadas em macrófagos com o objetivo de investigar se a MIC₉₀ de AA apresenta efeito citotóxico, utilizando o ensaio de viabilidade celular com MTT. As células foram tratadas com AA na concentração 31,25 µg/mL (MIC₉₀) e comparadas com os grupos controle (sem tratamento), controle positivo (LPS - 100 ng/mL) e controle do solvente (DMSO - 0.3%).

Os resultados demonstraram que o AA não apresentou efeito citotóxico significativo nos macrófagos. A viabilidade celular foi mantida em níveis semelhantes nos grupos controle e DMSO, indicando ausência de efeito do solvente (Figura 4).

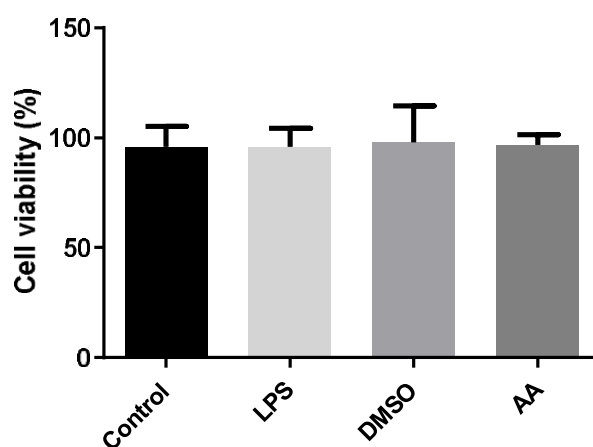


Figura 4. Porcentagem (%) de viabilidade após incubação de macrófagos com RPMI 1640 (controle), lipopolissacarídeo (LPS - 100 ng/mL), DMSO (0.3%) ou ácido anacárdico (AA - 31,25 µg/mL) por 18 h ($P > 0.05$).

4.5 Expressão de TLR-2

Para avaliar a ação do AA sobre a expressão do TLR-2 em macrófagos, as expressões foram quantificadas em percentual de células positivas e como mediana de intensidade de fluorescência (MIF) nas diferentes condições experimentais: controle (CONTROL), LPS e AA. Observou-se um aumento não significativo tanto na expressão como na MIF de TLR-2 nas células estimuladas com LPS. O AA não afetou tal avaliação (Figura 5).

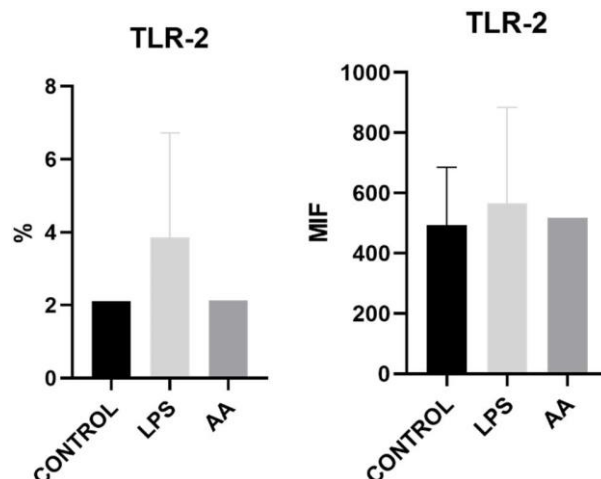


Figura 5. Porcentagem (%) de monócitos expressando TLR-2 e mediana de intensidade de fluorescência (MIF) após tratamento por 18 h com meio RPMI 1640 (controle), lipopolissacarídeo (LPS - 100 ng/mL) ou ácido anacárdico (AA - 31,25 µg/mL) ($P > 0.05$).

4.6 Produção de eicosanoides

Os dados apresentados na Figura 6A e 6B são referentes à dosagem dos eicosanoides LTB₄ e PGE₂, respectivamente. A produção média de LTB₄ pelo grupo controle foi de 1,78 ng/mL, enquanto o grupo tratado com LPS apresentou valores significativamente mais altos, com média de 4,35 ng/mL. O grupo tratado com LPS+AA obteve uma média de 1,36 ng/mL, indicando que o AA pode ter atenuado o efeito inflamatório exercido pelo LPS.

Quanto à produção da PGE₂, o grupo tratado com LPS apresentou valores significativamente mais altos que as células controle. A adição de AA às células tratadas com LPS induziu diminuição não significativa na produção de PGE₂ em relação ao LPS.

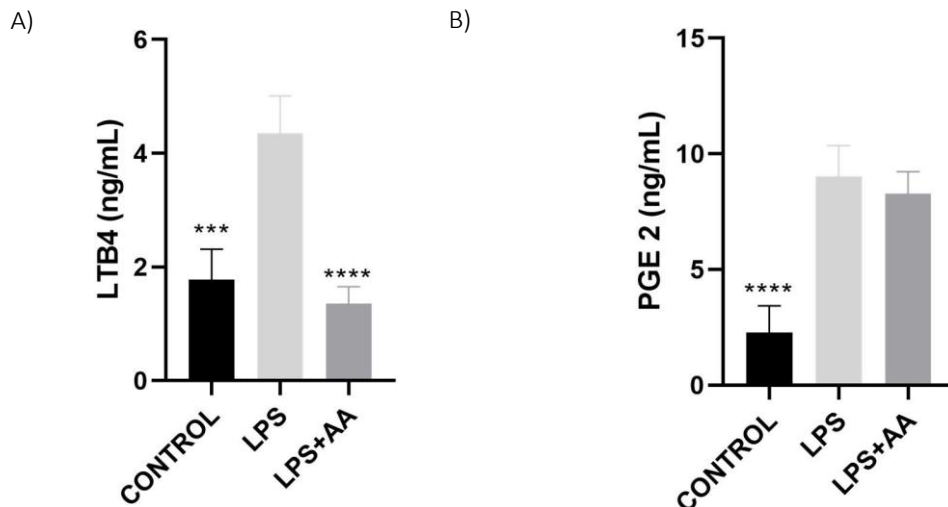


Figura 6. Produção de A) leucotrieno B4 (LTB4) e B) prostaglandina E2 (PGE2) por macrófagos tratados com RPMI 1640 (controle), lipopolissacarídeo (LPS - 100 ng/mL) por 2 h, seguido de incubação com ácido anacárdico (AA - 31,25 µg/mL) por 3 h. ***P 0.0001, ****P < 0.0001 vs LPS.

Tomados em conjunto, os dados quanto à produção de eicosanoides sugerem que o AA exerce um efeito atenuador, mas não sendo capaz de neutralizar completamente a ação induzida pelo LPS.

4.7 Produção de citocinas

A ação do AA na produção de citocinas por macrófagos foi realizada em condições basais, avaliando o efeito do LPS, DMSO (solvente) e do AA. O DMSO não apresentou efeito da produção das citocinas analisadas, com resultados próximos ao controle (dados não mostrados). Os resultados obtidos para as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-8 são apresentados Figura 7.

A estimulação com LPS resultou em níveis elevados de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8. O AA não afetou a produção destas citocinas, com níveis semelhantes ao controle.

O AA reduziu significativamente a produção de IL-10.

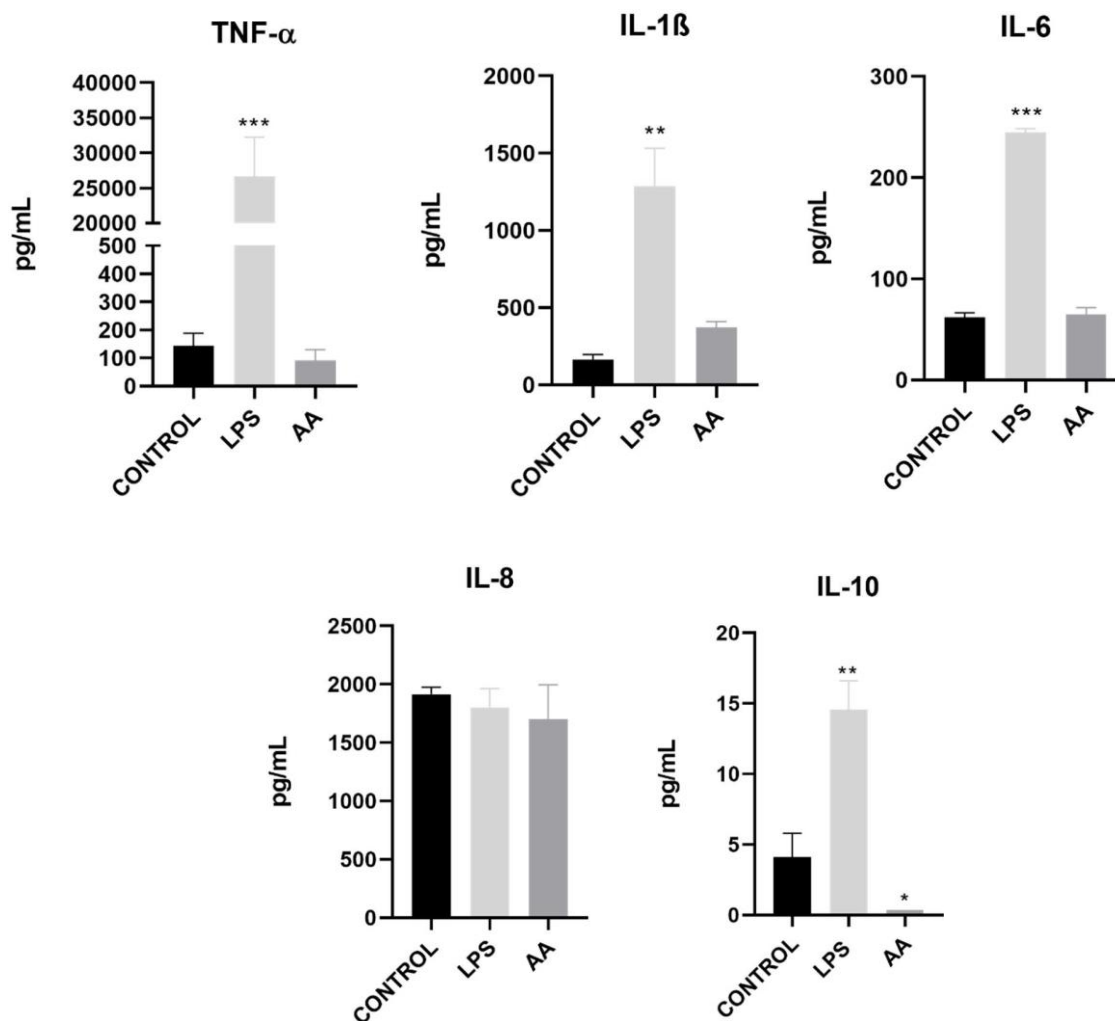


Figura 7. Produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10 por macrófagos tratados com RPMI 1640 (controle) lipopolissacarídeo (LPS - 100 ng/mL) e ácido anacárdico (AA - 31,25 μ g/mL) por 18 h. *P<0,05; **P<0,01; ***P < 0.001 vs controle.

Neste trabalho, foi avaliada também a ação do AA em macrófagos sob condições de imunossupressão induzida pela DEX, com os tratamentos LPS, DEX, DEX+LPS e DEX+AA (Figura 8).

Conforme esperado, a estimulação com LPS induziu um aumento na produção de TNF- α e IL-1 β , enquanto o tratamento com DEX reduziu os níveis dessa citocina. A combinação de DEX com LPS resultou em níveis elevados de TNF- α e IL-1 β . No entanto, o tratamento com AA em condições de imunossupressão (DEX+AA) não reverteu a ação da DEX.

O tratamento com LPS resultou em elevação significativa na produção de IL-6. A

administração de DEX isoladamente reduziu os níveis de IL-6, e as combinações de DEX + LPS ou DEX+ AA apresentaram efeito inibitório na produção da citocina.

Não houve diferenças na produção de IL-8 entre os diferentes tratamentos.

A produção de IL-10 aumentou após estimulação com LPS e foi reduzida no grupo tratado com DEX. A combinação de DEX com LPS apresentou níveis elevados de IL-10, similar ao LPS isolado. No entanto, a administração de AA no contexto de imunossupressão resultou em forte diminuição na produção de IL-10 em comparação com a DEX isoladamente, com valores próximos a zero, indicando um efeito ainda mais supressor.

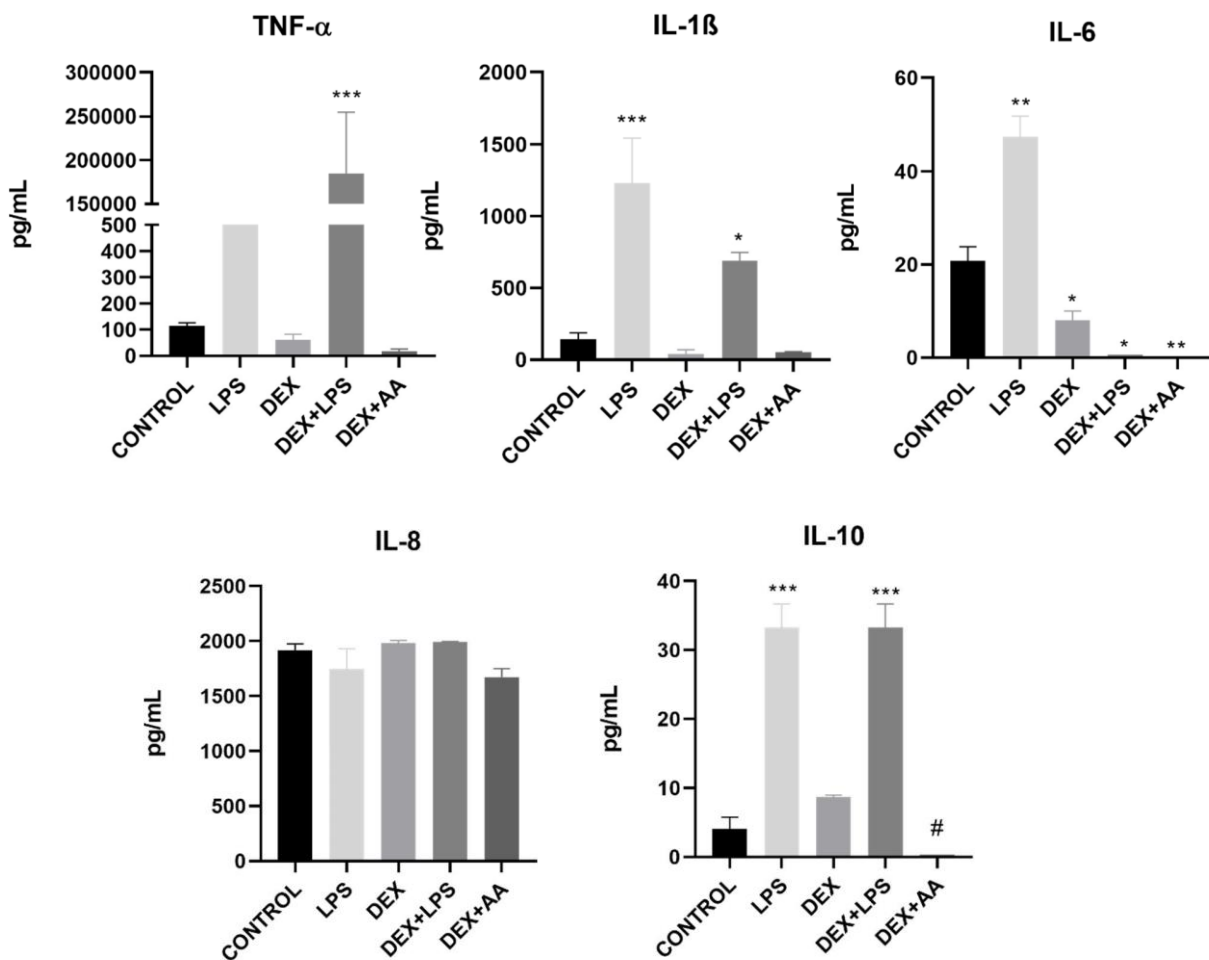


Figura 8. Produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10 por células tratadas com dexametasona (DEX - 10 μ M) por 3 h, seguido de incubação com lipopolissacarídeo (LPS - 100 ng/mL) ou ácido anacárdico (AA - 31,25 μ g/mL) por 18 h. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 vs LPS, #P < 0.05 vs DEX.

4.8 Atividade bactericida dos macrófagos

Os macrófagos foram tratados com AA para avaliar sua ação imunomoduladora após desafio com *S. epidermidis*, tanto em condições basais como após tratamento com DEX. Os grupos experimentais incluíram um controle basal, tratamento com LPS e tratamento com AA.

Os macrófagos estimulados com LPS apresentaram capacidade bactericida significativamente maior comparado ao controle. O tratamento com AA também resultou em elevada capacidade de eliminação bacteriana, superior ao controle e ao LPS (Figura 9A).

Para avaliar o impacto da imunossupressão, os macrófagos foram tratados com DEX (10 μ M) e posteriormente com LPS ou AA.

A DEX isoladamente reduziu a capacidade bactericida dos macrófagos. Entretanto, a adição de LPS à DEX exerceu efeito restaurador na eliminação bacteriana. De forma similar, a combinação de AA com DEX também resultou em elevada capacidade de eliminação bacteriana, sugerindo o possível papel imunorestaurador desta molécula (Figura 9B).

Os resultados demonstraram que o AA foi eficaz em aumentar a capacidade de *killing* por macrófagos contra *S. epidermidis*, mesmo em condições de imunossupressão.

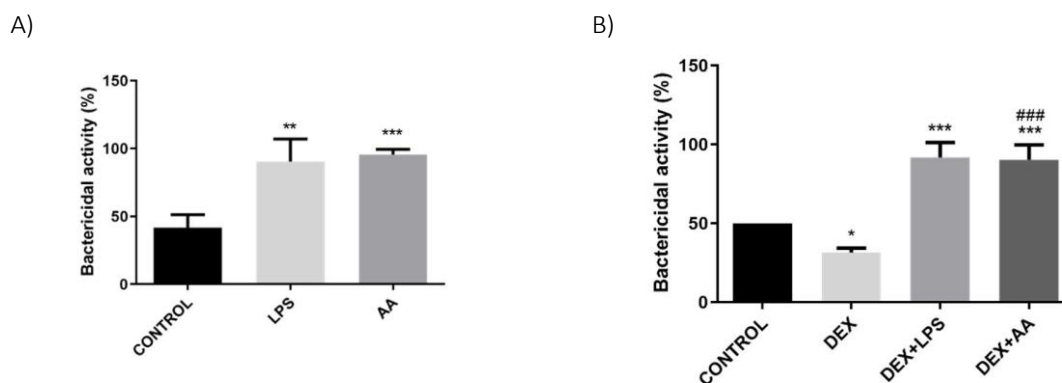


Figura 9. Atividade bactericida de macrófagos controle, onde A representa as células em condições basais e B em imunossupressão com dexametasona (DEX – 10 μ M) tratados com MIC₉₀ de ácido anacárdico (AA - 31,25 μ g/mL) ou com lipopolissacarídeo (LPS - 100 ng/mL). * P < 0.05, **P < 0.01; ***P<0.001 vs controle e ### P. <0.001vs DEX.

5. DISCUSSÃO

A introdução de pontos de acesso em hospitais, como sondas, agulhas e cateteres é essencial para certos tratamentos. No entanto, algumas bactérias, especialmente as do gênero *Staphylococcus*, desenvolveram a capacidade de persistir nesses sítios, mesmo após esterilização. No caso de *S. epidermidis*, o problema torna-se ainda mais complexo, pois esta bactéria é comensal da pele humana e apresenta grande capacidade de formar biofilmes, tornando a infecção imprevisível em indivíduos acamados e imunossuprimidos devido a comorbidades ou ao uso de anti-inflamatórios.

Trabalhos anteriores de nosso grupo têm revelado o potencial antitumoral e imunomodulador da GEO (BARTOLOMEU et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2019; HONORIO et al., 2024). Em nosso projeto, decidimos avaliar a atividade da GEO e do AA contra *S. epidermidis* e investigar a possível ação antibacteriana em isolados multirresistentes. Apesar de outros estudos demonstrarem o potencial antibacteriano da GEO (CUNHA et al., 2013), em nosso trabalho a mesma não apresentou efeitos positivos.

A ausência de efeito antimicrobiano no extrato bruto da GEO pode ser devido à sua mistura complexa de compostos, e alguns deles podem interferir ou diluir a ação do AA, atenuando seu efeito antimicrobiano. Interações entre os compostos presentes, como flavonoides, ácidos fenólicos e outros constituintes podem modificar a biodisponibilidade e a eficácia do AA. Além disso, o extrato de GEO é uma solução mais diluída, o que pode resultar em uma menor concentração do AA e de outros compostos bioativos, reduzindo a atividade antimicrobiana em comparação com o composto isolado. Por esta razão, optamos por avaliar o AA de forma isolada nos demais ensaios.

A obtenção de valores baixos de MIC e MBC é fundamental para a eficácia de tratamentos antimicrobianos, pois indica a capacidade de inibir ou eliminar microrganismos em concentrações menores, garantindo maior segurança e menores efeitos colaterais. Além disso, estudos com produtos naturais oferecem fonte de compostos bioativos que podem ser potenciais alternativas terapêuticas, ampliando as opções para o combate à resistência antimicrobiana e ao surgimento de novas infecções. Os resultados referentes à MIC demonstraram que o AA possui atividade antimicrobiana significativa contra as cepas de *S. epidermidis* testadas, indicando que, mesmo em concentrações relativamente baixas, o AA pode inibir o crescimento bacteriano. Uma

MIC e MBC mais baixas implicam em maior eficiência no controle e eliminação bacteriana; entretanto, é importante ressaltar que, para algumas cepas, as MBCs do AA foram significativamente superiores às MICs, sugerindo que concentrações mais elevadas podem ser necessárias para alcançar a eliminação completa das bactérias. Um estudo utilizando outro composto natural, o cinamaldeído, sobre a cepa ATCC 35983 de *S. epidermidis*, obteve valores de MIC e MBC mais elevados que os do AA. Já para os isolados clínicos, os resultados foram ainda mais elevados (ALBANO et al., 2019). Outro estudo recente demonstrou o efeito bactericida do AA em outras bactérias Gram-positivas (*Streptococcus mutans* e *Streptococcus. mitis*) (SOUZA et al., 2022). Os achados indicam que o AA apresenta um potencial promissor como agente antimicrobiano para o tratamento de infecções por bactérias Gram-positivas, especialmente contra cepas de *S. epidermidis*, com atividades significativas mesmo em concentrações relativamente baixas, destacando-se como uma alternativa viável frente a infecções por bactérias resistentes a múltiplos fármacos e reforçando a importância de continuar explorando produtos naturais para o desenvolvimento de novas terapias antimicrobianas.

Em seguida, realizamos o ensaio de *checkerboard* para investigar a possível interação do AA com antibióticos (GEN e CPT), a fim de avaliar como essas combinações poderiam melhorar a eficácia dos tratamentos contra a cepa ATCC 35983 de *S. epidermidis*. A combinação de AA com GEN resultou em efeito antagonista, indicando que tal combinação é menos eficaz do que os agentes individuais. A combinação de AA com CPT apresentou-se como indiferente, indicando que a eficácia dos antimicrobianos não é significativamente afetada pela presença de AA. Um estudo utilizando a combinação de outro composto natural, o cinamaldeído, demonstrou que a combinação de 25% de cinamaldeído com 25% de oxacilina ou com 25% de vancomicina atenuaram o crescimento bacteriano de cepas de *S. epidermidis* (ALBANO et al., 2019). Os resultados do ensaio de *checkerboard* indicam que o AA apresenta interações variadas com diferentes antimicrobianos. Esses achados destacam a importância de avaliar cuidadosamente as combinações de agentes terapêuticos para evitar interações negativas que possam comprometer o tratamento.

Os testes de inibição de biofilme evidenciam a eficácia do AA na redução da formação de biofilme por *S. epidermidis*. A inibição foi mais pronunciada utilizando a concentração de 75% da MIC₉₀. A redução da formação de biofilme é crucial para

prevenir infecções persistentes, especialmente em ambientes clínicos, onde os biofilmes podem proteger as bactérias da ação dos antibióticos e das células do sistema imunológico. Um estudo utilizando cinamaldeído sobre a formação de biofilme por *S. epidermidis* demonstrou que concentrações sub-inibitórias superiores a 60% da MIC do cinamaldeído foram capazes de reduzir significativamente a formação de biofilme quando comparadas ao controle, de forma dose-dependente (ALBANO et al., 2019). Um estudo *in vitro* e *in vivo* utilizando cateteres revestidos com AA demonstrou redução significativa na colonização por *Staphylococcus aureus* e formação de biofilme na superfície do cateter (SAJEEVAN et al., 2018). SOUZA et al. (2022) também demonstraram a capacidade do AA de inibir a formação de biofilme mesmo em baixas concentrações por outras bactérias Gram-positivas (*Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus sobrinus*). Estes resultados reforçam o potencial do AA como alternativa terapêutica promissora, já que possui forte atividade inibitória na formação de biofilme contra cepas Gram-positivas, sendo a eficácia diretamente proporcional à concentração utilizada.

Dando continuidade aos nossos achados, foi avaliada a ação imunomoduladora do AA em células THP-1 diferenciadas em macrófagos, utilizando o AA na mesma concentração inibitória obtida nos ensaios microbiológicos.

Inicialmente, observamos a viabilidade dos macrófagos após incubação com AA, para observar um possível efeito citotóxico do mesmo. Interessantemente, a mesma concentração de AA que foi antibacteriana nos ensaios microbiológicos não exerceu ação citotóxica sobre macrófagos, indicando um efeito seletivo.

O TLR-2 é um dos receptores celulares capazes de detectar a presença do ácido teicoico da parede celular de bactérias Gram-positivas (WERTS, 2010; MILLER et al., 2019). Avaliando a ação do AA sobre TLR-2, não houve alterações nem na porcentagem e nem na MIF, sugerindo que o AA não afetou a possibilidade de reconhecimento bacteriano por este receptor, o que não descarta a possibilidade de sua ação em outros receptores de superfície celular que não foram avaliados neste trabalho. Ademais, outros receptores de superfície celular também podem reconhecer PAMPs de bactérias Gram-positivas.

Para compreender o possível efeito imunomodulador do AA, foi avaliada a produção de eicosanoides e citocinas. No tocante aos eicosanoides, o LPS induziu

aumento substancial na produção de ambos os mediadores inflamatórios, conforme esperado. Por outro lado, o AA reduziu a concentração de LTB₄, sugerindo efeito anti-inflamatório, possivelmente através de suas propriedades antioxidantes e imunomoduladoras. Entretanto, um estudo demonstrou que a inibição da produção de PGE₂ está associada a danos a órgãos em quadros de sepse por infecção por *S. epidermidis* (YANG et al., 2020). Esses resultados destacam a importância dos mediadores inflamatórios na resposta inflamatória dependendo do contexto analisado e sugerem que o AA pode ser útil na modulação da inflamação, enquanto não causa os efeitos colaterais decorrentes da inibição da produção de PGE₂, embora sua eficácia total ainda necessite de investigações adicionais.

Os resultados referentes à produção de citocinas demonstraram que, em condições basais, o AA não afetou as mesmas, somente inibindo a produção de IL-10. Quando o AA foi adicionado às células tratadas com DEX, a produção de IL-6 foi inibida e a de IL-10 ainda mais. De acordo com Oliveira et al. (2016), a mesma amostra de GEO não exerceu efeito na produção de TNF- α e IL-6 por monócitos humanos em condições basais, porém exerceu atividade anti-inflamatória em células tratadas LPS. Um estudo realizado por Meng et al. (2015) avaliou o efeito de DEX em combinação com outro agente anti-inflamatório (SB203580), inibindo a secreção de TNF- α e IL-10 por macrófagos.

A sepse é uma das principais causas de morte entre pacientes hospitalizados, caracterizando-se por uma resposta inflamatória sistêmica desregulada, que pode incluir a tempestade de citocinas, podendo levar a falência de múltiplos órgãos. Entre as principais bactérias responsáveis pela sepse nosocomial, destaca-se *S. epidermidis*. Nesse contexto, seria interessante explorar o uso de produtos naturais que não estimulassem uma resposta inflamatória exacerbada, propiciando abordagem terapêutica mais controlada e eficaz no tratamento de infecções associadas à sepse (QIN et al., 2017; YANG et al., 2020). Nossos dados indicam que, além de suas propriedades antimicrobianas, o AA pode ter um papel importante na modulação da resposta imune, possivelmente por afetar vias inflamatórias reguladas por DEX, apresentando potencial terapêutico na modulação da resposta imune/inflamatória no contexto de imunossupressão.

Os macrófagos são células importantes na defesa contra infecções bacterianas,

principalmente através da fagocitose e da regulação da resposta imune, no entanto, muitos patógenos desenvolvem mecanismos de evasão do sistema imunológico, tornando essencial o ajuste dessa atividade com tratamentos específicos para otimizar a resposta imunológica sem causar danos aos pacientes. Em condições basais, o AA modulou positivamente a atividade bactericida de macrófagos contra *S. epidermidis*. O LPS estimulou a atividade bactericida na ordem de 90,4% assim como o AA (95,5%). Estes resultados indicam que o AA possui o potencial de ativar os macrófagos, que são células envolvidas na resposta imune inata do hospedeiro e residentes no tecido cutâneo, o que é interessante tendo em vista as infecções de pele causadas por este microrganismo.

Sob condições de imunossupressão induzida por DEX, a capacidade dos macrófagos em eliminar *S. epidermidis* foi reduzida, havendo grande variabilidade de resposta e elevado desvio-padrão. No entanto, a adição de AA manteve a capacidade bactericida elevada (88,1%). Outro estudo demonstrou a capacidade do AA em potencializar a atividade bactericida de outra célula fagocítica, o neutrófilo, sobre cepas USA300 MRSA, *Streptococcus* do grupo A e *Escherichia coli* (HOLLANDS et al., 2016). Estes achados sugerem que o AA pode restaurar os efeitos imunossupressores da DEX, preservando a função bactericida dos fagócitos, fornecendo *insights* importantes para a potencial utilização desta molécula no combate a infecções bacterianas.

Tomados em conjunto, nossos achados demonstraram inicialmente a ausência de efeito da GEO no modelo estudado. Entretanto, os resultados apontaram a capacidade antibacteriana e imunomoduladora do AA, o que merece novas investigações para ampliar o conhecimento sobre o potencial biológico deste ácido. Também seria interessante avaliar as ações farmacológicas do mesmo *in vivo*, utilizando animais de experimentação, bem como em ensaios clínicos, para comprovar sua eficiência, associado ou não às terapias convencionais. Diante do exposto, verifica-se a importância de estudar as propriedades biológicas de produtos naturais e seus constituintes, não só para fins acadêmicos, mas também para conhecer seu potencial pelos consumidores e indivíduos adeptos a uma dieta saudável.

6. CONCLUSÕES

A GEO não apresentou ação antibacteriana neste modelo.

O AA demonstra ação antibacteriana direta contra *S. epidermidis*, inibindo o crescimento bacteriano e a formação de biofilmes.

Embora não tenha alterado a expressão de TLR-2, o AA modulou a produção de eicosanoides e citocinas, e exerceu ação indireta contra a bactéria, aumentando a atividade bactericida de macrófagos suprimidos ou não.

Esses resultados sugerem que o AA tem potencial terapêutico em infecções relacionadas à sepse e imunossupressão, além de ser uma alternativa promissora no combate à resistência antimicrobiana.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, B. V. B. et al. Polifenóis de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith coletado no Cerrado maranhense. *Revista Ciências em Saúde*. v. 8, n. 1, p. 18–24, 2006.
- ACHEK, A.; YESUDHAS, D.; CHOI, S. Toll-like receptors: Promising therapeutic targets for inflammatory diseases. *Archives*. v. 39, p. 1032–1049, 2016.
- AGUIRRE, L. et al. Antimicrobial resistance profile and prevalence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), AmpC beta-lactamases and colistin resistance (*mcr*) genes in *Escherichia coli* from swine between 1999 and 2018. *Porcine Health Management*. v. 6, n. 8, p. 1-6, 2020.
- ALBANO, M. et al. Antibacterial and anti-biofilm activities of cinnamaldehyde against *S. epidermidis*. *Microbial Pathogenesis*. v. 126, p. 231-238, 2019.
- ANTONIO, G. D.; TESSER, C. D.; MORETTI-PIRES, R. O. Fitoterapia na Atenção Primária à Saúde. *Revista de Saúde Pública*. v. 48, n. 3, p. 541-553, 2014.
- ARAÚJO, M. J. A. M. et al. The chemical composition and pharmacological activities of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in Northeast Brazil. *Journal of Molecular Pathophysiology*. v. 4, n. 1, p. 12–20, 2015.
- ASAI, N. et al. Clinical characteristics and relevance of coagulase-negative Staphylococci other than *S. epidermidis* by positive blood culture. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. v. 54, n. 4, p. 632-638, 2021.
- ATRI, C.; GUERFALI, F. Z.; LAOUINI, D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. *International Journal Molecular Sciences*. v. 19, n. 6, p. 1-15, 2018.
- BARTH, O. M. Palynological analysis of geopropolis samples obtained from six species of Meliponinae in the Campus of the Universidade de Ribeirão Preto, USP, Brazil. *Apiacta*. v. 41, p. 71–85, 2006.
- BARTOLOMEU, A. R. et al. Combinatorial effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith with anticancer drugs against human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v. 81, p. 48-55, 2016.
- BJARNSHOLT, T. et al. Applying insights from biofilm biology to drug development — can a new approach be developed? *Nature*. v. 12, n. 10, p. 791-808, 2013.
- BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*. v. 529, n. 7586, p. 336-343, 2016.
- BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 6, n. 8, p. a025247, 2016.
- CHANPUT, W. et al. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*. v. 23, n. 1, p. 37–45, 2014.
- CHASSIN, C. et al. TLR4- and TLR2-mediated B cell responses control the clearance of the bacterial pathogen, *Leptospira interrogans*. *The Journal of Immunology*. v. 183, n. 4, p. 2669-2677, 2009.
- CHOI, J. H. et al. Inhibitor κ B and Nuclear Factor κ B in Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor Antagonism of Dexamethasone Suppression of the Macrophage Response to *Aspergillus fumigatus* Conidia. *The Journal of Infectious Diseases*. v. 193, n. 7, p. 1023-1028, 2006.
- CINEGAGLIA, N. C. et al. Cytotoxic action of Brazilian propolis in vitro on canine osteosarcoma cells. *Phytotherapy Research*. v. 27, n. 9, p. 1277-1281, 2013.
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 33rd ed.; CLSI Supplement M100, 2023.
- COOPER, M. A.; SHLAES, D. Fix the antibiotics pipeline. *Nature*. v. 472, n. 32, 2011.
- CUNHA, M. G. et al. Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. v. 13, n. 23, p.1-9, 2013.
- DAS, U. N. Infection, Inflammation, and Immunity in Sepsis. *Biomolecules*. v. 13, n. 19, p. 1-15, 2023
- DE OLIVEIRA, A. C.; DE PAULA, A. O.; ROCHA, R. F. Costs of antimicrobial treatment in patients

- with infection. *Avances en Enfermeria*. v. 33, n. 3, p. 351-361, 2015.
- DUAILIBE, S. A. C.; GONÇALVES, A. G.; AHID, F. J. M. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts in vivo. *Journal of Applied Oral Science*. v. 15, n. 5, p. 420–423, 2007.
- DUBOIS, J., DUBOIS, M. Levonadifloxacin (WCK 771) exerts potent intracellular activity against *Staphylococcus aureus* in THP-1 monocytes at clinically relevant concentrations. *Journal of Medical Microbiology*, v. 68, n. 12, p. 1716-1722, 2019.
- DUTRA, R. P. et al. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 62, n. 12, p. 2549-2557, 2014.
- EHRCHEN, J. M. et al. More Than Suppression: Glucocorticoid Action on Monocytes and Macrophages. *Frontiers in Immunology*. v. 10, p. 1-16, 2019
- FLEMMING, H. C. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*. v. 14, n. 9, p. 563-575, 2016.
- FREIRES, A. et al. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: A systematic review. *Molecules*. v. 20, n. 4, p. 7329-7358, 2015.
- FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*. v. 10, n. 4, p. 369-378, 2017.
- GENG, J. et al. Kinases Mst1 and Mst2 positively regulate phagocytic induction of reactive oxygen species and bactericidal activity. *Nature Immunology*. v. 16, n. 11, p. 1142–1152, 2015.
- GOMES C. E. B. et al. Clinical effect of a mouthwash containing *Anacardium occidentale* Linn. On plaque and gingivitis control: a randomized controlled trial. *Indian Journal Dental Research*. v. 27, n. 4, p. 364–369, 2016.
- GOODWINE, J. et al. Pyruvate-depleting conditions induce biofilm dispersion and enhance the efficacy of antibiotics in killing biofilms in vitro and in vivo. *Sci Rep*. v. 9, p.1–16, 2019.
- GREEN I. R. et al. Molecular design of anti-MRSA agents based on the anacardic acid scaffold. *Bioorganical Medical Chemistry*. v. 15, n. 18, p. 6236–6241, 2007.
- HAMAD, F.; MUBOFU, E. Potential biological applications of bio-based anacardic acids and their derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 4, p. 8569–8590, 2015.
- HERNANDES, R. T. et al. Dissection of the role of pili and type 2 and 3 secretion systems in adherence and biofilm formation of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strain. *Infection and Immunity*. v. 81, n. 10, p. 3793-3802, 2013.
- HOIBY, N. et al. The clinical impact of bacterial biofilm. *International Journal of Oral Science*. v. 3, n. 2, p. 55-65, 2011.
- HOLLANDS, A. et al. Natural product anacardic acid from cashew nut shells stimulates neutrophil extracellular TRAP production and bactericidal activity. *Journal of Biological Chemistry*. v. 291, n. 27, p. 13964-13973, 2016.
- HONORIO, M. S. et al. Anti-inflammatory action of geopropolis produced by stingless bees on human peripheral blood mononuclear cells. *Human Immunology*, v. 85, n. 4, 2024.
- HUME, D. A.; IRVINE, K. M.; PRIDANS, C. The mononuclear phagocyte system: the relationship between monocytes and macrophages. *Trends in Immunology*. v. 40, n. 2, p. 98–112, 2019.
- KLEINSCHMIDT, S. et al. *Staphylococcus epidermidis* as a cause of bacteremia. *Future Microbiology*. v. 10, n. 11, p. 1859-1879, 2015.
- LEE, W. S. et al. Cnidilide, an alkylphthalide isolated from the roots of *Cnidium officinale*, suppresses LPS-induced NO, PGE2, IL-1 β , IL-6 and TNF- α production by AP-1 and NF- κ B inactivation in RAW 264.7 macrophages. *International Immunopharmacology*. v. 40, p. 146–155, 2016.
- LIBÉRIO, S. A. et al. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complementary Medicine and Therapies* . v. 11, n. 108, p. 1-10, 2011.
- MAMIDYALA S.K. et al. Efficient synthesis of anacardic acid analogues and their antibacterial activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 23, n. 6, p. 1667-1670, 2013.
- MENG, A. et al. Additive Suppression of LPS-Induced IL-10 and TNF- α by Pre-treatment of

- Dexamethasone and SB203580 in a Murine Alveolar Macrophage Cell Line (MH-S). *Inflammation*. v. 38, n. 3, p. 1260-1266, 2015.
- MÉRIC, G. et al. Ecological Overlap and Horizontal Gene Transfer in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Genome Biology and Evolution*. v. 7, n. 5, p. 1313-1328, 2015.
- MILLER, F.C. et al. Targets of Immunomodulation in Bacterial Endophthalmitis. *Progress in Retinal and Eye Research*. v. 73, 2019
- MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v. 46, n. 10, p. 4769-4807, 2011.
- MORAIS, S. M. et al. Anacardic acid constituents from cashew nut shell liquid: NMR characterization and the effect of unsaturation on its biological activities. *Pharmaceuticals* v. 10, n. 1, p. 1–10, 2017.
- MORAIS, T. C. et al. Protective effect of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale*) on ethanol-induced gastric damage in mice. *Chemico-Biological Interactions*. v. 183, n. 1, p. 264-269, 2010.
- MORRISSEY, I. et al. A review of ten years of the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) from 2002 to 2011. *Pharmaceuticals (Basel)*. v. 6, n. 11, p. 1335–1346, 2013.
- NATHAN, C.; CUNNINGHAM-BUSSEL, A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nature Reviews Immunology*. v. 13, n. 5, p. 349-361, 2013.
- NEU, H. C. β -lactamases, β -lactamase inhibitors, and skin and skin-structure infections. *Journal of the American Academy of Dermatology*. v. 22, n. 5, p. 896–904, 1990.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*. v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.
- NIKITINA, E. et al. Monocytes and macrophages as viral targets and reservoirs. *International Journal of Molecular Sciences*. v. 19, n. 9, p. 1-25, 2018.
- OBEROI, S. S. et al. Antibiotics in dental practice: How justified are we. *International Dental Journal*. v. 65, n. 1, p. 4-10, 2015.
- ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother*. v. 52, n. 1, p. 1, 2003.
- OLIVEIRA, L. P. G. et al. Immunomodulatory / inflammatory effects of geopropolis produced by *Melipona fasciculata* Smith in combination with doxorubicin on THP-1 cells. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. v. 68, n. 12, p.1551- 1558, 2016.
- OLIVEIRA, L. P. G. et al. A new chemotherapeutic approach using doxorubicin simultaneously with geopropolis favoring monocyte functions. *Life Sciences*. v. 217, n. 15, p. 81-90, 2019
- O'NEILL, J. *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations*. London: Review on Antimicrobial Resistance. 2014.
- OUWEHAND, A.C. et al. *Lactobacillus acidophilus* supplementation in human subjects and their resistance to enterotoxigenic Escherichia coli infection. *British Journal of Nutrition*. v. 111, n. 3, p. 465-473. 2014.
- PAWLIK, A. et. al. Association of cytokine gene polymorphisms and the release of cytokines from peripheral blood mononuclear cells treated with methotrexate and dexamethasone. *International Immunopharmacology*. v. 6, n. 3, p. 351-357, 2006.
- PEREIRA, V. C.; CUNHA, M. L. R. S. Coagulase-negative staphylococci strains resistant to oxacillin isolated from neonatal blood cultures. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 7, p. 939-942, 2013.
- PEREIRA, V. C. et al. Expression of superantigens and the agr system in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbial Pathogenesis*. v. 115, p. 19-24, 2018.
- PILLAI, S. K; MOELLERING, R. C.; ELIOPOULOS, G. M. Antimicrobial combinations. In: *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 5th ed. Baltimore: Lippincott Williams & amp; Wilkins, p. 365–440, 2005.
- PINHEIRO, L. et al. Reduced susceptibility to vancomycin and biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 109, n. 7, p. 871-878, 2014
- PINHEIRO, L. et al. Susceptibility Profile of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* Isolated from Blood Cultures to Vancomycin and Novel Antimicrobial Drugs over

- a Period of 12 Years. *Microbial Drug Resistance*. v. 22, n. 4, p. 283-293, 2016.
- QIN, L. et al. Toxin Mediates Sepsis Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus epidermidis*. *PLoS Pathogens*. v. 13, n. 2, p. 1-16, 2017.
- QIN, Z. The use of THP-1 cells as a model for mimicking the function and regulation of monocytes and macrophages in the vasculature. *Atherosclerosis*. v. 221, n. 1, p. 2–11, 2012.
- SAJEEVAN, S. E. et al. Impregnation of catheters with anacardic acid from cashew nut shell prevents *Staphylococcus aureus* biofilm development. *Journal of Applied Microbiology*. v. 125, n. 5, p. 1227-1568, 2018.
- SCHWARZ, S. et al. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, p. 601-604, 2010.
- SEVERN, M. M.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus epidermidis* and its dual lifestyle in skin health and infection. *Nature Reviews Microbiology*. v. 21, n. 2, p. 97-111, 2023.
- SOUZA, N. O. et al, Physicochemical and microbiological assessment of a dental adhesive doped with cashew nut shell liquid. *Odontology*. v. 110, n. 3, p. 434-443, 2022.
- STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. v. 115, n. 8, p. 891–899, 2007.
- TANABE, R. H. et al. Characterization of uropathogenic *Escherichia coli* reveals hybrid isolates of uropathogenic and diarrheagenic UPEC/DEC) *E. coli*. *Microorganisms*. v. 10, p. 1-15, 2022.
- TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*. v. 17, n. 1, p. 1–14, 2005.
- TREVISAN M.T. et. al. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. *Food and Chemical Toxicology*. v. 44, n. 2, p. 188–197, 2006.
- TSUGE, K et al. Molecular mechanisms underlying prostaglandin E2-exacerbated inflammation and immune diseases. *International Immunology*. v. 31, n. 9, p. 597-606, 2019
- VENTURIERI, G. C. et al. Avaliação da introdução da criação racional de *Melipona fasciculata* (Apidae, Meliponinae), entre os agricultores familiares de Bragança, PA, Brasil. *Biotropica*. v. 3, n. 2, p. 1–7, 2003.
- VICENT, W. J. B. et al. Neutrophil derived LTB4 induces macrophage aggregation in response to encapsulated *Streptococcus iniae* infection. *PLoS One*. v. 12, n. 6, 2017.
- WALKER, J. et al. Lipoxin a4 increases survival by decreasing systemic inflammation and bacterial load in sepsis. *Shock*. v. 36, n. 4, p. 410 – 416, 2011.
- WERTS, C. Leptospirosis: a Toll road from B lymphocytes. *Chang Gung Medical*. v. 33, n. 6, p. 591-601, 2010.
- WEST, A. P. et al. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature*. v. 472, n. 7344, p. 476–480, 2011.
- YANG, M. et al. Role of Interleukin-33 in *Staphylococcus epidermidis*-Induced Septicemia. *Frontiers in Immunology*. v. 11, p. 1-12, 2020.
- YU, H. et al. *Escherichia coli* biofilm: architecture, regulation, and eradication strategies. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 105, n. 3, p. 899-913, 2021.