



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS – SBFIS



ISRAEL SOUZA RIBEIRO

**PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA E TERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA: CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO *IN VIVO*
E DESENVOLVIMENTO DE MICROEMULSÃO PARA O
TRATAMENTO DE INFECÇÕES INTRADÉRMICAS CAUSADAS
POR *Staphylococcus aureus***

Vitória da Conquista, BA
2024

ISRAEL SOUZA RIBEIRO

**PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA E TERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA: CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO *IN VIVO*
E DESENVOLVIMENTO DE MICROEMULSÃO PARA O
TRATAMENTO DE INFECÇÕES INTRADÉRMICAS CAUSADAS
POR *Staphylococcus aureus***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas/Sociedade Brasileira de Fisiologia, Universidade Federal da Bahia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Profº. Drº. Robson Amaro Augusto da Silva
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Co-orientador: Profº. Drº. Juliano Geraldo Amaral
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista, BA
2024

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – SIBI/UFBA

R484

Ribeiro, Israel Souza.

Própolis verde brasileira e terapia fotodinâmica antimicrobiana: caracterização, avaliação in vivo e desenvolvimento de microemulsão para o tratamento de infecções intradérmicas causadas por *Staphylococcus aureus*. / Israel Souza Ribeiro. -- Vitória da Conquista, BA: UFBA, 2024. 93 f.; il.

Orientador: Prof^o. Dr^o. Robson Amaro Augusto da Silva.

Co-orientador: Prof^o. Dr^o. Juliano Geraldo Amaral

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas/Sociedade Brasileira de Fisiologia) - Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, 2024.

1. Própolis verde brasileira. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Terapia fotodinâmica antimicrobiana. I. Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Silva, Robson Amaro Augusto da. III. Amaral, Juliano Geraldo. IV. Título.

CDU: 616.9

Elaborado por Cinthia Gabrielli Gil CRB5-001631/0

ISRAEL SOUZA RIBEIRO

**PRÓPOLIS VERDE BRASILEIRA E TERAPIA FOTODINÂMICA
ANTIMICROBIANA: CARACTERIZAÇÃO, AVALIAÇÃO IN VIVO E
DESENVOLVIMENTO DE MICROEMULSÃO PARA O TRATAMENTO DE
INFECÇÕES INTRADÉRMICAS CAUSADAS POR *Staphylococcus aureus***

Esta tese foi julgada adequada à obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 22 de março de 2024.

Documento assinado digitalmente
gov.br ROBSON AMARO AUGUSTO DA SILVA
Data: 11/04/2024 15:04:10-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Robson Amaro Augusto da Silva (Orientador) Universidade
Federal da Bahia



Documento assinado digitalmente
gov.br AMELIA CRISTINA MENDES DE MAGALHAES GUSMÃO
Data: 10/04/2024 09:13:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Amelia Cristina Mendes de Magalhaes Gusmão (Examinadora)
Universidade Federal da Bahia

Documento assinado digitalmente
gov.br LUCAS MIRANDA MARQUES
Data: 10/04/2024 11:30:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Lucas Miranda Marques (Examinador) Universidade
Federal da Bahia

Documento assinado digitalmente
gov.br LUCIANO PEREIRA ROSA
Data: 10/04/2024 14:44:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Luciano Pereira Rosa (Examinador) Universidade Federal
da Bahia



Prof^a. Dr^a. Gisele Lopes de Oliveira (Examinadora)
Universidade Federal do Sul da Bahia

À minha mãe, Maria de Lurdes (*in memoriam*), por ter sido a minha maior incentivadora na busca pelo conhecimento.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me sustentar durante o processo, por me livrar diversas vezes de acidentes nas viagens para estudar e por me guiar em todos os meus passos.

À minha mãe, **Maria de Lurdes**, por todo o amor e cuidado dedicados a mim, pelos princípios e valores que me ensinou e por sempre me incentivar a estudar e buscar conhecimento.

Às minhas irmãs, **Aliny** e **Jéssica**, por me apoiarem durante esse processo, por me receberem em suas casas nos períodos de estudo e por serem grandes exemplos para mim.

À minha esposa, **Elaine**, por ser minha parceira de vida e por se dedicar com tanto amor aos meus sonhos e projetos.

Ao **Prof. Dr. Robson Amaro Augusto da Silva** e aos colegas do **Laboratório 106**, por me receberem em 2012 como aluno de iniciação científica e se dedicarem à minha formação. Sou grato pelas vivências, pelas amizades, pelas dificuldades que nos fizeram crescer e amadurecer e por fazer parte de uma equipe tão relevante. Tenho muito orgulho de fazer parte da história do Laboratório 106 do Instituto Multidisciplinar em Saúde da UFBA.

Ao **Prof. Dr. Juliano Geraldo Amaral** e a toda a sua equipe do **Laboratório 109**, por me aceitarem como aluno durante esse período e me ensinarem, com paciência e dedicação, assuntos e práticas em áreas que eu não tinha experiência.

À **Universidade Federal do Sul da Bahia** por todo o incentivo à qualificação e valorização dos conhecimentos por mim obtidos durante o doutorado. Tenho muito orgulho de fazer parte de uma instituição tão relevante, inclusiva e necessária como a UFSB.

Ao **Instituto Multidisciplinar em Saúde da UFBA** e ao **Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas** pelo conhecimento fornecido, pelas experiências vividas e pelas amizades construídas ao longo de anos em que pude fazer parte dessa nobre instituição.

À **Universidade de São Paulo (USP)** pelo apoio nas análises de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a técnicas de detecção de arranjo de diodos e espectrometria de massas em tandem.

A todos os que um dia cruzaram o meu caminho e com gentileza me acolheram, muito obrigado.

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”

1 Coríntios 13:2.

RESUMO

RIBEIRO, Israel Souza. Própolis verde brasileira e terapia fotodinâmica antimicrobiana: caracterização, avaliação *in vivo* e desenvolvimento de microemulsão para o tratamento de infecções intradérmicas causadas por *Staphylococcus aureus*. Tese de Doutorado – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2024.

Introdução: Infecções de pele e tecidos moles são um importante problema de saúde pública mundial. *Staphylococcus aureus* é a principal causa desse tipo de infecção, de modo que o desenvolvimento de resistência é um dos principais fatores ligados à sua propagação e aos desafios no seu tratamento. Nesse contexto, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFA) com produtos naturais tem se mostrado uma boa alternativa no combate às infecções causadas por microrganismos resistentes aos antibióticos, pois agregam benefícios inerentes a esses compostos aos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio induzidas pela TFA. A própolis verde brasileira possui efeitos conhecidos como agente antimicrobiano e imunomodulador. Contudo, não se sabe ao certo se tais atividades seriam mantidas se utilizada no contexto da TFA. **Objetivos:** O objetivo do presente estudo foi caracterizar o perfil fitoquímico da própolis verde brasileira e sua atividade como fotossensibilizador para TFA, avaliar os seus efeitos antimicrobianos e imunomoduladores *in vivo* e desenvolver microemulsão para o tratamento de infecções intradérmicas causadas por *S. aureus* resistentes à antibióticos. **Materiais e Métodos:** Realizou-se espectrometria de absorção molecular UV-Vis para avaliar os comprimentos de onda com potencial para ativar a própolis verde. Posteriormente, cepas de referência de *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (MRSA ATCC 43300) e *Staphylococcus aureus* Intermediário à Vancomicina (VISA ATCC 700699) foram expostas a concentrações variadas de própolis verde: 1µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL e estimuladas por luz LED azul, verde ou vermelha. Em seguida, avaliou-se o potencial zeta das bactérias expostas à própolis verde brasileira a fim de caracterizar um possível local de ação da própolis. Logo após, foi realizada cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos acoplado à espectrometria de massas em tandem, juntamente com análise clássica de redes moleculares, para identificar potenciais moléculas bioativas com atividade fotodinâmica. Finalmente, foram realizadas análises de citotoxicidade em eritrócitos e em células nucleadas. Após essa etapa, avaliou-se os efeitos antimicrobianos e

imunomoduladores da utilização da própolis verde brasileira como fotossensibilizador contra *S. aureus in vivo*, em modelo de infecção intradérmica em camundongos. Por fim, desenvolveu-se microemulsão como um sistema de entrega transdérmica da própolis verde brasileira, caracterizando-se o sistema microemulsionado e realizando os testes de estabilidade preliminar. **Resultados:** Observou-se que a própolis verde brasileira exibe um pico de absorção pronunciado e fotorresponsividade aumentada quando exposta à luz azul na faixa de 400nm e 450nm. Essa característica revela atividade fotodinâmica significativa contra MRSA e VISA em concentrações a partir de 5 µg/mL. Além disso, a própolis compreende compostos como a curcumina e outros flavonoides provenientes da flavona, que possuem potencial para atividade fotodinâmica e outras funções antimicrobianas. Os testes com potencial zeta não apresentaram diferenças significativas quando as bactérias foram expostas à própolis verde brasileira, o que sugere potencial internalização do composto pelas bactérias. Além disso, a própolis verde brasileira não apresentou toxicidade em eritrócitos e células nucleadas. *In vivo*, a TFA com própolis verde brasileira reduziu a carga bacteriana no local da infecção, inibiu a perda de peso decorrente da infecção e modulou a resposta inflamatória através de maior recrutamento de células neutrófilos para o tecido infectado. Além disso, a TFA induziu aumento das citocinas IL-17A e IL-12p70 no linfonodo retromaxilar drenante. Por fim, a microemulsão com própolis verde brasileira apresentou tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta promissores, bem como boa estabilidade nos testes preliminares, mantendo-se a atividade fotodinâmica antimicrobiana induzida por luz azul. **Conclusões:** A própolis verde brasileira apresenta atividade fotodinâmica, quando estimulada por luz LED azul, capaz de induzir a morte de diferentes cepas de *S. aureus*, reduzir a carga bacteriana e modular a resposta inflamatória em modelo murino de infecção intradérmica. Além disso, uma microemulsão com a própolis verde brasileira mostra-se promissora, uma vez que apresenta características físico-químicas de interesse e estabilidade viabilizando o desenvolvimento de protocolos que não demandem a injeção local do fotossensibilizador, não gerando dor e incômodo, o que pode diminuir o abandono terapêutico e aumentar a adesão ao tratamento.

Palavras-chave: Própolis verde Brasileira; *Staphylococcus aureus*; Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana; Microemulsão.

ABSTRACT

RIBEIRO, Israel Souza. Brazilian green propolis and antimicrobial photodynamic therapy: characterization, *in vivo* evaluation and development of microemulsion for the treatment of intradermal infections caused by *Staphylococcus aureus*. PhD Thesis – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2024.

Introduction: Skin and soft tissue infections are an important global public health problem. *Staphylococcus aureus* is the main cause of this type of infection, so the development of resistance is one of the main factors linked to its spread and the challenges in its treatment. In this context, antimicrobial photodynamic therapy (TFA) with natural products has proven to be a good alternative in combating infections caused by antibiotic-resistant microorganisms, as they add benefits inherent to these compounds to the damage caused by reactive oxygen species induced by TFA. Brazilian green propolis has known effects as an antimicrobial and immunomodulatory agent. However, it is not known for certain whether such activities would be maintained if used in the context of TFA.

Objective: The objective of the present study was to characterize the phytochemical profile of Brazilian green propolis and its activity as a photosensitizer for TFA, evaluate its antimicrobial and immunomodulatory effects *in vivo* and develop microemulsion for the treatment of intradermal infections caused by antibiotic-resistant *S. aureus*.

Materials and Methods: UV-Vis molecular absorption spectrometry was performed to evaluate the wavelengths with the potential to activate green propolis. Subsequently, reference strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA ATCC 43300) and Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA ATCC 700699) were exposed to varying concentrations of green propolis: 1µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL, 50µg/mL mL and 100µg/mL and stimulated by blue, green or red LED light. Next, the zeta potential of bacteria exposed to Brazilian green propolis was evaluated in order to characterize a possible site of propolis action. Soon after, high-performance liquid chromatography was performed with a diode array detector coupled to tandem mass spectrometry, together with classical analysis of molecular networks, to identify potential bioactive molecules with photodynamic activity. Finally, cytotoxicity analyzes were performed on erythrocytes and nucleated cells. After this step, the antimicrobial and immunomodulatory effects of using Brazilian green propolis as a photosensitizer against *S. aureus in vivo* were evaluated, in an intradermal infection model in mice. Finally, a

microemulsion was developed as a transdermal delivery system for Brazilian green propolis, characterizing the microemulsified system and carrying out preliminary stability tests. **Results:** Brazilian green propolis was observed to exhibit a pronounced absorption peak and increased photoresponsiveness when exposed to blue light in the range of 400nm and 450nm. This characteristic reveals significant photodynamic activity against MRSA and VISA at concentrations from 5 µg/mL. Furthermore, propolis comprises compounds such as curcumin and other flavonoids from flavones, which have the potential for photodynamic activity and other antimicrobial functions. Tests with zeta potential did not show significant differences when the bacteria were exposed to Brazilian green propolis, which suggests potential internalization of the compound by the bacteria. Furthermore, Brazilian green propolis did not present toxicity to erythrocytes and nucleated cells. *In vivo*, TFA with Brazilian green propolis reduced the bacterial load at the site of infection, inhibited weight loss resulting from infection and modulated the inflammatory response through greater recruitment of neutrophil cells to the infected tissue. Furthermore, TFA induced an increase in the cytokines IL-17A and IL-12p70 in the draining retromaxillary lymph node. Finally, the microemulsion with Brazilian green propolis showed promising particle size, polydispersity index and zeta potential, as well as good stability in preliminary tests, maintaining the antimicrobial photodynamic activity induced by blue light. **Conclusions:** Brazilian green propolis presents photodynamic activity, when stimulated by blue LED light, capable of inducing the death of different strains of *S. aureus*, reducing bacterial load and modulating the inflammatory response in a murine model of intradermal infection. Furthermore, a microemulsion with Brazilian green propolis shows promise, as it presents interesting physical-chemical characteristics and stability, enabling the development of protocols that do not require local injection of the photosensitizer, without generating pain and discomfort, which can reduce therapeutic abandonment and increase adherence to treatment.

Keywords: Brazilian green propolis; *Staphylococcus aureus*; Antimicrobial photodynamic therapy; Immunomodulation.

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbância
aPDT	Antimicrobial photodynamic therapy
BCR	Receptor de antígeno de célula B
BHI	Infusão cérebro-coração
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CHIPS	Proteína inibidora de quimiotaxia de <i>S. aureus</i>
dL	Decilitro
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab	<i>Fragment antigen binding</i>
FPRL1	Receptor de formil-peptídeo similar 1
FS	Fotossensibilizador
HUVEC	Células endoteliais humanas
IFN- γ	Interferon <i>gamma</i>
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-10	Interleucina 10
IL-17A	Interleucina 17A
IL-1 β	Interleucina 1 beta
J/cm ²	Joules por centímetro quadrado.

LC-DAD-MS/MS	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos acoplado à espectrometria de massas em tandem
LED	Diodos emissores de luz
m ²	Metro quadrado
Mg	Miligrama
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitro
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
mW/cm ²	milliwatts por centímetro quadrado
°C	Graus Celsius
<i>Spa</i>	Proteína estafilocócica A
TFA	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
UFC	Unidades formadoras de colônias
VISA	Vancomycin-Intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
=	Igual
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
μL	Microlitro
pg	Picograma
ng	Nanograma
nm	Nanômetros

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental das análises em modelo animal de infecção intradérmica. Na hora 0, os animais foram infectados nas duas orelhas com $1,5 \times 10^8$ UFC de MRSA. Após 24 horas da infecção, os animais foram expostos ao veículo de preparo da própolis verde, à $10 \mu\text{g}$ de própolis verde, à luz LED azul ou ao protocolo de TFA ($10 \mu\text{g}$ de própolis verde + luz LED azul). 48 horas após a infecção, os animais foram eutanasiados coletou-se as orelhas, o linfonodo retromaxilar drenante e o sangue. TFA: terapia fotodinâmica antimicrobiana. $n = 24$ (6 animais por grupo).

Figura 2. Análise da atividade fotodinâmica da própolis verde a partir do teste de absorção de luz. Foi analisada uma solução de própolis verde na concentração de $2.000 \mu\text{g/mL}$. Foi observado um pico de absorção na faixa de 400 nm a 450 nm e uma segunda banda de absorção, muito menos intensa, estava presente no espectro de 660 nm . Abs: absorbância; nm: nanômetros**25**

Figura 3. Avaliação da atividade fotodinâmica da própolis verde irradiada com luz LED azul contra MRSA (Log UFC/mL). Em uma placa de 24 poços, foi adicionado MRSA de forma que a concentração final em cada poço fosse de $1,5 \times 10^4$ UFC de MRSA em 1 mL de soro fisiológico e própolis verde em diferentes concentrações ($1 \mu\text{g/mL}$, $5 \mu\text{g/mL}$, $10 \mu\text{g/mL}$, $50 \mu\text{g/mL}$, $100 \mu\text{g/mL}$) ou seu veículo de diluição. Em seguida, a placa foi exposta a diferentes intensidades de luz LED azul por 5, 10 ou 15 minutos, conforme parâmetros apresentados na Tabela 1. (A): Luz LED azul de baixa intensidade (intensidade de energia 13 mW/cm^2); (B) Luz LED azul em intensidade intermediária (intensidade de energia 18 mW/cm^2); (C) Luz LED azul de alta intensidade (intensidade de energia 22 mW/cm^2). Diferenças estatísticas significativas entre os grupos são indicadas pelo símbolo “*”. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$. $n = 8$. MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; UFC: unidades formadoras de colônias; $\mu\text{g/mL}$: microgramas por mililitro. mW/cm^2 : miliwatts por centímetro quadrado**26**

Figura 4. Avaliação da atividade fotodinâmica da própolis verde irradiada com luz LED azul contra VISA (Log UFC/mL). Em uma placa de 24 poços, foi adicionado VISA para que a concentração final em cada poço fosse de $1,5 \times 10^4$ UFC de VISA em 1 mL de solução salina e própolis verde em diferentes concentrações ($1 \mu\text{g/mL}$, $5 \mu\text{g/mL}$, $10 \mu\text{g/mL}$, $50 \mu\text{g/mL}$ e $100 \mu\text{g/mL}$) ou seu veículo de diluição. Em seguida, a placa foi

exposta à luz LED azul em alta intensidade (intensidade energética 22 mW/cm²) por 15 minutos (fluência 19,8 J/cm²), conforme parâmetros apresentados na Tabela 1. Diferenças estatísticas significativas entre os grupos são indicadas pelo símbolo “***”. *: p < 0,05; **: p<0,01; ***: p < 0,001; ****: p<0,0001. n = 8. VISA: *Staphylococcus aureus* intermediário à vancomicina; UFC: unidades formadoras de colônias; µg/mL: microgramas por mililitro. mW/cm²: miliwatts por centímetro quadrado. J/cm²: Joules por centímetro quadrado27

Figura 5. Rede molecular da própolis verde brasileira usando dados de HPLC-ESI-MS/MS. (A) Rede molecular completa; (B) Compostos principais anotados. Os nós representam compostos. A similaridade estrutural entre compostos é indicada pelas conexões entre nós (arestas). (1-13) Anotação putativa usando reações de fragmentação em fase gasosa e redes moleculares. (*) A posição de esterificação não pode ser estabelecida29

Figura 6. Avaliação da citotoxicidade da própolis verde brasileira em células anucleadas e nucleadas. (A): Avaliação da toxicidade em eritrócitos. Eritrócitos obtidos de sangue caprino foram isolados, lavados e expostos ao soro fisiológico (soro fisiológico), ao veículo de diluição de própolis verde (soro fisiológico 95% e propilenoglicol 5%) e a diferentes concentrações de própolis verde (1 µg/mL a 100 µg/mL), com toxicidade celular determinada por espectrofotometria (n = 8). As diferenças entre o grupo solução salina e os demais grupos são indicadas pelo símbolo “***”. Abs.: Absorbância; *: p < 0,05. (B): Avaliação da toxicidade em células HUVEC. As células foram cultivadas e expostas ao meio utilizado para cultivo (controle), soro fisiológico, veículo de diluição de própolis verde (soro fisiológico 95% e propilenoglicol 5%) e diferentes concentrações de própolis verde (1 µg/mL a 100 µg/mL), com toxicidade celular determinada por espectrofotometria (n = 3). A partir dos parâmetros obtidos pelo grupo “controle”, foi determinado o percentual de alteração na viabilidade celular dos demais grupos quando comparado ao grupo “controle”. As diferenças entre o grupo controle e os demais grupos são indicadas pelo símbolo “***”. **: p<0,01; ***: p < 0,001; ****: p<0,000131

Figura 7. Avaliação dos efeitos sistêmicos da TFA com própolis verde brasileira. (A): Peso do animal desde o dia da infecção (hora 0) até a eutanásia (72 horas após a infecção). “***” indicam diferenças significativas entre os pesos dos animais do mesmo grupo ao longo do tempo. (B): Quantificação total de leucócitos no sangue dos animais

após eutanásia. (C): Quantificação diferencial de leucócitos no sangue de animais após eutanásia. (n = 4-6); *: p < 0,05; **: p < 0,0132

Figura 8. Avaliação dos efeitos da TFA na orelha. (A): Mensuração da lesão no dia do tratamento (24 horas após a infecção) e no dia da eutanásia (72 horas após a infecção). (B): Determinação da carga bacteriana na orelha por contagem de UFC. (C): Análise da peroxidação lipídica por TBARs. (D): Contagem total de leucócitos na orelha. (E): Contagem diferencial de neutrófilos na orelha. (F): Contagem diferencial de mononucleares na orelha. (G): Imagens histológicas representativas de cada grupo observadas com ampliação de 400x. n = 4-6. *: p < 0,05; **: p < 0,0134

Figura 9. Avaliação do efeito da TFA com própolis verde no linfonodo drenante. (A): Medição de citocinas. (B): Correlação entre citocinas expressas no linfonodo drenante. As correlações positivas são indicadas em azul e as correlações reversas são indicadas em vermelho. Tons de cores mais escuros indicam valores de *r* mais altos. O agrupamento de variáveis é baseado na análise de componentes principais usando o gráfico do pacote R *corrplot*. (C): Rede de interações bayesianas entre citocinas. As setas indicam causalidade e todas mostram o grau de força de inferência de uma variável em relação a outra. Os pacotes utilizados para construir as redes bayesianas foram *bnlearn* e *bnviewer*. n = 4-6; *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001; ****: p < 0,000136

Figura 10. Avaliação do efeito fotodinâmico antimicrobiano da microemulsão com própolis verde brasileira. Em uma placa de petri, MRSA foi plaqueado em concentração de $1,5 \times 10^4$ UFC. Logo após, foi feito um furo na placa e adicionado 100µL de microemulsão sem própolis verde (Vehicle) ou com própolis verde na dose de 10mg, fotoativada ou não. Discos de difusão contendo vancomicina fotoativada ou não foram utilizados como grupos de controle positivo. As diferenças entre o grupo própolis verde não fotoativada e fotoativada estão indicadas pelo símbolo “*”. *: p < 0,05. n = 6.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	21
2 REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.1 Infecção intradérmica: da formação de abscessos à dificuldade de tratamento	23
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> versus sistema imune: mecanismos de evasão da resposta imune adaptativa	26
2.4 <i>Staphylococcus aureus</i> x resistência à antibióticos: histórico e perspectiva	28
2.5 Própolis brasileira: das características gerais ao potencial terapêutico	30
2.6 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana: dos princípios à aplicabilidade	32
2.7 “<i>Drugs delivery</i>”: o potencial da microemulsão como sistema de administração de compostos ativos	33
3 JUSTIFICATIVA	35
4 OBJETIVOS	36
4.1 Objetivo geral	36
4.2 Objetivos específicos	37
4.2.1 <i>Avaliar a fotorresponsividade da própolis verde brasileira a diferentes cores de luz visível em diferentes doses de energia (J/cm²);</i>	<i>37</i>
4.2.2 <i>Padronizar o melhor protocolo de TFA com própolis verde Brasileira para a inativação de diferentes cepas de S. aureus;</i>	<i>37</i>
4.2.3 <i>Determinar o perfil fitoquímico da própolis verde brasileira extraída no território do sudoeste da Bahia.</i>	<i>37</i>
4.2.4 <i>Avaliar a citotoxicidade da própolis verde brasileira às células anucleadas e nucleadas.</i>	<i>37</i>
4.2.5 <i>Caracterizar os efeitos da TFA com própolis verde brasileira na pele e no linfonodo drenante de camundongos infectados com MRSA;</i>	<i>37</i>
4.2.6 <i>Caracterizar achados anatomopatológicos da orelha dos animais infectados com MRSA após aplicação da TFA;</i>	<i>37</i>
4.2.7 <i>Analisar a imunomodulação da TFA com própolis verde Brasileira em camundongos infectados intradermicamente com MRSA;</i>	<i>37</i>
4.2.8 <i>Avaliar a resposta hematológica de animais infectados com MRSA frente ao tratamento com TFA;</i>	<i>37</i>
4.2.9 <i>Desenvolver uma microemulsão contendo extrato de própolis verde brasileira para aplicação em TFA.</i>	<i>37</i>

5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
5.1 Aspectos gerais	37
5.1.1 <i>Obtenção e preparação da própolis verde Brasileira.....</i>	37
5.1.2 <i>Microrganismos.....</i>	38
5.1.3 <i>Determinação da carga bacteriana.....</i>	38
5.2 Análises <i>in vitro</i>	38
5.2.1 <i>Estimativa de absorção de luz da própolis verde.....</i>	38
5.2.2 <i>Fonte de luz LED.....</i>	38
5.2.3 <i>Desenho experimental: avaliação da responsividade da própolis verde a diferentes cores de luz LED</i>	39
5.2.4 <i>Teste do potencial Zeta.....</i>	40
5.2.5 <i>Análise de LC-DAD-MS/MS.....</i>	40
5.2.6 <i>Análise clássica de redes moleculares</i>	41
5.2.7 <i>Anotação de dados</i>	42
5.2.8 <i>Avaliação da citotoxicidade da própolis verde brasileira em eritrócitos.....</i>	42
5.2.9 <i>Avaliação da toxicidade da própolis verde brasileira em células nucleadas</i>	42
5.3 Análises <i>in vivo</i>	43
5.3.1 <i>Animais</i>	43
5.3.2 <i>Desenho experimental</i>	43
5.3.3 <i>Avaliação do peso corporal.....</i>	44
5.3.4 <i>Análises hematológicas</i>	44
5.3.5 <i>Medida da lesão na orelha.....</i>	45
5.3.6 <i>Obtenção e processamento das orelhas</i>	45
5.3.7 <i>Obtenção do linfonodo drenante e quantificação das citocinas</i>	45
5.3.8 <i>Peroxidação lipídica</i>	45
5.4 Desenvolvimento de composição microemulsionada de própolis verde Brasileira	46
5.4.1 <i>Obtenção da microemulsão.....</i>	46
5.4.2 <i>Avaliação das características físico-químicas da microemulsão ..</i>	46
5.4.3 <i>Teste preliminar de estabilidade</i>	47
5.4.4 <i>Teste de estresse térmico</i>	47
5.4.5 <i>Análise preliminar de estabilidade.....</i>	47

5.4.6	<i>Avaliação do efeito fotodinâmico antimicrobiano da microemulsão contendo própolis verde brasileira por método de difusão em meio sólido.</i>	47
	<i>A determinação do efeito antimicrobiano da própolis verde brasileira por difusão em meio sólido foi realizada conforme protocolo adaptado de Zhang e colaboradores (Zhang et al., 2010). Resumidamente, $1,5 \times 10^4$ de MRSA foi semeado pelo método de pour plate em meio de cultura BHI. Após a solidificação do meio de cultura, foram confeccionados poços utilizando tubos estéreis (diâmetro 5 mm) que foram preenchidos com 100 μL da microemulsão contendo ou não a própolis verde brasileira. Discos de difusão com vancomicina foram utilizados como controle positivo. Em seguida, os grupos tratados com luz azul foram fotoativados por 15 minutos em intensidade alta através do protótipo número 1.012960 (MM Optics). Por fim, após o tratamento, as placas foram incubadas (Incubadora Sterilifer, SX1.3DTMC) por 24 horas a 37° C.....</i>	47
5.4.7	<i>Análises estatísticas.....</i>	47
6.	RESULTADOS.....	48
6.1	A própolis verde possui maior absorção de luz na faixa entre 400nm e 450nm.....	48
6.2.	A própolis verde brasileira tem seu efeito microbicida contra MRSA e VISA potencializado quando fotoativada por luz LED azul	49
6.3.	Avaliação da localização da própolis verde Brasileira em MRSA e VISA.....	52
6.4.	Redes moleculares de compostos com efeito fotodinâmico presentes na própolis verde Brasileira	52
6.5.	Em baixas concentrações, a própolis verde brasileira tem atividade citoprotetora	55
6.6.	Própolis verde brasileira previne perda de peso por infecção independente da TFA	56
6.7.	TFA com própolis verde brasileira como fotossensibilizador reduz a carga bacteriana no local da infecção	57
6.8.	TFA com própolis verde brasileira modula a resposta inflamatória aumentando a expressão de IL-17A e IL-12p70	59
6.9.	Composição microemulsionada com própolis verde Brasileira é estável e passível de utilização em TFA	61
7.	DISCUSSÃO	63
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1. INTRODUÇÃO

Infecções bacterianas são um importante problema de saúde pública mundial. De acordo com dados recentes, somente no ano de 2019, houve mais de 7,7 milhões de mortes associadas a infecções bacterianas no mundo (Ikuta *et al.*, 2022). Tais infecções mostram-se ainda mais relevantes em países e regiões em desenvolvimento, sendo as responsáveis por mais de 50% das mortes por infecções hospitalares (Ikuta *et al.*, 2022; Lim *et al.*, 2016). Além disso, infecções bacterianas secundárias também surgem como mais uma dificuldade no tratamento de outras doenças, fazendo com que quantidade considerável de pacientes internados inicialmente por outros motivos apresentem complicações decorrentes de infecções secundárias de origem bacterianas (Wu *et al.*, 2022). Nesse contexto, bactérias multirresistentes à antibióticos são as principais responsáveis pelos dados recentes supracitados, sendo responsáveis por aproximadamente 4,95 milhões de mortes em 2019, destacando-se *Staphylococcus aureus*, microrganismo responsável por mais de 100 mil dessas mortes (Murray *et al.*, 2022).

Staphylococcus aureus é um dos principais patógenos humanos, responsável por causar diversos tipos de infecções que podem ser fatais (Boldock *et al.*, 2018; Tong *et al.*, 2015). Entre os diferentes locais de infecção, o *S. aureus* é o principal responsável por infecções de pele e tecidos moles, resultando em altas taxas de hospitalização e morbidade em indivíduos infectados (Miller *et al.*, 2015; Raya-Cruz *et al.*, 2019; Suaya *et al.*, 2014). Isto se deve à formação de abscessos no local da infecção que podem romper, permitindo assim que os microrganismos se espalhem para outros locais. Tais fatos podem induzir o desenvolvimento de pneumonia, osteomielite, bacteremia e choque séptico (Chen *et al.*, 2022; Corl *et al.*, 2020; Petrovic Fabijan *et al.*, 2020; Shi *et al.*, 2018).

Outras características do *S. aureus* incluem a resistência aos antibióticos e a adaptabilidade a diferentes ambientes. Dentre as cepas resistentes, destaca-se Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Lee *et al.*, 2018). Esta cepa é de grande relevância devido à sua alta patogenicidade e resistência a alguns antibióticos β -lactâmicos, o que muitas vezes a associa a quadros graves e de difícil tratamento. Nesse sentido, o MRSA tem demonstrado mecanismos rápidos de resistência aos antibióticos. Um exemplo claro é o surgimento de cepas resistentes à vancomicina (*Staphylococcus aureus* Resistente à Vancomicina [VRSA]), um dos antibióticos mais eficazes utilizados

no tratamento de infecções invasivas por MRSA (Gardete e Tomasz, 2014; Sievert *et al.*, 2008). Tais características melhoraram a capacidade de infecção do MRSA, sublinhando a sua importância no domínio da saúde pública e enfatizando a necessidade de desenvolver metodologias alternativas contra infecções causadas por este patógeno.

Considerando-se os fatores supracitados, a comunidade científica tem explorado metodologias alternativas de tratamento contra infecções por *S. aureus* resistentes a antibióticos (Kurlenda e Grinholc, 2012; Vlaeminck *et al.*, 2020). Entre eles, a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFA) tem se destacado devido à sua alta eficácia na indução da morte microbiana com poucos efeitos colaterais relacionados (Cieplik *et al.*, 2018). A TFA é baseada na reação entre um composto fotossensibilizador (FS), luz dentro de uma faixa espectral específica capaz de excitar o FS e oxigênio molecular (Wainwright *et al.*, 2017). Com base neste princípio, diferentes metodologias de TFA foram desenvolvidas. Elas podem variar no tipo de luz utilizada ou no FS empregado, que pode atuar tanto internalizado pelo microrganismo quanto aderido à superfície do patógeno (Nagata *et al.*, 2012; Wilson e Patterson, 2008). Além disso, a TFA mostrou correlação mínima com o desenvolvimento de resistência em microrganismos patogênicos. Logo, TFA é uma excelente abordagem a ser considerada para o tratamento de infecções causadas por patógenos multirresistentes (Maisch, 2015).

Apesar de serem extremamente promissores, os protocolos de TFA podem ter sua eficácia reduzida a depender do microrganismo, e a purificação do FS a partir de compostos individuais pode ser onerosa, demorada e resultar em resíduos tóxicos como subprodutos (Campanholi *et al.*, 2020). Portanto, faz-se necessário explorar alternativas para viabilizar a TFA no combate a diferentes bactérias em vários locais do corpo (Rineh *et al.*, 2017; Santos, dos *et al.*, 2020). Neste contexto, os extratos derivados de produtos naturais têm ganhado atenção na busca por novos FS, devido ao seu alto rendimento quântico de oxigênio singleto, ao baixo custo envolvido em sua extração, bem como à valorização da biodiversidade local em diferentes regiões (Campanholi *et al.*, 2020; Leite *et al.*, 2014; Maisch *et al.*, 2014). A própolis verde brasileira mostra-se uma excelente candidata a FS no combate a infecções bacterianas. Ela consiste em uma mistura resinosa e perfumada formada por abelhas, composta predominantemente por compostos fenólicos, incluindo flavonoides, ácido fenólico e seus derivados (Cao, Wang e Yuan, 2004; Teixeira *et al.*, 2005). Além disso, a própolis verde brasileira tem relatado

naturalmente efeitos antimicrobianos e antitumorais, o que pode potencializar sua aplicação como FS para TFA (Zabaiou *et al.*, 2017).

Existem medidas que podem potencializar os efeitos da TFA frente a processos infecciosos. Por exemplo, a utilização de FS incorporados a microemulsões tem se mostrado uma excelente opção de mecanismo de entrega de substâncias bioativas nos tecidos infectados (Zhou *et al.*, 2010). Dessa forma, aumenta-se a penetração do FS a porções mais internas do tecido, mesmo com a aplicação tópica, preservando sua função fotodinâmica e permitindo uma maior atuação mesmo em locais de difícil acesso (Araújo, Thomazine e Lopez, 2010). Porém, para que se valide tais propostas como métodos terapêuticos, faz-se necessário a utilização de modelos de estudos confiáveis e reprodutíveis. Nesse sentido, o modelo murino de infecção intradérmica na orelha de camundongos tem sido amplamente utilizado, principalmente no contexto de TFA, uma vez que esses animais apresentam facilidade significativa de manejo bem como resultados confiáveis (Muniz *et al.*, 2021; Santos, dos *et al.*, 2019, 2020). Portanto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar a própolis verde brasileira como fotossensibilizador para terapia fotodinâmica antimicrobiana bem como desenvolver microemulsão como bioproduto para TFA.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Infecção intradérmica: da formação de abscessos à dificuldade de tratamento

A pele possui diferentes funções no organismo. Dentre elas, uma função essencial é atuar como barreira estrutural, flexível e resistente contra patógenos invasores, impedindo que microrganismos oportunistas possam adentrar a camadas mais profundas e estabelecer infecções (Kobayashi, Malachowa e DeLeo, 2015). Porém, quando ocorre o rompimento da pele, bactérias oportunistas podem alcançar tecidos internos e estabelecer as chamadas infecções de pele e tecidos moles (Dryden, 2010). Isso acontece devido à microbiota da pele, que consiste em uma imensa variedade de espécies de *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* e leveduras (Manfredi, Calza e Chiodo, 2002).

Dentre essas infecções as mais frequentes causadas por *S. aureus* são: impetigo, foliculite, hidradenite supurativa, mastite, furúnculos, furunculose e abscessos (Choi *et al.*, 2014; Foster, 2005). As lesões intradérmicas se destacam por serem uma das mais

características das infecções causadas por *S. aureus*, culminando frequentemente na formação de abscessos. Esses abscessos são formados graças a uma série de eventos que contam com a participação do hospedeiro e também do microrganismo (Cheng *et al.*, 2011).

A formação de abscessos possui, a princípio, função protetora para o hospedeiro, uma vez que serve como uma forma de contenção do patógeno, impedindo que o mesmo se dissipe para outros locais (Kobayashi, Malachowa e DeLeo, 2015). Inicialmente, o abscesso piogênico se forma como uma resposta inflamatória aguda, através da sinalização de queratinócitos estimulados por receptores de reconhecimento de padrões microbianos (Krishna e Miller, 2012). Além disso, os queratinócitos produzem peptídeos antimicrobianos importantes no combate a microrganismos como *S. aureus* (Braff *et al.*, 2005; Harder *et al.*, 1997). Posteriormente, ocorre a maturação do abscesso, composto por um exsudato inflamatório rico em polimorfonucleares viáveis e necróticos, detritos teciduais, fibrina e bactérias. Em seguida, ocorre a proliferação de fibroblastos e formação da cápsula fibrosa na periferia, impedindo desse modo a disseminação bacteriana para outros locais (Kobayashi, Malachowa e DeLeo, 2015).

Todavia, apesar da importância na proteção do hospedeiro, alguns trabalhos sugerem que microrganismos como *S. aureus* conseguem tirar proveito desse tipo de mecanismo de defesa (Cheng *et al.*, 2011). Isso porque *S. aureus* possui genes relacionados ao estabelecimento de abscessos (Cheng *et al.*, 2009, 2010). Tais genes possibilitam que o *S. aureus* se organize no centro do abscesso, protegido das células de defesa através de uma pseudocápsula de fibrina (Cheng *et al.*, 2010). Isso permite que essa bactéria se prolifere e então se reorganize para que, ao se romper o abscesso, a infecção se dissipe para outros tecidos (Cheng *et al.*, 2009).

Dados os fatores de virulência de *S. aureus* relacionados com o estabelecimento da infecção, a resposta imunológica por si só muitas vezes não é suficiente para combater infecções causadas por essa bactéria (Holmes *et al.*, 2015). Desse modo, tornam-se necessários modelos de estudos confiáveis para que se possam avaliar diferentes metodologias terapêuticas que auxiliem no combate a infecções causadas por esse microrganismo. Muitos estudos têm trabalhado com diferentes modelos animais como coelhos e camundongos para avaliação de modelos de infecção intradérmica com *S. aureus* (Kobayashi, Malachowa e DeLeo, 2015; Santos, *et al.*, 2020). Esse último tem

sido amplamente utilizado devido a sua fácil manipulação e a sua proximidade em reproduzir respostas fisiológicas semelhantes às ocorridas em seres humanos (Santos, *et al.*, 2018).

2.2 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é um dos patógenos mais comuns em humanos, sendo responsável por causar infecções que podem ser fatais (Tong *et al.*, 2015). Essas bactérias se caracterizam por serem gram-positivas, esféricas com diâmetro variando de 0,5 a 1,5 µm, serem imóveis, agrupadas em massas irregulares como células aderidas umas às outras e encadeadas aos pares em formato de cachos de uva (Kloos e Wolfshohl, 1982). Além disso, bioquimicamente são caracterizadas produtoras das enzimas catalase e coagulas, podendo causar hemólise (Ndedy *et al.*, 2023; Tigabu e Getaneh, 2021). O *S. aureus* faz parte da microbiota humana, principalmente da pele e fossas nasais (Lowy, 1998). Todavia, ao se romperem as barreiras epiteliais, o *S. aureus* tem sido relatado como o responsável por uma enorme gama de quadros clínicos, como infecções de pele, mastite, piomiosite, fascite necrosante, pneumonia necrotizante, osteomielite, pé diabético e choque séptico (Jneid *et al.*, 2018; Manandhar *et al.*, 2018; Sader *et al.*, 2016; Shi *et al.*, 2018; Sohail e Latif, 2018; Tong *et al.*, 2015; Tuchscher *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2018).

S. aureus tem se destacado cada vez mais como um dos patógenos mais relevantes se tratando de infecções bacterianas. Isso porque esse microrganismo apresenta ampla distribuição, sendo responsável por altos índices de infecção na população, gerando custos que podem chegar a \$23.000 por paciente hospitalizado (Suaya *et al.*, 2014). Além disso, o tratamento das infecções por *S. aureus* é complicado devido ao surgimento de cepas resistentes a antibióticos como o *Methicillin-Resistant* e *Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA e VRSA, respectivamente) (McGuinness, Malachowa e DeLeo, 2017; Miao *et al.*, 2017). Além das cepas obtidas em isolados clínicos, o *S. aureus* tem se mostrado cada vez mais adaptado a comunidade (*Community-acquired Staphylococcus aureus*), causando dessa forma infecções amplamente difundidas por toda a população. Dessa maneira, mostram-se necessários estudos nos quais sejam avaliadas formas de combate a esse microrganismo (Pérez *et al.*, 2016).

A dispersão de *S. aureus* pela população bem como o surgimento de cepas resistentes estão relacionados aos seus diferentes fatores de virulência, responsáveis por

neutralizarem tanto componentes da imunidade inata quanto da adquirida (Cheung, Bae e Otto, 2021; Rudra e Boyd, 2020). Com isso, embora diversos imunógenos contra *S. aureus* baseados em diferentes tipos de imunizações tenham sido desenvolvidos, nenhum deles demonstrou eficácia significativa em ensaios clínicos (Clegg *et al.*, 2021; Jahantigh *et al.*, 2022). Isso porque o *S. aureus* tem demonstrado grande capacidade de estabelecer infecção no hospedeiro mesmo na presença de uma resposta imune específica robusta, algo que justifica a alta frequência de infecções recorrentes por esse patógeno (Mirzaei *et al.*, 2020; Ogonowska *et al.*, 2021). Dessa forma, mostram-se cada vez mais necessários estudos que visem o desenvolvimento de metodologias para o controle do *S. aureus*.

2.3 *Staphylococcus aureus* versus sistema imune: mecanismos de evasão da resposta imune adaptativa

Sabe-se que anticorpos antígeno-específico contra *S. aureus* conferem apenas proteção parcial contra infecções subsequentes (Goldmann e Medina, 2018). Isso explica o fato de indivíduos com doenças crônicas colonizados por *S. aureus* produzirem altos títulos de anticorpos contra diversos fatores de virulência estafilocócicos que não conferem proteção contra infecções recorrentes (Junge *et al.*, 2016). Um dos principais fatores de virulência utilizado como escape da resposta humoral é a proteína estafilocócica A (SpA), que é secretada pela maioria dos isolados clínicos e que pode se ligar a imunoglobulinas, impedindo que as mesmas desempenhem as suas funções protetoras (Becker *et al.*, 2014). Desse modo, a SpA pode se ligar aos domínios Fc γ ou Fab das Imunoglobulinas G (IgG) e M (IgM), inibindo a morte opsonofagocítica de *S. aureus* (Forsgren e Forsum, 1970; Peterson *et al.*, 1977). Ademais, o complexo formado entre a ligação da SpA e o domínio Fab se liga ao receptor de antígeno de célula B (BCR), limitando dessa forma a resposta do hospedeiro a outros fatores de virulência de *S. aureus*, além de regular negativamente o BCR e os correceptores CD19 e CD21, bem como em limitantes de proliferação celular, que levam a morte das células B por apoptose (Goodyear e Silverman, 2003; Graille *et al.*, 2000; Pauli *et al.*, 2014). Dessa forma, o SpA interfere na resolução e geração de memória imunológica eficaz através de mecanismos de defesa humoral.

Outro tipo celular de extrema importância no combate ao *S. aureus* são os linfócitos T. Tal informação está evidente em estudos que demonstram que, em indivíduos portadores do vírus da imunodeficiência humana com defeitos nas respostas de linfócitos

T CD4⁺, há uma maior incidência de infecções por *S. aureus* (Utay *et al.*, 2016). Somado a isso, camundongos com deficiências nos linfócitos T mostram-se mais susceptíveis ao desafio letal com *S. aureus* do que animais selvagens (Ziegler *et al.*, 2011). Dentre as células T, as mais relevantes nesse contexto são as produtoras de IL-17, como as células T $\gamma\delta$, que tem demonstrado papel fundamental na proteção contra infecções por *S. aureus* (Cho *et al.*, 2010).

A citocina IL-17 possui extrema importância no combate ao *S. aureus* principalmente por seu papel no recrutamento de neutrófilos, uma das primeiras células a chegarem ao local da infecção que possuem extrema importância na depuração bacteriana (Iwakura *et al.*, 2008). Após o recrutamento desses neutrófilos através de quimiocinas e citocinas, essas células expõem o *S. aureus* a proteínas antimicrobianas, peptídeos e espécies reativas de oxigênio com o objetivo de induzir a morte bacteriana (Guerra *et al.*, 2017). Desse modo, os neutrófilos podem interagir com células T *helper* 17, produzindo citocinas como TGF- β , IL-6 e a própria IL-17A, cooperando dessa forma com outros tipos celulares e atuando desse modo na interface entre as respostas imunes inata e adaptativa (Appelberg, 2007; Ottonello *et al.*, 2007). Todavia, a persistência de infecções demonstra que o *S. aureus* possui mecanismos de evasão da resposta imune importantes para garantir a efetividade das infecções causadas por esse patógeno.

Nesse contexto, o *S. aureus* tem como alguns dos seus fatores de virulência e evasão do sistema imune a produção de hemolisinas e leucocidinas, toxinas que impactam diretamente na função de células de defesa como os neutrófilos, induzindo a formação de poros em suas membranas e levando-os a lise (Seilie e Bubeck Wardenburg, 2017). O *S. aureus* também é responsável pela produção da “*chemotaxis inhibitory protein of S. aureus*” (CHIPS), exoproteína responsável pela inibição da migração e ativação de neutrófilos (Haas, de *et al.*, 2004). Outro mecanismo importante é a secreção de antagonistas do *formyl peptide receptor-like-1* (FPR1), um receptor ativado por diversos peptídeos e proteínas, que leva a mobilização de cálcio intracelular, quimiotaxia, e produção de superóxido, mecanismos importantes para que os neutrófilos exerçam sua função de combate de forma eficaz (Bae *et al.*, 2003).

Um dos fatores de virulência do *S. aureus* importante na evasão da resposta via células T é a presença de superantígenos. Esses se ligam diretamente ao MHC das células apresentadoras de antígenos, contornando dessa forma os mecanismos do processamento

convencional via MHC e não sendo devidamente apresentados aos linfócitos T (Llewelyn e Cohen, 2002). Tais superantígenos podem induzir uma ativação potente de até 20% de todas as células T periféricas, estando relacionados com a síndrome do choque tóxico em decorrência de uma grande produção de citocinas que não estão relacionadas na defesa do hospedeiro frente a esse patógeno, retardando dessa forma o desenvolvimento de uma resposta específica eficaz (Fraser, 2011; Spaulding *et al.*, 2013; Xu e McCormick, 2012).

2.4 *Staphylococcus aureus* x resistência à antibióticos: histórico e perspectiva

Convencionalmente, antibióticos são produtos naturais sintetizados por microrganismos que agem contra outros microrganismos (Hutchings, Truman e Wilkinson, 2019). Todavia, moléculas totalmente sintéticas ou modificações de produtos naturais têm sido utilizadas por apresentarem um potente efeito bactericida, sendo importantes no combate a infecções bacterianas. Um exemplo disso foi a modificação da sulfanilamida para a obtenção de antibióticos β -lactâmicos. Tais antibióticos em sua grande maioria atuam em três principais alvos: o envelope celular, os ribossomos e os ácidos nucleicos (Foster, 2017).

Porém, com o passar dos anos, as bactérias vem apresentando resistência a diferentes antibióticos (Nesme e Simonet, 2015). A resistência bacteriana se dá, geralmente, por transferência horizontal de elementos móveis (plasmídeos, transposons, entre outros) ou por mutação do microrganismo, muitas vezes, induzidas pela situação de estresse frente ao processo infeccioso (Foster, 2017). A aquisição de resistência induzida por transferência horizontal culmina principalmente na modificação e inativação do fármaco, modificação enzimática do local de ligação do fármaco, efluxo do fármaco, mecanismos de desvio do composto ativo e deslocamento do fármaco para proteger o alvo (Jensen e Lyon, 2009). A resistência induzida por mutação, por sua vez, induz a alteração do alvo do fármaco, desrepressão de bombas de efluxo de resistência a múltiplos fármacos e mutações escalonadas que alteram a estrutura ou composição da parede celular ou membrana plasmática (Foster, 2017).

Apesar de aparentemente complexo, os processos de desenvolvimento de resistência bacteriana a antibióticos são muito mais rápidos do que o desenvolvimento de antibióticos que combatam tais microrganismos (Barriere, 2015). Em contrapartida, o surgimento de cepas bacterianas diferentes cresce assustadoramente. Tal capacidade fica evidente ao se observar o *Staphylococcus aureus* resistente à vancomicina. Para que se

obtenha a resistência a esse antibiótico, são necessários até seis mutações em diferentes genes que resultam na remodelação do envelope celular, que culmina na redução do acesso do fármaco ao seu alvo (Courvalin, 2006; Zeng *et al.*, 2016).

Dentre as cepas resistentes de *S. aureus*, MRSA tem um destaque importante no contexto clínico mundial. MRSA foi responsável por mais de 100.000 mortes no mundo em 2019, estando entre os microrganismos de maior relevância mundial (Murray *et al.*, 2022). Por esse motivo, MRSA é frequentemente relatado como um dos principais patógenos contemporâneos, sendo o responsável por causar infecções intoxicação alimentar, endocardite piogênica, pneumonia supurativa, otite média, osteomielite e infecções piogênicas da pele e tecidos moles, além de infecções diversas em animais (Algammal *et al.*, 2020). Geneticamente diverso e altamente adaptável, a epidemiologia das infecções por MRSA é caracterizada por cepas epidêmicas, sendo responsável por um grande número de infecções tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade em geral (Turner *et al.*, 2019).

Outra cepa relevante para a compreensão da resistência em *S. aureus* é a VISA. Isso porque a vancomicina tem sido usado como último recurso no tratamento para infecções graves por *S. aureus* e tal resistência está associada a mutações em diversos genes, o que culmina em alterações estruturais e metabólicas significativas nessa cepa (Hu, Peng e Rao, 2016). Dentre as alterações observadas em VISA destacam-se o espessamento da parede celular e autólise reduzida, o que dificulta ação de diversos antibióticos e a geração de danos significativos que inviabilizem a vida nessas bactérias (Howden *et al.*, 2011). Curiosamente, o desenvolvimento de resistência intermediária à Vancomicina nessa bactéria está associada a diminuição da sua virulência, fazendo com que muitas vezes não seja capaz de induzir a formação de abscessos e necrose tecidual, o que diminuem a sua patogenicidade (Cameron *et al.*, 2012; Gardete *et al.*, 2012; Shang *et al.*, 2016). Contudo, a diminuição da virulência pode representar uma estratégia para diminuir a sua percepção pelo sistema imunológico do hospedeiro, facilitando a sua persistência clínica (Gardete *et al.*, 2012).

2.5 Própolis brasileira: das características gerais ao potencial terapêutico

O termo própolis possui origem grega, a partir da união dos termos *pro* (em defesa de) e *polis* (cidade), sugerindo a “defesa da cidade”, no caso, a comunidade a apícola que a produziu. Isso porque ela é utilizada para vedar aberturas na colmeia, mantendo a temperatura da colmeia em torno de 35°C e garantindo também um ambiente asséptico e livre de microrganismos invasores (Salatino *et al.*, 2005). A própolis pode apresentar diferentes características, variando desde a coloração que pode ser creme, amarelo, verde, vermelho ou marrom bem como a textura, podendo apresentar-se friáveis, duras, elásticas ou pegajosas. No Brasil, os principais tipos de própolis são a amarela, verde, vermelha e marrom (Machado *et al.*, 2016; Santos, dos *et al.*, 2022).

A composição fitoquímica da própolis varia a depender dos vegetais utilizados para a sua produção, fazendo com que ela apresente variações decorrentes dos biomas onde são produzidas. No Brasil, as principais espécies botânicas utilizadas como fonte vegetal para a produção da própolis vermelha são *Symphonia globulifera*, para a própolis marrom tem-se *Pinus spp.*, *B. dracunculifolia*, *Eucalyptus spp.* e *Araucaria angustifolia* e para a própolis verde tem-se *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo), *Dalbergia ecastaphyllum* e, principalmente no Nordeste, *Mimosa tenuiflora* (jurema-preta) (Ferreira *et al.*, 2017; Freitas, de *et al.*, 2011; Frota *et al.*, 2021; Ribeiro *et al.*, 2021; Santos, M. F. C. *et al.*, 2021; Serafim *et al.*, 2023). Assim, as diferentes origens botânicas se associam as diferentes composições de cada um dos tipos de própolis. A própolis vermelha apresenta principalmente isoflavonóides, benzofenonas preniladas e epóxido de naftoquinona (Trusheva *et al.*, 2006). A própolis marrom, por sua vez, apresenta benzofenonas poliisopreniladas e diterpenos (Piccinelli *et al.*, 2013). Por fim, a própolis verde apresenta como principais compostos a baccharina, artepilina C, kaempferide e ácido *p*-cumárico (Przybyłek e Karpiński, 2019; Szliszka, Kucharska, *et al.*, 2013).

Os diferentes tipos de própolis apresentam potenciais terapêuticos para o tratamento de diversas doenças, desde as doenças infecciosas até as doenças crônicas não transmissíveis (Fiorini *et al.*, 2021; Otręba *et al.*, 2022; Sulaeman, Fikri e Mulyati, 2022; Zuhlendri *et al.*, 2021). Uma vez que cada tipo possui uma composição química diferente, suas aplicações também variam a partir do potencial terapêutico de seus componentes. A própolis vermelha brasileira apresenta efeitos antimicrobianos contra bactérias, protozoários e fungos (Rufatto *et al.*, 2017). Essa característica está demonstrada em

estudos com bactérias gram-positivas e gram-negativas, em que foram utilizadas tanto a própolis de modo integral como alguns de seus princípios ativos isolados, como o vestitol e o neovestitol (Ayres *et al.*, 2011; Bueno-Silva *et al.*, 2013; Nascimento, do *et al.*, 2022; Santos, L. A. *et al.*, 2021; Souza Silva, de *et al.*, 2021). Além disso, apresenta também atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e cicatrizante (Rufatto *et al.*, 2017). A própolis marrom brasileira, a depender do local onde é produzida, pode apresentar composição química contendo compostos que também estão presentes na própolis verde brasileira como baccharina, ácido *p*-cumárico e artepilina C. Essa apresenta uma ampla gama de atividades biológicas com potencial terapêutico que vão desde ações antibacterianas, antiviral, antifúngicas e antiparasitárias até ações antitumorais, antimutagênicas e antioxidantes. Contudo, a depender da fração utilizada, pode apresentar toxicidade considerável em modelos de estudos utilizando *Artemia salina* (Santos, David e David, 2016).

Dentre os tipos de própolis, a própolis verde brasileira é uma das mais utilizadas como produto natural medicinal bem como em estudos que avaliem o potencial terapêutico desse tipo de produto natural. Ela consiste em uma mistura resinosa e perfumada, formada por abelhas a partir de secreções coletadas de plantas e secreções parótidas com cera das abelhas (Cao, Wang e Yuan, 2004). Além dos compostos já mencionados, é caracterizada pela presença de ácidos cafeoilquínicos e ácido cinâmico, além de outros compostos decorrentes de biomas específicos onde a própolis verde é produzida (Xu *et al.*, 2020). Estudos demonstram que a própolis verde possui importantes efeitos biológicos que variam desde atividades antimicrobianas a atividades antitumorais (Dobrowolski *et al.*, 1991; Zabaiou *et al.*, 2017). Para além disso, ela apresenta efeitos imunomoduladores e cicatrizantes que podem favorecer a recuperação tecidual em indivíduos com infecções de pele e tecidos moles (Costa *et al.*, 2020; Oliveira Cardoso, de *et al.*, 2022). Acredita-se que além dos seus efeitos naturais devido a sua composição, a própolis verde possua potencial para agir como FS para TFA. Sabe-se que a própolis verde brasileira é composta predominantemente por compostos fenólicos, incluindo flavonoides e ácido fenólico, bem como seus derivados (Teixeira *et al.*, 2005). Estudos demonstram que compostos com flavonoides podem ser fotoativados, sendo úteis para TFA (Zhang *et al.*, 2012). Desse modo, acredita-se que os efeitos antibacterianos da própolis verde possam ser potencializados por TFA, gerando danos às bactérias por diferentes vias, possibilitando tratamentos mais completos e aumentando a sua eficácia.

2.6 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana: dos princípios à aplicabilidade

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFA) tem ganhado força por apresentar efeitos benéficos frente ao combate dos mais diferentes problemas, desde tratamentos mais superficiais de pele quanto ao combate de tumores em diferentes tecidos, infecções e outros problemas como a doença vitreorretinal (Almeida *et al.*, 2017; Hodgkinson, Kruger e Abrahamse, 2017; Rishi *et al.*, 2017). Todavia, apesar do destaque atual, a TFA teve sua origem há muitos séculos em comunidades tradicionais como as egípcias e chinesas tendo um dos seus primeiros registros na Grécia antiga (Daniell e Hill, 1991). A partir de estudos que observaram a capacidade da luz em induzir a morte de protozoários, Von Tappeiner cunhou o termo ação fotodinâmica para descrever uma reação dependente de oxigênio após a fotossensibilização (Daniell e Hill, 1991; Kalka, Merk e Mukhtar, 2000). Sendo assim, a TFA resulta da interação entre a luz, FS e o oxigênio. Após a exposição do FS à luz em um espectro de ação específico, são geradas espécies reativas de oxigênio, que afetam componentes intracelulares como proteínas e DNA, resultado na morte celular das células que absorveram o FS e poupando o tecido circundante (Ali e Banerjea, 2016). Dessa forma, a TFA tem se utilizado de irradiação luminosa de lasers ou de *Light Emitting Diodes* (LEDs) associada ao FS para promover a morte de microrganismos (Pražmo *et al.*, 2016).

Um dos principais componentes da TFA é o FS, uma vez que a partir dele serão geradas espécies reativas de oxigênio que irão induzir a morte do microrganismo. Logo, é de extrema importância que o FS possua características que possibilitem a efetividade do tratamento, como boa capacidade de absorção pelas células-alvo, meia vida curta e ser rapidamente eliminado pelo tecido saudável (Kalka, Merk e Mukhtar, 2000). Dentre os FS utilizados atualmente, um dos mais promissores é a curcumina, composto derivado da *Curcuma longa*, também conhecida como Açafrão-da-Índia. Isso porque estudos demonstram que a curcumina apresenta boa atividade anti-inflamatória, antisséptica, antiviral e antitumoral através do estímulo por luz no espectro visível do azul (Ali e Banerjea, 2016; Santezi, Reina e Dovigo, 2018). Todavia, alguns trabalhos demonstram possíveis mecanismos de resistência bacteriana à TFA através da expressão de enzimas antioxidantes e principalmente bombas de efluxo que reduzem as concentrações intracelulares do FS (Rineh *et al.*, 2017; Staerck *et al.*, 2017; Tegos *et al.*, 2008).

A TFA se utiliza de dois tipos de reações para induzir a morte do microrganismo: a reação do tipo I e a do tipo II. Ambas as reações partem do estímulo do FS induzido pela luz, energizando o FS e fazendo com que o mesmo passe de um estado fundamental para um estado excitado singleto, que pode então retornar ao seu estado fundamental ou sofrer uma mudança para o estado tripleto que, por consequência, pode sofrer as reações do tipo I e II (Pražmo *et al.*, 2016). Na reação do tipo I, o estado tripleto excitado reage diretamente com uma molécula de substrato, como a membrana celular, removendo um hidrogênio e gerando radicais livres que, ao reagirem com o oxigênio, podem formar superóxidos e radicais hidroxila (Konopka e Goslinski, 2007). A reação do tipo II, por sua vez, consiste da interação direta do FS excitado com o oxigênio, para formar produtos oxigenados, sendo ambas as reações dependentes da tensão de oxigênio e da concentração do FS (Tromberg *et al.*, 1990).

Apesar das inúmeras possibilidades, a grande maioria dos estudos com TFA se utiliza de luz LED azul ou de Laser vermelho (Kunz *et al.*, 2019; Monteiro *et al.*, 2017). Outra dificuldade é a necessidade de diferentes fotossensibilizadores, que possam ter ação quando fotoativados, mas que também consigam naturalmente apresentar algum efeito bactericida. Tais ações em sinergia podem potencializar os efeitos da TFA e otimizar o tratamento de infecções bacterianas.

2.7 “*Drugs delivery*”: o potencial da microemulsão como sistema de administração de compostos ativos

Microemulsões são utilizadas atualmente em uma ampla variedade de indústrias, incluindo às indústrias cosméticas, agrícola, de alimentos e farmacêutica (Muzaffar, Singh e Chauhan, 2013). Todavia, apesar de bastante atual, os primeiros estudos surgiram ainda na década de 1940 quando Hoar e Schulman (1943) geraram uma solução monofásica clara a partir de uma emulsão leitosa e hexanol (Hoar e Schulman, 1943). Posteriormente, Schulman e colaboradores (1959) prepararam a primeira microemulsão a partir da dispersão de óleo em uma solução aquosa de surfactantes, conseguindo uma formulação estável e transparente (Schulman, Stoeckenius e Prince, 1959). Desde então, microemulsões foram criadas a partir de diferentes misturas, fazendo com que o termo fosse redefinido em diferentes contextos. A partir disso, microemulsões foram definidas como um sistema de água, óleo e anfifílico, que é uma única solução líquida opticamente isotrópica e termodinamicamente estável (Danielsson e Lindman, 1981).

Na indústria farmacêutica, a microemulsão se demonstra uma ótima opção para a administração de medicamentos. Isso porque microemulsões apresentam diversas vantagens. Uma dessas vantagens é a possibilidade de administrar o fármaco na forma líquida, facilitando dessa forma a absorção do composto ativo (McCleustion *et al.*, 2020). Outra característica interessante é que por ser formado por pequenas gotículas, microemulsões possuem grande área de superfície em relação ao volume total, melhorando a biodisponibilidade e a estabilidade do fármaco (Čerpnjak *et al.*, 2013; He, He e Gao, 2010; Liu *et al.*, 2016; McClements, 2015). Outras propriedades relevantes de microemulsões são a sua capacidade de solubilizar compostos hidrofílicos e hidrofóbicos e a sua composição a base de reagentes simples, tornando essa metodologia bastante versátil, eficaz e de baixo custo (Callender *et al.*, 2017).

A administração transdérmica possui diversas vantagens sobre a via oral: evita o metabolismo hepático, possui administração mais fácil e conveniente e existe a possibilidade de retirada imediata, caso necessário (Kogan e Garti, 2006). Todavia, para que o fármaco possa exercer sua função, a formulação de entrega precisa ser capaz de atravessar a barreira da pele, que consiste no epitélio mais impermeável a substâncias exógenas (Kreilgaard, 2002). Desse modo, o fármaco precisa atravessar camadas heterogêneas como a epiderme (camada mais externa) e a derme (camada interna e fisiologicamente mais ativa), sendo que a porção na pele que controla a penetração de medicamentos é denominada estrato córneo (Kogan e Garti, 2006). Sendo assim, a penetração da maioria dos compostos aplicados topicamente segue vias lipídicas do estrato córneo, vias transcelulares através dos corneócitos ou pelos folículos capilares e glândulas sebáceas (esses dois últimos em menor proporção)(Illel *et al.*, 1991; Kasting *et al.*, 2003; Scheuplein e Blank, 1971). A ação dos seus componentes na pele associado à estrutura das fases e ao tamanho das partículas favorecem a utilização de microemulsões como carreadores transdérmicos de compostos ativos (Nastiti *et al.*, 2017). Tais afirmações corroboram com estudos que demonstram que a penetração e profundidade cutânea de curcumina (corante lipofílico) foi maior quando a mesma substância foi incorporada em creme (Teichmann *et al.*, 2007). Diante do exposto, o desenvolvimento de uma microemulsão de uso tópico com própolis verde brasileira para utilização com TFA mostra-se extremamente promissora no combate a infecções de pele causadas por *S. aureus*.

3 JUSTIFICATIVA

Staphylococcus aureus é um importante patógeno humano associado a uma variedade de quadros clínicos. Esse microrganismo foi o responsável por mais de 100 mil mortes no ano de 2019, estando frequentemente associado a uma maior taxa de mortalidade, maior taxa de internação e maior custo de tratamento, quando comparado às demais bactérias. Além disso, estudos relatam que os custos com cuidados farmacêuticos após internações decorrentes de infecções por *S. aureus* são significativamente maiores do que outras bactérias. Devido à sua grande relevância clínica e após o surgimento da resistência aos atuais antibióticos utilizados, o interesse em desenvolver medidas terapêuticas alternativas contra esse tipo de infecção têm sido crescente. Diversos estudos apontam o potencial da terapia fotodinâmica antimicrobiana na redução significativa do número de unidades formadoras de colônias (UFC) em biofilmes e infecções experimentais. Entretanto, a maioria dos estudos utilizam extratos brutos ou moléculas isoladas em solução, de modo que a sua aplicação acaba sendo invasiva e, por vezes, apresenta resultado muito localizado devido à baixa dispersividade dessas soluções pelos tecidos.

Muitos fotossensibilizantes têm sido igualmente testados a fim de se padronizar os tempos e concentrações de incubação. Entretanto, as pesquisas experimentais nesta área referem-se em sua maior parte às infecções ósseas e análises *in vitro* relativas à susceptibilidade do *S. aureus* à terapia fotodinâmica antimicrobiana, além de utilizarem geralmente laser vermelho ou LED azul.

Com o crescente aumento de cepas resistentes antimicrobianos clássicos utilizados na terapia convencional, torna-se fundamental o desenvolvimento de estudos que visem o entendimento do processo inflamatório durante a infecção tratada com a terapia fotodinâmica antimicrobiana, principalmente quanto às mudanças nos perfis de mediadores inflamatórios produzidos e células envolvidas na inflamação para controle de patógenos que causam infecções com altos índices na população. Somado a isso, alguns estudos apontam o desenvolvimento de resistência a alguns protocolos de TFA, de modo que se torna essencial o desenvolvimento de novos protocolos cada vez mais eficazes. O nosso grupo de pesquisa tem publicado trabalhos com diferentes FS utilizando o modelo de infecção intradérmica na orelha de camundongos. Tal modelo possibilita não apenas a avaliação do efeito antimicrobiano da TFA, mas também a compreensão sobre como esse

método terapêutico modula a resposta imune e anatomopatológica dos animais tratados, permitindo uma melhor compreensão dos efeitos da TFA *in vivo*, ampliando o seu potencial de aplicação na clínica.

O fato de a própolis verde brasileira possuir efeito biológico natural contra infecções, associada à sua possível atividade fotodinâmica, pode ser uma importante vantagem no tratamento de infecções pela indução da morte bacteriana por diferentes vias. Além disso, este estudo visa não somente a compreensão dos eventos associados à TFA com própolis verde brasileira, mas também o desenvolvimento de uma microemulsão de uso tópico. Este bioproduto se mostra extremamente relevante visto que muitos dos estudos publicados utilizam a aplicação do FS no tecido infectado através de injeções, fato que está associado a geração de lesão e dor, o que pode induzir maior abandono terapêutico se aplicado na clínica. Contudo, com o desenvolvimento da microemulsão de uso tópico como mecanismo de entrega da própolis verde brasileira, espera-se uma maior penetração do FS no tecido infectado evitando a injeção e a dor por ela ocasionada, fatores que podem propiciar maior eficácia e aceitação da TFA como terapia para infecções de pele.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Caracterizar a própolis verde brasileira como fotossensibilizador para terapia fotodinâmica antimicrobiana, avaliar a sua eficácia contra infecções intradérmicas causadas por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e desenvolver composição microemulsionada como bioproduto para TFA.

4.2 Objetivos específicos

- 4.2.1 Avaliar a fotorresponsividade da própolis verde brasileira a diferentes cores de luz visível em diferentes doses de energia (J/cm^2);
- 4.2.2 Padronizar o melhor protocolo de TFA com própolis verde Brasileira para a inativação de diferentes cepas de *S. aureus*;
- 4.2.3 Determinar o perfil fitoquímico da própolis verde brasileira extraída no território do sudoeste da Bahia.
- 4.2.4 Avaliar a citotoxicidade da própolis verde brasileira às células anucleadas e nucleadas.
- 4.2.5 Caracterizar os efeitos da TFA com própolis verde brasileira na pele e no linfonodo drenante de camundongos infectados com MRSA;
- 4.2.6 Caracterizar achados anatomopatológicos da orelha dos animais infectados com MRSA após aplicação da TFA;
- 4.2.7 Analisar a imunomodulação da TFA com própolis verde Brasileira em camundongos infectados intradermicamente com MRSA;
- 4.2.8 Avaliar a resposta hematológica de animais infectados com MRSA frente ao tratamento com TFA;
- 4.2.9 Desenvolver uma microemulsão contendo extrato de própolis verde brasileira para aplicação em TFA.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Aspectos gerais

5.1.1 Obtenção e preparação da própolis verde Brasileira

A própolis verde utilizada no estudo foi extraída na cidade de Vitória da Conquista, Bahia, Brasil e gentilmente doada pela professora Regineide Xavier Santos, do laboratório de apicultura “Casa do Mel” da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - *Campus* Vitória da Conquista. A própolis foi então dissolvida em propilenoglicol (Synth) para os testes *in vitro* e preparada nas concentrações de 1 $\mu g/mL$, 5 $\mu g/mL$, 10 $\mu g/mL$, 50 $\mu g/mL$ e 100 $\mu g/mL$. Para as análises *in vivo*, foi utilizada a concentração de 10 $\mu g/mL$. As soluções foram filtradas através de filtros de 0,22 μm (TPP, filtro de seringa 22), para garantir a esterilidade das soluções.

5.1.2 *Microrganismos*

No presente estudo, foram empregadas cepas de referência de *Staphylococcus aureus* 43300 resistente à metilina (MRSA 43300) e *Staphylococcus aureus intermediário à vancomicina* 700699 (VISA 700699). Para o cultivo, os microrganismos foram descongelados em temperatura ambiente e semeados em meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) (HIMEDIA, pH 7,4) e colocados em estufa bacteriológica (Sterilifer, SX1.2DTMC) por 24 horas a 37 °C.

5.1.3 *Determinação da carga bacteriana*

A carga bacteriana foi determinada por espectrofotometria seguindo metodologia de dos Santos e colaboradores (2019). Resumidamente, dentro de uma cabine de fluxo laminar (Filterflux, SBIIA1) previamente esterilizada, foram coletadas 3 a 5 colônias das placas de cultura e adicionadas a 1 mL de solução salina estéril. Em seguida, 10 µL da solução contendo os microrganismos foram diluídos em solução salina estéril até o volume de 1 mL, seguido de leitura em espectrofotômetro (Shanghai Spectrum, SP-2000UV/2000UVPC). Por fim, foi observada uma absorbância de 0,135 a 660 nm, que segundo a escala de McFarland corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, atingindo 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) de *S. aureus* (Santos, *et al.*, 2018).

5.2 *Análises in vitro*

5.2.1 *Estimativa de absorção de luz da própolis verde*

Para se estimar os comprimentos de onda em que a própolis verde absorve luz, foi realizada uma análise de varredura utilizando um espectrofotômetro de absorção molecular (Shimadzu, UV Spectrophotometer UV-1800), avaliando a faixa entre 400 e 800 nm.

5.2.2 *Fonte de luz LED*

Foi utilizado o dispositivo protótipo número 1.012960-3 (MM Optics), que fornece três cores diferentes de luz LED, com os seguintes parâmetros mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros de luz utilizadas neste estudo.

Cor da luz	Intensidade do Equipamento	Emissão de luz (nm)	Intensidade de Energia (mW/cm ²)	Fluência em 5 minutos (J/cm ²)	Fluência em 10 minutos (J/cm ²)	Fluência em 15 minutos (J/cm ²)
Azul	Baixa		13	3.9	7.8	11.7
	Intermediária	450 ± 20	18	5.4	10.8	16.2
	Alta		22	6.6	13.2	19.8
Verde	Baixa		6	1.8	3.6	5.4
	Intermediária	550 ± 20	7	2.1	4.2	6.3
	Alta		8	2.4	4.8	7.2
Vermelho	Baixa		5	1.5	3.0	4.5
	Intermediária	660 ± 20	9	2.7	5.4	8.1
	Alta		12	3.6	7.2	10.8

nm: nanômetros; mW/cm²: miliwatts por centímetro quadrado; J/cm²: Joules por centímetros quadrados.

5.2.3 *Desenho experimental: avaliação da responsividade da própolis verde a diferentes cores de luz LED*

Para avaliar o efeito fotodinâmico da própolis verde estimulada por luz LED, 1,5 x 10⁶ UFC de MRSA solubilizado em 10 µL de solução salina foram adicionados aos poços das placas de 24 poços. Em seguida, foram adicionados aos poços 50 µL de própolis verde em diferentes concentrações e nos grupos controle foram adicionados 50 µL do veículo (propilenoglicol). Finalmente, foi adicionada solução salina estéril para atingir um volume final de 1000 µL por poço, resultando em uma concentração de 1,5 x 10⁶ UFC de MRSA. Após a adição de todos os componentes, foi respeitado um tempo de pré-irradiação de 5 minutos em todos os grupos. Em seguida, os grupos com própolis verde receberam tratamento com luz LED, com cores e intensidades variadas, por 5, 10 ou 15 minutos, conforme descrito na Tabela 1. Os controles não foram expostos à luz LED ou não receberam própolis verde. Após o tratamento, 10 µL de cada poço foram cultivados pela técnica de *pour plate* em placas contendo meio de cultura BHI, seguido de incubação em incubadora (Sterilifer, SX1.3DTMC) por 24 horas a 37° C. Por fim, a quantificação de UFC foi realizada usando um contador de colônias (Phoenix Lufesco, CP -608 Plus). Todos os procedimentos foram realizados em ambiente escuro, sem incidência direta de luz natural ou artificial.

5.2.4 Teste do potencial Zeta

Sabe-se que moléculas aderidas à superfície celular podem interferir na carga superficial das células (Li *et al.*, 2015). Portanto, o potencial zeta tem sido utilizado para sugerir potenciais interações do FS com estruturas celulares, indicando a possível localização do FS na célula alvo (Fang *et al.*, 2016). Com base nisso, a determinação do potencial zeta foi realizada conforme Fang e colaboradores (2016). Resumidamente, 30 µg de própolis verde foram incubados com suspensões bacterianas de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL por 1 h no escuro a 37 °C. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 6.000 rpm por 10 minutos e lavadas três vezes com PBS. Finalmente, *S. aureus* foi ressuspensão em água ultrapura e o potencial zeta foi determinado utilizando o Zetasizer/Nanoseries modelo ZEN3601 (Malvern Instruments Ltd., UK) a 25°C.

5.2.5 Análise de LC-DAD-MS/MS

Os extratos de própolis verde foram diluídos em mistura de metanol e água (70:30, v/v) até atingir a concentração de 1,0 mg mL⁻¹. Posteriormente, o extrato foi purificado por partição com hexano e filtrado utilizando filtros de membrana de poli(tetrafluoroetileno) (13 mm, tamanho de poro de 0,22 µm; Millex®, Millipore, EUA). O extrato purificado foi então submetido à análise usando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a técnicas de detecção de arranjo de diodos e espectrometria de massas em tandem (HPLC-DAD-MS/MS), realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O volume de injeção para análise foi de 20 µL. Para essas análises, foi utilizado um sistema HPLC (Shimadzu) acoplado a um espectrômetro de massas microOTOF QII QqTOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) equipado com uma fonte de ionização por eletrospray, operando em modo de ionização positiva e negativa separadamente. A separação cromatográfica foi realizada em coluna Luna C18 (100 Å, 5 µm, 250 mm x 4,6 mm) (Phenomenex®, Torrance, CA, EUA), utilizando água (fase A) e acetonitrila (fase B) como fase móvel, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico, com vazão de 1,0 mL min⁻¹. Um gradiente foi aplicado de 5% a 100% da fase B durante 50 min seguido de 100% da fase B por 5 min. A temperatura da coluna foi mantida a 35°C. Fonte de íons: ESI, placa terminal: 450 V, tensão capilar: 3500 V, temperatura secagem: 220 °C, gás seco: 9,0 L min⁻¹, faixa m/z: 50–1500, pressão do gás nebulizador: 4,5 Bar. O nitrogênio foi usado como gás de secagem e colisão. Uma abordagem não direcionada foi empregada no espectrômetro de

massas, onde o analisador selecionou íons com intensidade aumentada para fragmentação. Foi utilizada uma rampa de energia de colisão de 20 a 65 eV. O software Bruker Compass DataAnalysis 4.3 (Bruker Daltonics, Boston, MA, EUA) foi utilizado para a avaliação de todos os dados de espectrometria de massa.

5.2.6 *Análise clássica de redes moleculares*

A plataforma GNPS ([//gnps.ucsd.edu](http://gnps.ucsd.edu)) foi utilizada para criar a rede molecular através de um fluxo de trabalho online ([//ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/](http://ccms-ucsd.github.io/GNPSDocumentation/)). Após a filtragem de dados, todos os íons fragmentos dentro de +/- 17 Da do precursor m/z foram removidos. Apenas os 6 principais íons de fragmentos na janela de +/- 50Da foram escolhidos em todos os espectros MS/MS filtrados pela janela. A tolerância à massa do íon precursor foi definida como 0,05 Da e uma tolerância ao íon do fragmento MS/MS foi definida como 0,05 Da. Com base nesses parâmetros, uma rede molecular foi gerada com os seguintes critérios: as bordas foram estabelecidas com pontuação de cosseno acima de 0,55 e mais de 4 picos correspondentes. Além disso, as arestas entre dois nós foram retidas na rede somente se cada um dos nós aparecesse entre os 10 principais nós do outro. O tamanho máximo de uma família molecular foi definida como 100, e outras arestas com pontuações mais baixas foram removidas até que o tamanho da família molecular estivesse dentro deste limite. Posteriormente, os espectros dentro da rede foram cruzados com as bibliotecas espectrais do GNPS. Para serem retidas, as correspondências entre espectros de rede e espectros de biblioteca tiveram que atender aos seguintes critérios: uma pontuação acima de 0,55 e um mínimo de 4 picos correspondentes (Aron *et al.*, 2020; Pilon *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2016). A visualização e edição da rede molecular foram realizadas utilizando Cytoscape versão 3.8.0 (Shannon *et al.*, 2003). Os dados de LC-MS/MS foram depositados no Ambiente Virtual Interativo de Espectrometria de Massa (MassIVE) em <https://massive.ucsd.edu/>. Os dados resultantes estão acessíveis sob o número de acesso MassIVE MSV000086044 (modo de ionização positivo e negativo) e na plataforma GNPS (<https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=2780251ba8474f8caeb3e32be528022a>).

5.2.7 Anotação de dados

Os espectros EM/EM dos nós da rede molecular foram comparados com a biblioteca espectral GNPS e os compostos correspondentes foram anotados. Os espectros de massa obtidos no modo de ionização positiva foram selecionados para análise, pois formaram melhores interações dentro da rede molecular. As substâncias que correspondem aos compostos estruturalmente caracterizados da biblioteca espectral GNPS e aqueles presentes em seus *clusters* foram comparados com informações adicionais, em nossos estudos anteriores (Amaral *et al.*, 2017; Silva-Junior *et al.*, 2019), padrões de fragmentação e publicações anteriores (Clifford *et al.*, 2006; Demarque *et al.*, 2016; Pilon *et al.*, 2019) e, em seguida, anotados.

5.2.8 Avaliação da citotoxicidade da própolis verde brasileira em eritrócitos

A citotoxicidade da própolis verde brasileira foi avaliada em placa de 96 poços através da determinação de sua atividade hemolítica em eritrócitos obtidos de sangue de cabra, conforme protocolo adaptado (Fischer *et al.*, 2003). Resumidamente, eritrócitos obtidos de sangue caprino foram isolados, lavados e expostos a diferentes concentrações de própolis verde brasileira (entre 1 µg/mL e 100 µg/mL), compreendendo também para análise os grupos controle solução salina e veículo (5% propilenoglicol + 95 % salina). Por fim, o perfil de hemólise foi avaliado por espectrofotometria a 540 nm.

5.2.9 Avaliação da toxicidade da própolis verde brasileira em células nucleadas

Para determinar a toxicidade em células nucleadas, foram utilizadas células endoteliais humanas (*Human Endothelial Cells* - HUVEC), conforme protocolo descrito por Gimenes e colaboradores (2017) (Gimenes *et al.*, 2017). Sucintamente, as células HUVEC foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, 2 mM de piruvato de sódio, 1 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina, e mantido a 37°C em 5% de CO₂. Todas as linhas celulares foram confirmadas como livres de micoplasma por teste de PCR de micoplasma. Após o cultivo, as células HUVEC foram expostas a diferentes concentrações de própolis verde (entre 1 µg/mL e 100 µg/mL), sendo os grupos solução salina e veículo (5% propilenoglicol + solução salina 95%) adicionados como controles. Finalmente, a citotoxicidade foi medida pelo ensaio MTT, através da determinação da atividade metabólica das células.

5.3 Análises *in vivo*

5.3.1 Animais

Camundongos Balb/c com idade de seis a oito semanas foram obtidos no biotério do Instituto Multidisciplinar em Saúde – *Campus* Anísio Teixeira da Universidade Federal da Bahia (IMS-CAT UFBA). Os animais foram mantidos em condições de temperatura controlada com livre acesso a água e comida. Todos os procedimentos envolvendo animais estiveram de acordo com os protocolos aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do IMS-CAT UFBA sob protocolo nº 111/2022. O inóculo bacteriano nos animais foi realizado utilizando o modelo de infecção intradérmica de ouvido segundo Muniz e colaboradores (2021).

5.3.2 Desenho experimental

Todos os animais foram infectados por via intradérmica nas orelhas direita e esquerda com a quantidade de 10^8 UFC da cepa *S. aureus* MRSA 43300. Para estabelecer a infecção, os animais foram monitorados por 24 horas, para que fossem realizados os tratamentos adequados.

Vinte e quatro horas após a infecção, os animais foram divididos em 4 grupos (n = 6 por grupo). O grupo controle recebeu 10 µL de solução estéril composta por soro fisiológico 95% e propilenoglicol 5% (veículo). O grupo controle do fotossensibilizador (própolis verde) recebeu via injeção com seringa 10 µL da solução contendo 10 µg de própolis verde brasileira. O grupo controle de luz (LED azul) recebeu 10 µL do veículo e, após um período de 5 minutos (pré-irradiação), recebeu luz LED azul (450 ± 20 nm), através do protótipo número 1.012960 (MM Optics). Por fim, o grupo tratado com o protocolo TFA (aPDT) recebeu 10 µL da solução contendo 10 µg de própolis verde brasileira e, após um período de 5 minutos (pré-irradiação), recebeu luz LED azul (450 ± 20 nm). Todos os protocolos de tratamento foram realizados em ambiente escuro, sem incidência direta de luz natural ou artificial.

Nos animais que receberam luz LED azul, a irradiação foi realizada utilizando o fotopolimerizador O-Light (MM Optics) por 180 segundos, com intensidade de 75 mW/cm² e fluência de 13,5 J/cm². Para aplicação da luz, o equipamento foi posicionado a 1 cm da superfície do local da infecção. Todas essas etapas foram realizadas em ambiente escuro.

Quarenta e oito horas após os tratamentos, os animais foram eutanasiados por infusão de anestésico, através da inoculação de cetamina (Vetnil) e xilazina (Vetnil), nas

doses de 400 mg/kg e 40 mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal. Um resumo gráfico do desenho experimental é apresentado na Figura 1.

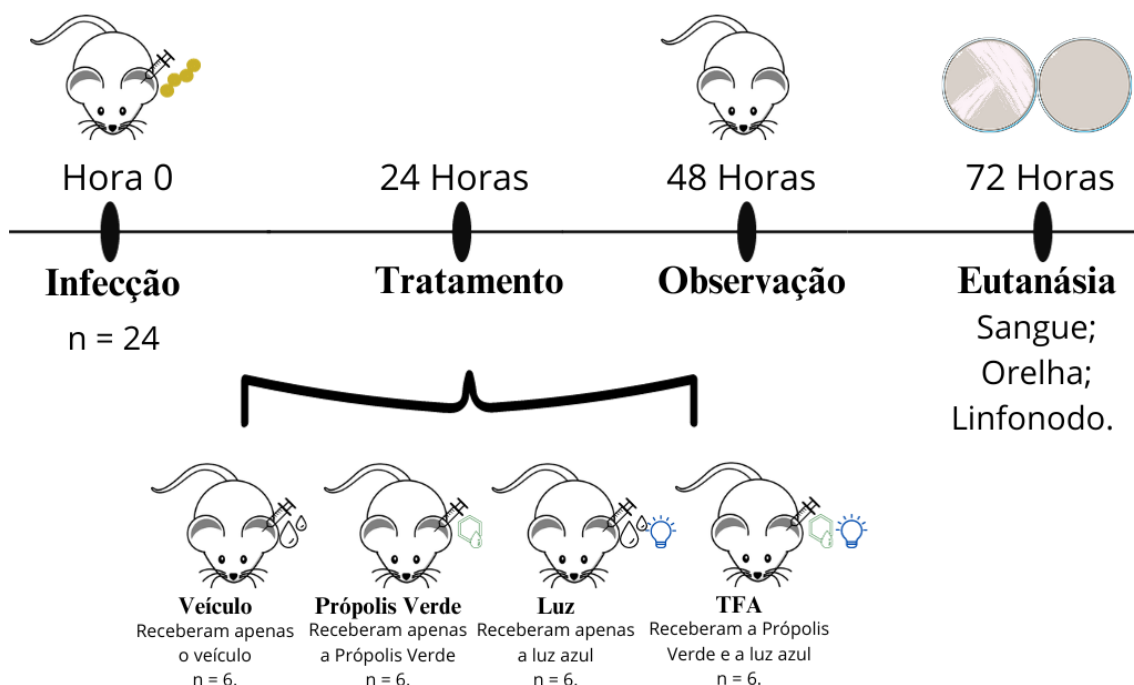


Figura 1. Desenho experimental das análises em modelo animal de infecção intradérmica. Na hora 0, os animais foram infectados nas duas orelhas com $1,5 \times 10^8$ UFC de MRSA. Após 24 horas da infecção, os animais foram expostos ao veículo de preparo da própolis verde, à 10 μ g de própolis verde, à luz LED azul ou ao protocolo de TFA (10 μ g de própolis verde + luz LED azul). 48 horas após a infecção, os animais foram eutanasiados e coletou-se as orelhas, o linfonodo retromaxiliar drenante e o sangue. TFA: terapia fotodinâmica antimicrobiana. n = 24 (6 animais por grupo).

5.3.3 Avaliação do peso corporal

Os animais foram pesados em balança semianalítica (Marte, AD4200) diariamente, no mesmo horário, durante os 4 dias do experimento, sendo pesados no momento da infecção (hora 0), antes do tratamento (24 horas após a infecção), 24 horas após o tratamento (48 horas após a infecção) e no momento da eutanásia (72 horas após a infecção). Após a pesagem, foram realizadas análises de variação percentual do peso em cada animal ao longo do experimento.

5.3.4 Análises hematológicas

As análises hematológicas foram realizadas de acordo com Galantini e colaboradores (2022) (GALANTINI *et al.*, 2022). Em resumo, foi coletado sangue periférico de um vaso de grande calibre acessado pela abertura da cavidade peritoneal dos

animais eutanasiados. Em seguida, 20 μL de sangue foram adicionados em 380 μL de Azul de Turk, para a contagem total de células em câmara de Neubauer. Para a contagem diferencial dos leucócitos, 10 μL de sangue foi adicionado em uma lâmina de vidro e realizado o esfregaço sanguíneo, posteriormente corado com o kit de coloração Panóptico Rápido e foi realizada a contagem diferencial em microscópio óptico.

5.3.5 *Medida da lesão na orelha*

A lesão na orelha foi medida 24 horas após a infecção e no dia da eutanásia, utilizando paquímetro digital 150mm/6" com resolução de 0,01mm (Kala), sendo coletadas as medidas de largura, comprimento e espessura.

5.3.6 *Obtenção e processamento das orelhas*

Após a eutanásia, as orelhas dos animais foram coletadas e as áreas de interesse foram seccionadas. A orelha direita foi utilizada para análises histopatológicas, enquanto a orelha esquerda foi utilizada para determinar a carga bacteriana e a peroxidação lipídica.

Para análises histopatológicas, os tecidos foram fixados em solução Metacarn por 24 horas, sendo posteriormente processados e incluídos em parafina (Casa Álvarez Material Científico S.A.). Fatias medindo 5 μm foram preparadas e depois coradas usando um protocolo padrão de coloração com hematoxilina (Laborclin) e eosina (Laborclin, EA36). Vinte campos de imagem foram fotomicrografados para análise morfométrica para contagem do número total de células inflamatórias, mononucleares e polimorfonucleares, realizada com auxílio do software Image J (versão 1.50b).

Para determinação da carga bacteriana, os tecidos foram macerados em 1 mL de solução salina estéril (Vita & Saúde). Dez μL dessa suspensão foram cultivados pela técnica de *pour plate* em meio BHI ágar com oxacilina (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubados por 24 horas a 37°C. Após a incubação, as colônias bacterianas foram quantificadas utilizando um contador de colônias (Phoenix Lufesco, CP -608 Plus).

5.3.7 *Obtenção do linfonodo drenante e quantificação das citocinas*

O linfonodo retromaxilar esquerdo foi removido e macerado em 1 mL de solução salina estéril (Vita & Saúde). Logo após, a suspensão linfonodal foi utilizada para dosagem das citocinas IL-10, IL-1 β , TNF- α , IL-17A e IL-12p70 pelo método *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), de acordo com as recomendações do fabricante nos kits específicos (Invitrogen™).

5.3.8 *Peroxidação lipídica*

A peroxidação lipídica foi avaliada pela dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na orelha infectada, conforme protocolo de Dias e colaboradores (Dias *et al.*, 2023). Para isso, foi utilizado o kit comercial TBARS Assay (Método TCA), seguindo as instruções do fabricante (Cayman Chemical). As leituras da reação foram realizadas em um espectrofotômetro de microplacas (VersaMax, Molecular Devices).

5.4 Desenvolvimento de composição microemulsionada de própolis verde Brasileira

5.4.1 Obtenção da microemulsão

Para a obtenção da microemulsão, as proporções de fase oleosa, fase aquosa, tensoativo e cotensoativos foram selecionadas após construção de diagrama de fases pseudoternário por método titulométrico. Após construção do diagrama de fases pseudoternário, foi selecionado da seguinte composição: 12,9% de Miristato de Isopropila (fase oleosa), 25,8% de Tween 80 (tensoativo), 25,8% de Propilenoglicol (cotensoativo) e 35,48% de água destilada.

5.4.2 Avaliação das características físico-químicas da microemulsão

Foram realizados os testes para a avaliação da microemulsão quanto ao tamanho das partículas, ao índice de polidispersividade (PDI) e ao potencial zeta. Para isso, a microemulsão foi diluída em água ultrapura na proporção de 1:100 v/v e as análises foram realizadas utilizando o aparelho Zetasizer/Nanoseries modelo ZEN3601 (Malvern Instruments Ltd., Reino Unido), à 25°C, usando-se as referências de índice de refração e viscosidade da água pura. Para o PDI, foi utilizado um ângulo fixo de 173°. Todas as análises foram realizadas em triplicatas e os dados foram coletados e analisados usando o software Zetasizer (v.6.12). A determinação do pH das amostras foi realizada através do medidor de pH MSTecnopom Instrumentação®, modelo mpA-210. Em seguida, a própolis verde brasileira foi incorporada à microemulsão nas proporções de 1/10 (1 parte de própolis verde para 10 partes dos compostos referentes a formação da microemulsão) e 1/1 (1 parte de própolis verde para 1 partes dos compostos referentes a formação da microemulsão) de própolis verde, sendo essas composições também analisadas quanto aos parâmetros supracitados.

Após essas análises iniciais, o pH das microemulsões contendo a própolis verde foi ajustado com trietanolamina para que ficassem com valores em torno de 6,5. Em seguida, as amostras foram armazenadas por 24 e 48 horas, a fim de se avaliar se a microemulsão apresentava estabilidade.

5.4.3 *Teste preliminar de estabilidade*

A partir dos resultados obtidos, decidiu-se seguir com as análises da estabilidade com a microemulsão com própolis verde à 1/1. Para a avaliação preliminar da estabilidade, o sistema microemulsionado contendo a própolis verde foi centrifugado imediatamente após o seu preparo a 150g por 30 minutos em temperatura ambiente, para determinação de sua estabilidade como um sistema isotrópico monofásico.

5.4.4 *Teste de estresse térmico*

Para a condução do teste de estresse térmico, a microemulsão com própolis verde foi submetida a aquecimento (estufa - faixa de 40 a 80 °C ± 5°C) com ciclos de 30 minutos, com incrementos de 5°C após cada ciclo.

5.4.5 *Análise preliminar de estabilidade*

Para a análise preliminar da estabilidade, a microemulsão com própolis verde foi submetida à três ciclos de aquecimento à 40°C (em estufa) por 24 horas e resfriamento entre 2° e 8° C (em geladeira) por 24 horas, de modo que cada ciclo consistia em 24 horas de aquecimento mais 24 horas de resfriamento.

5.4.6 *Avaliação do efeito fotodinâmico antimicrobiano da microemulsão contendo própolis verde brasileira por método de difusão em meio sólido*

A determinação do efeito antimicrobiano da própolis verde brasileira por difusão em meio sólido foi realizada conforme protocolo adaptado de Zhang e colaboradores (Zhang *et al.*, 2010). Resumidamente, $1,5 \times 10^4$ de MRSA foi semeado pelo método de *pour plate* em meio de cultura BHI. Após a solidificação do meio de cultura, foram confeccionados poços utilizando tubos estéreis (diâmetro 5 mm) que foram preenchidos com 100 µL da microemulsão contendo ou não a própolis verde brasileira. Discos de difusão com vancomicina foram utilizados como controle positivo. Em seguida, os grupos tratados com luz azul foram fotoativados por 15 minutos em intensidade alta através do protótipo número 1.012960 (MM Optics). Por fim, após o tratamento, as placas foram incubadas (Incubadora Sterilifer, SX1.3DTMC) por 24 horas a 37° C.

5.4.7 *Análises estatísticas*

As análises estatísticas dos experimentos foram desenvolvidas utilizando o software GraphPad Prism (versão 8.0, GraphPad Program Inc.). Inicialmente, foi realizado o teste

de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade dos dados. Em seguida, quando aplicáveis, foram realizados testes paramétricos (teste t pareado e ANOVA) e testes não paramétricos (Mann-Whitney, Wilcoxon e Kruskal-Wallis). O teste de comparações múltiplas de Tukey (dados paramétricos) e o teste de comparações múltiplas de Dunn (dados não paramétricos) foram utilizados como post-hoc.

A análise de correlação entre citocinas foi construída utilizando a matriz de correlação através do *R-package corrplot*, conforme Ribeiro e colaboradores (Ribeiro *et al.*, 2019), com base nas correlações de postos de Spearman com ordenação das variáveis de acordo com a primeira análise de componentes principais. Por fim, as análises da rede bayesiana foram construídas segundo Gonçalves e colaboradores (Gonçalves *et al.*, 2022), usando o pacote R *bnlearn* 4.5 e *bnviewer* 0.1.4. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas nos valores de p: * < 0,05; **<0,01; *** < 0,001; ****<0,0001.

6. RESULTADOS

6.1 A própolis verde possui maior absorção de luz na faixa entre 400nm e 450nm

Ao realizar o teste de absorção de luz com a própolis verde, observou-se que ela apresenta pico de absorção de luz na faixa entre 400nm e 450nm, faixa de comprimento de onda muito próxima da luz azul ($450\text{nm} \pm 20$). Nenhuma evidência significativa de absorção foi observada na faixa de 550 nm, que corresponde à luz verde. Por fim, foi observada uma leve absorção de luz na faixa de 660 nm, comprimento de onda que corresponde à luz vermelha (Fig. 2).

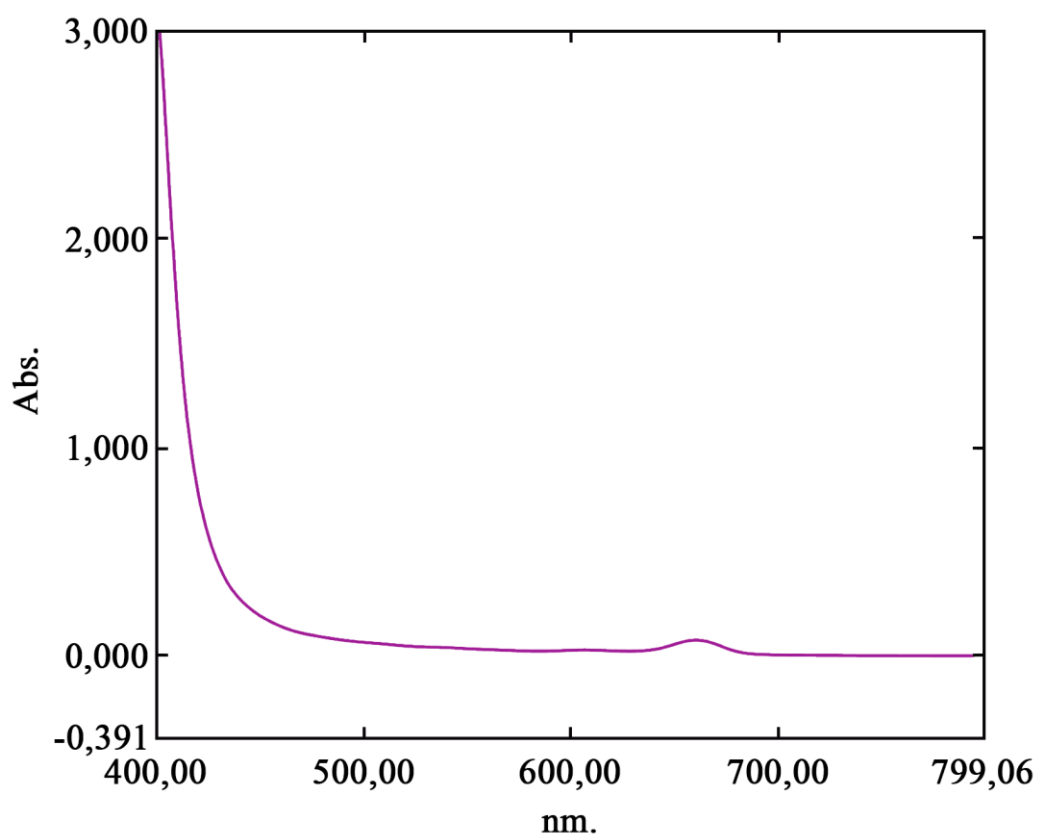


Figura 2. Análise da atividade fotodinâmica da própolis verde a partir do teste de absorção de luz. Foi analisada uma solução de própolis verde na concentração de 2.000 $\mu\text{g/mL}$. Foi observado um pico de absorção na faixa de 400 nm a 450 nm e uma segunda banda de absorção, muito menos intensa, estava presente no espectro de 660 nm. Abs: absorbância; nm: nanômetros.

6.2. A própolis verde brasileira tem seu efeito microbicida contra MRSA e VISA potencializado quando fotoativada por luz LED azul

A própolis verde exibiu aumento significativo em sua atividade antimicrobiana através da estimulação fotodinâmica quando irradiada com luz LED azul. Nos grupos sem estimulação com luz azul, a redução da carga bacteriana de MRSA só foi observada quando esta estava em concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 3). Porém, quando estimulada por luz LED azul por 15 minutos em alta intensidade (22 mW/cm^2), a redução da carga bacteriana de MRSA foi significativa em concentrações a partir de 5 $\mu\text{g/mL}$ (redução de 93,8% na quantidade de UFC/mL quando comparado com grupo tratado com 5 $\mu\text{g/mL}$, mas sem fotoativação) e 10 $\mu\text{g/mL}$ (redução de 100% na quantidade de UFC/mL quando comparado ao grupo tratado com 10 $\mu\text{g/mL}$, mas sem fotoativação), fenômeno não observado em nenhum dos grupos de controle (Fig. 3C). Não foi observada atividade fotodinâmica da própolis verde quando irradiada com luz LED verde ou vermelha em diferentes intensidades nos tempos de 5, 10 e 15 minutos (dados não mostrados).

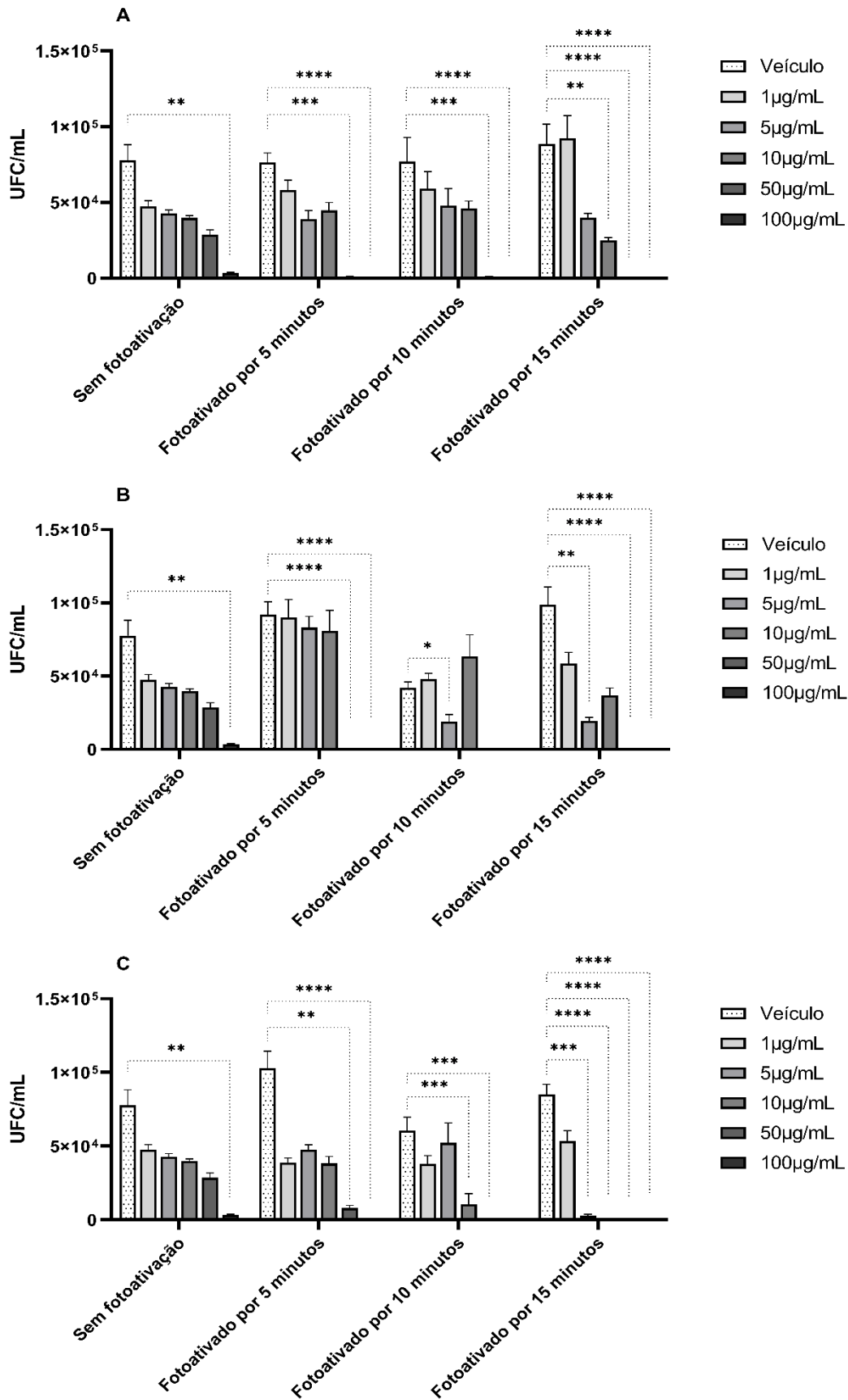


Figura 3. Avaliação da atividade fotodinâmica da própolis verde irradiada com luz LED azul contra MRSA (Log UFC/mL). Em uma placa de 24 poços, foi adicionado MRSA de forma que a concentração final em

cada poço fosse de $1,5 \times 10^6$ UFC de MRSA em 1mL de soro fisiológico e própolis verde em diferentes concentrações (1µg/mL, 5µg/mL, 10µg/mL, 50µg/mL, mL e 100µg/mL) ou seu veículo de diluição. Em seguida, a placa foi exposta a diferentes intensidades de luz LED azul por 5, 10 ou 15 minutos, conforme parâmetros apresentados na Tabela 1. (A): Luz LED azul de baixa intensidade (intensidade de energia 13 mW/cm²); (B) Luz LED azul em intensidade intermediária (intensidade de energia 18 mW/cm²); (C) Luz LED azul de alta intensidade (intensidade de energia 22 mW/cm²). Diferenças estatísticas significativas entre os grupos são indicadas pelo símbolo “***”. *: p < 0,05; **: p<0,01; ***: p < 0,001; ****: p<0,0001. n = 8. MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; UFC: unidades formadoras de colônias; µg/mL: microgramas por mililitro. mW/cm²: miliwatts por centímetro quadrado.

Após testar a atividade antimicrobiana fotodinâmica da própolis verde contra MRSA, o melhor protocolo observado (luz LED azul em alta intensidade por 15 minutos) foi utilizado para avaliar a atividade microbicida da TFA com própolis verde contra VISA. Neste teste foi apresentado que TFA com luz LED azul utilizando própolis verde como fotossensibilizador também é eficaz contra VISA, levando à redução da carga bacteriana mesmo em baixas concentrações (a partir de 5 µg/mL), características não observadas no grupo não irradiado por luz ou no grupo que não recebeu própolis verde (Fig. 4).

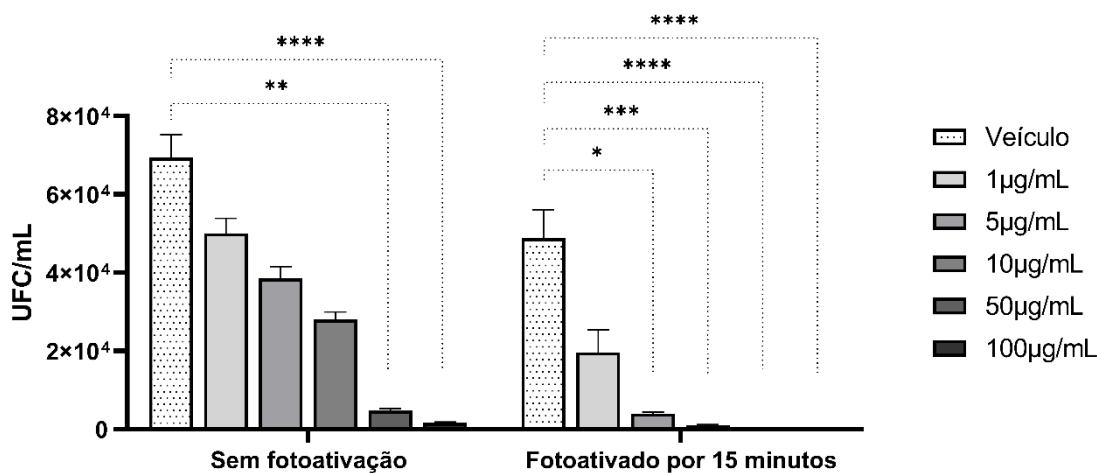


Figura 4. Avaliação da atividade fotodinâmica da própolis verde irradiada com luz LED azul contra VISA (Log UFC/mL). Em uma placa de 24 poços, foi adicionado VISA para que a concentração final em cada poço fosse de $1,5 \times 10^4$ UFC de VISA em 1mL de solução salina e própolis verde em diferentes concentrações (1µg/mL, 5µg/mL, 10µg /mL, 50µg /mL e 100µg/mL) ou seu veículo de diluição. Em seguida, a placa foi exposta à luz LED azul em alta intensidade (intensidade energética 22 mW/cm²) por 15 minutos (fluência 19,8 J/cm²), conforme parâmetros apresentados na Tabela 1. Diferenças estatísticas significativas entre os grupos são indicadas pelo símbolo “***”. *: p < 0,05; **: p<0,01; ***: p < 0,001; ****: p<0,0001. n = 8. VISA: *Staphylococcus aureus* intermediário à vancomicina; UFC: unidades formadoras

de colônias; $\mu\text{g/mL}$: microgramas por mililitro. mW/cm^2 : miliwatts por centímetro quadrado. J/cm^2 : Joules por centímetro quadrado.

A partir dos resultados obtidos, mostra-se que a própolis verde apresenta máxima atividade antimicrobiana quando ativada fotodinamicamente com luz LED azul, apresentando vários níveis de atividade que aumentam com a intensidade/fluência.

6.3. Avaliação da localização da própolis verde Brasileira em MRSA e VISA

Os potenciais zeta de MRSA e VISA foram testados após exposição, ou não, à própolis verde. Conforme mostrado na Tabela 2, a própolis verde apresenta efeitos insignificantes estatisticamente nos potenciais zeta das células bacterianas avaliadas.

Tabela 2. Análise da influência da própolis verde no potencial zeta de MRSA e VISA.

Cepas	MRSA	VISA
Branco	31.65 ± 1.05	38.07 ± 4.01
Própolis verde	30.08 ± 0.52	37.40 ± 3.74

As bactérias foram incubadas com ou sem 30 μg de própolis verde, e os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão de três ensaios independentes. Os resultados não foram estatisticamente diferentes entre os grupos com ou sem exposição à própolis verde.

6.4. Redes moleculares de compostos com efeito fotodinâmico presentes na própolis verde Brasileira

A análise da rede molecular detectou substâncias pertencentes a classe dos flavonóides derivados de flavona e derivados de ácidos mono-, di- e tricafeoilquínicos (Fig. 5). A partir da análise de rede molecular, foi possível anotar 13 substâncias, incluindo compostos curcuminóides com potencial fotodinâmico bem estabelecido, juntamente com outros flavonóides com potencial efeito fotodinâmico antibacteriano (Tabela 3).

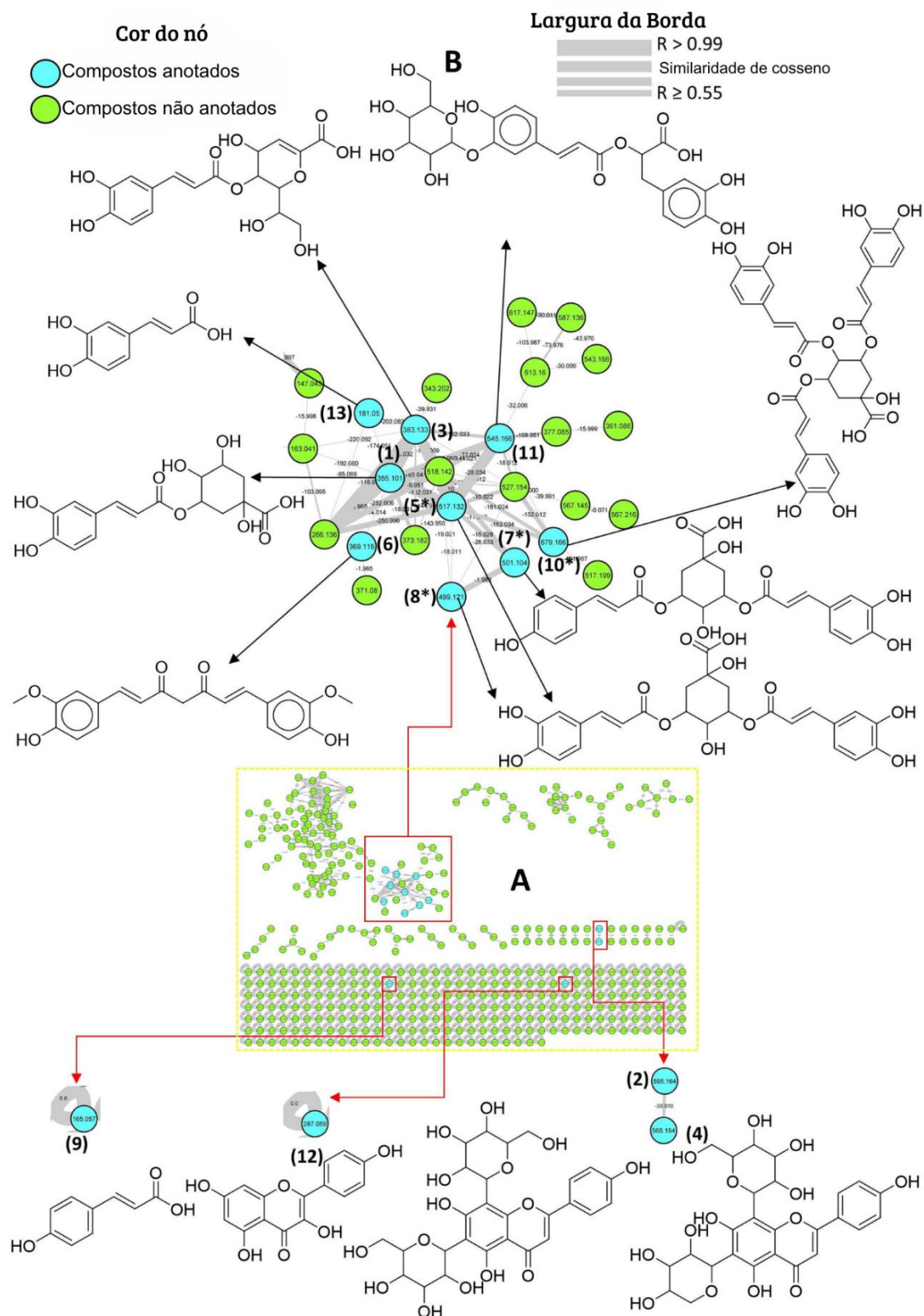


Figura 5. Rede molecular da própolis verde brasileira usando dados de HPLC-ESI-MS/MS. (A) Rede molecular completa; (B) Principais substâncias anotadas. Os nós representam substâncias. A similaridade estrutural entre as substâncias é indicada pelas conexões entre nós (arestas). (1-13) Anotação putativa usando reações de fragmentação em fase gasosa e redes moleculares. (*) A posição de esterificação não pode ser estabelecida.

Tabela 3. Dados espectrais de MS das substâncias anotadas da própolis verde brasileira.

Composto	Compostos provavelmente anotados	Índice de cluster	Rt (média)	(IES ⁺) Íon precursor ^{[M+H]⁺}	FM	(ESI ⁺) MS/MS (<i>m/z</i>)	Biblioteca ou literatura espectral GNPS
1	Ácido clorogênico	1362	20.4	355.1012	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	337; 163;145; 135 ^{BP} ; 117; 107; 89	CCMSLIB00000426818
2	Vicenina	3521	24.1	595.1623	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	577; 559; 541; 511; 499; 475; 457 ^{BP} ; 439; 427; 409; 379; 337; 325; 307	CCMSLIB00000845378
3	Derivados de ácidos hidroxicinâmicos	1831	29.2	383.0981	C ₁₇ H ₁₈ O ₁₀	163; 145; 135 ^{BP} ; 117; 107; 89	CCMSLIB00005721432
4	Isoschaftosídeo	3402	26.6	565.1528	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	547; 529; 511; 499; 481; 431; 427 ^{BP} ; 409; 391; 379; 351; 337; 325; 321; 307; 295	CCMSLIB00005778062
5	X, X-Ácido dicafeoilquínico	3168	31.3	517.1307	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	499; 337; 319; 163; 145; 135 ^{BP} ; 117; 107; 89	CCMSLIB00005721779
6	Curcumina	1612	25.9	369.1386	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	177; 149; 145; 117 ^{BP} ; 91; 89	CCMSLIB00004720857
7	X- <i>O-p</i> -Cumaroil, X- <i>O</i> -Ácido cafeoilquínico	3094	30.5	501.1009	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₁	347; 335; 319 ^{BP} ; 163; 145; 135; 117; 89	1
8	3, 5-Ácido dicafeoilquínico	3073	31.6	499.1224 ^{[M-18+H]⁺}	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	319 ^{BP} ; 163; 147; 145; 135; 117	CCMSLIB00000847510
9	Ácido <i>p</i> -cumárico	93	30.7	165.0548	C ₉ H ₈ O ₃	147; 119 ^{BP} ; 91; 61	CCMSLIB00005738459
10	X, X, X-Ácido tricafeoilquínico	3741	37.2	679.1657	C ₃₄ H ₃₀ O ₁₅	569; 499; 163 ^{BP} ; 145; 135; 117	
11	Salviaflaside	3307	36.8	545.1651 ^{[M+Na]⁺}	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₃	527; 365; 347; 293; 163; 145; 135 ^{BP} ; 117; 107; 89	CCMSLIB00004711946
12	Kaempferol	497	42.2	287.0562	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	229; 213; 153; 121 ^{BP} ; 115; 107; 105	CCMSLIB00005768275
13	Ácido caféico	135	44.6	181.0495	C ₉ H ₈ O ₄	135; 117 ^{BP} ; 107; 98; 91; 89	CCMSLIB00003136669

BP: pico base; Rt: tempo de retenção em minutos; FM: fórmula molecular.

6.5. Em baixas concentrações, a própolis verde brasileira tem atividade citoprotetora

Nas análises de citotoxicidade em eritrócitos, foi possível observar que apesar de uma tendência à toxicidade dose-dependente em concentrações mais elevadas, não houve diferenças significativas nos danos aos eritrócitos quando comparados ao grupo veículo. Esse fato indica um bom intervalo de confiança para a utilização da própolis verde como fotossensibilizante, uma vez que não há danos significativos por ela causados em concentrações de até 100 $\mu\text{g/mL}$ nas hemácias. Além disso, nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$, a própolis verde apresentou atividade citoprotetora, demonstrando um padrão de lesão menor do que as células expostas apenas à solução salina (Fig. 6A). Da mesma forma, a própolis verde não apresentou citotoxicidade quando exposta a células nucleadas (HUVEC), de forma que a viabilidade celular, avaliada a partir do metabolismo celular, não diminuiu quando foram expostas a concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$ a 100 $\mu\text{g/mL}$ de própolis verde. Curiosamente, houve aumento da atividade metabólica pelo método avaliado, fato que corrobora a percepção de citoproteção da própolis verde brasileira em células nucleadas (Fig. 6B).

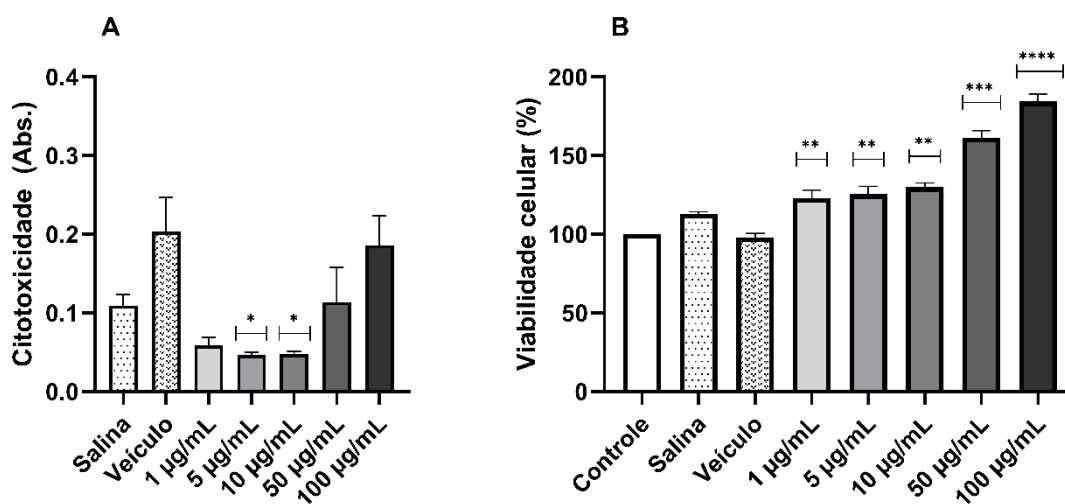


Figura 6. Avaliação da citotoxicidade da própolis verde brasileira em células anucleadas e nucleadas. (A): Avaliação da toxicidade em eritrócitos. Eritrócitos obtidos de sangue caprino foram isolados, lavados e expostos ao soro fisiológico (soro fisiológico), ao veículo de diluição de própolis verde (soro fisiológico 95% e propilenoglicol 5%) e a diferentes concentrações de própolis verde (1 $\mu\text{g/mL}$ a 100 $\mu\text{g/mL}$), com toxicidade celular determinada por espectrofotometria ($n = 8$). As diferenças entre o grupo solução salina e os demais grupos são indicadas pelo símbolo “*”. Abs.: Absorbância; *: $p < 0,05$. (B): Avaliação da

toxicidade em células HUVEC. As células foram cultivadas e expostas ao meio utilizado para cultivo (controle), soro fisiológico, veículo de diluição de própolis verde (soro fisiológico 95% e propilenoglicol 5%) e diferentes concentrações de própolis verde (1 µg/mL a 100 µg/mL), com toxicidade celular determinada por espectrofotometria (n = 3). A partir dos parâmetros obtidos pelo grupo “controle”, foi determinado o percentual de alteração na viabilidade celular dos demais grupos quando comparado ao grupo “controle”. As diferenças entre o grupo controle e os demais grupos são indicadas pelo símbolo “*”. **: p<0,01; ***: p < 0,001; ****: p<0,0001.

6.6. Própolis verde brasileira previne perda de peso por infecção independente da TFA

Sistemicamente, independente da fotoativação, os animais que receberam própolis verde Brasileira apresentaram melhor recuperação do peso corporal perdido em decorrência da infecção. Esse fato não foi observado nos grupos que receberam apenas veículo ou luz azul, de modo que nesses grupos houve perda de peso significativa 24 horas após a infecção, sem recuperação estatisticamente significativa mesmo 72 horas após a infecção (Fig. 7A). Nas análises hematológicas, por sua vez, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na contagem total ou diferencial de leucócitos (Fig. 7B e 7C).

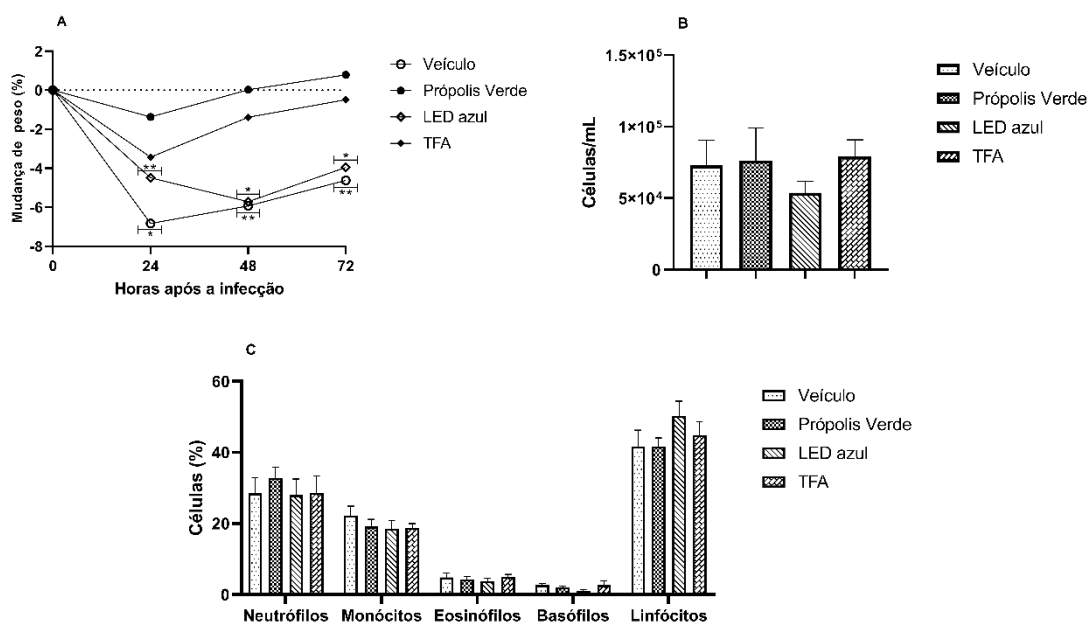


Figura 7. Avaliação dos efeitos sistêmicos da TFA com própolis verde brasileira. (A): Peso do animal desde o dia da infecção (hora 0) até a eutanásia (72 horas após a infecção). “*” indicam diferenças significativas entre os pesos dos animais do mesmo grupo ao longo do tempo. (B): Quantificação total de

leucócitos no sangue dos animais após eutanásia. (C): Quantificação diferencial de leucócitos no sangue de animais após eutanásia. (n = 4-6); *: p < 0,05; **: p < 0,01.

6.7. TFA com própolis verde brasileira como fotossensibilizador reduz a carga bacteriana no local da infecção

Os animais que receberam própolis verde sem fotoativação apresentaram menor tamanho da lesão 48 horas após o tratamento, fato não observado nos animais que receberam própolis verde e foram submetidos à fotoativação (Fig. 8A). Porém, apenas o protocolo TFA completo (aPDT) utilizando a própolis verde brasileira como composto fotossensibilizante foi capaz de reduzir significativamente a carga bacteriana nas orelhas dos animais, quando comparado ao grupo que recebeu apenas o veículo. Não foram observadas diferenças significativas entre o grupo tratado apenas com veículo e os grupos que receberam própolis verde sem fotoativação ou apenas luz LED azul (Fig. 8B).

Animais que receberam luz com ou sem presença de própolis verde apresentaram menor peroxidação lipídica, indicada pelo TBARS (Fig. 8C). Porém, apenas os animais tratados com TFA apresentaram aumento significativo no número total de células, bem como de células neutrófilos, conhecidas por serem as principais células efetoras no combate às bactérias extracelulares (Fig. 8D-G). Portanto, observa-se que a TFA com própolis verde brasileira induz tanto redução na carga bacteriana quanto modula o perfil de células recrutadas para o local da infecção.

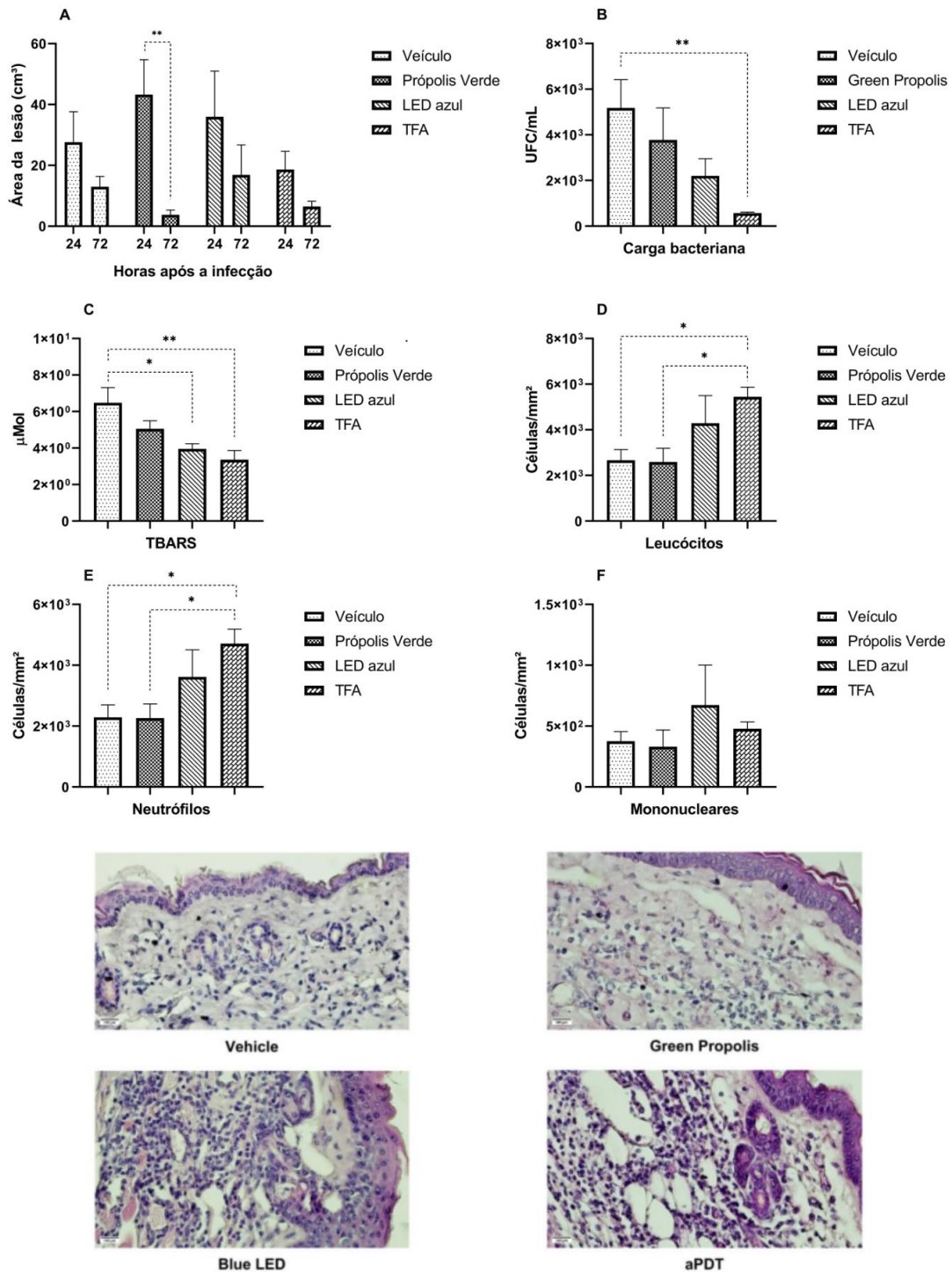


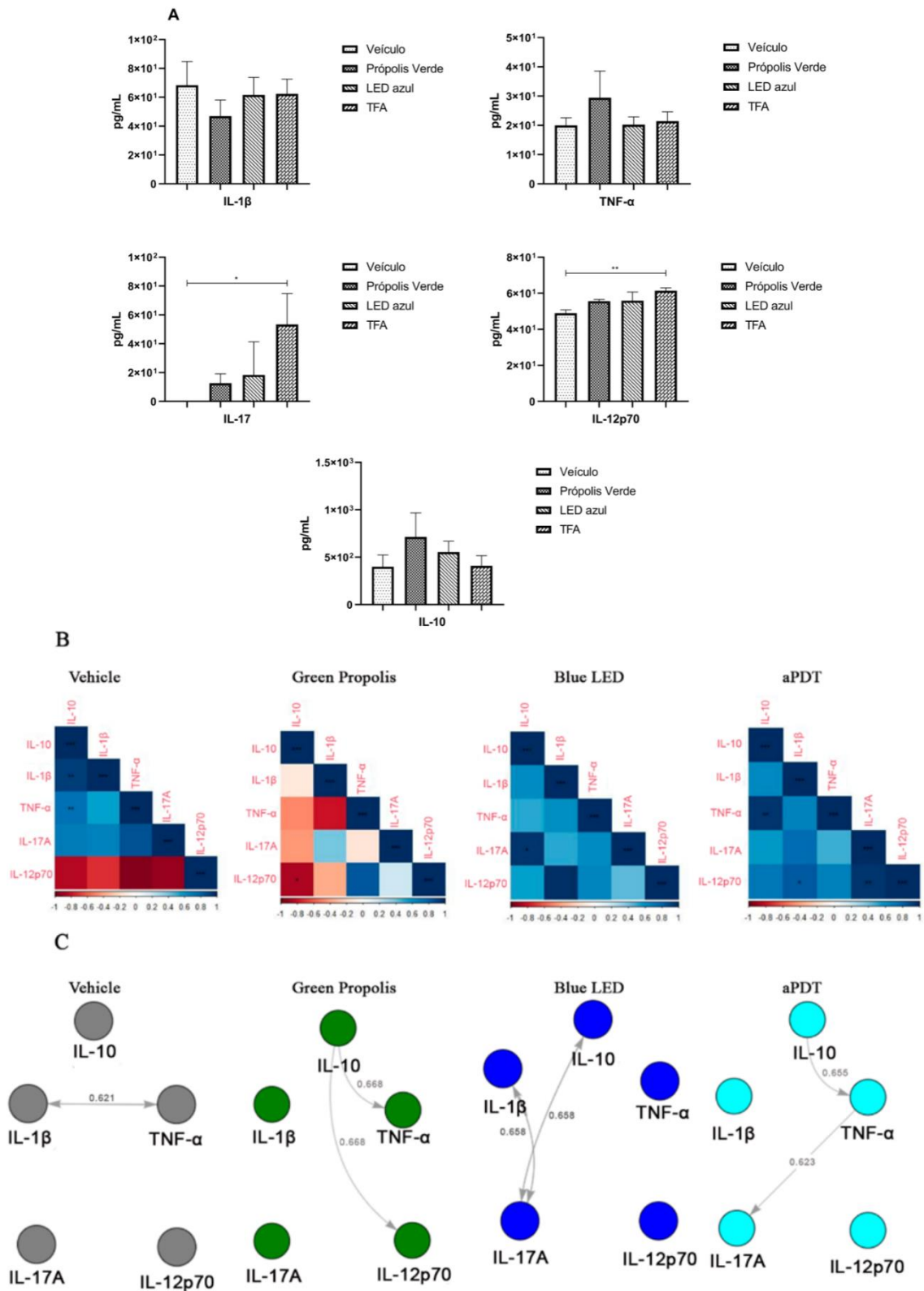
Figura 8. Avaliação dos efeitos da TFA na orelha. (A): Mensuração da lesão no dia do tratamento (24 horas após a infecção) e no dia da eutanásia (72 horas após a infecção). (B): Determinação da carga bacteriana na orelha por contagem de UFC. (C): Análise da peroxidação lipídica por TBARS. (D): Contagem total de leucócitos na orelha. (E): Contagem diferencial de neutrófilos na orelha. (F): Contagem diferencial de mononucleares na orelha. (G): Imagens histológicas representativas de cada grupo observadas com ampliação de 400x. n = 4-6. *: p < 0,05; **: p < 0,01.

6.8. TFA com própolis verde brasileira modula a resposta inflamatória aumentando a expressão de IL-17A e IL-12p70

Nas análises da modulação inflamatória do perfil de citocinas, obtidas do linfonodo drenante retromaxilar, observou-se que a TFA com própolis verde brasileira induziu aumento significativo nas concentrações de IL-17A e IL-12p70, quando comparada aos animais que receberam apenas o veículo. Não houve aumento significativo nos animais tratados apenas com fotossensibilizador ou com luz (Fig. 9A).

O grupo tratado com TFA apresentou correlação positiva na produção de IL-17A e IL-12p70, fato não observado em nenhum dos demais grupos. Curiosamente, o grupo que recebeu apenas o veículo não apresentou nenhum tipo de correlação entre IL-17A e IL-12p70, o grupo que recebeu apenas própolis verde brasileira apresentou correlação negativa entre IL-12p70 e IL-10 e o grupo que recebeu apenas a luz LED azul mostrou uma correlação positiva entre IL-17A e IL-10 (Fig. 9B).

Finalmente, as análises da rede bayesianas demonstraram diferentes perfis regulatórios entre citocinas nos diferentes grupos. No grupo que recebeu o veículo foi observada apenas a regulação da expressão conjunta de IL-1 β e TNF- α . No grupo que recebeu apenas própolis verde brasileira foi observada a influência da IL-10 na expressão de TNF- α e IL-12p70. No grupo que recebeu apenas luz, foi observada regulação bidirecional da citocina IL-17A com IL-10 e IL-1 β . No grupo tratado com TFA, por sua vez, foi mantida parte da regulação observada nos grupos que receberam apenas própolis verde brasileira ou luz LED azul, com a IL-10 interferindo na expressão do TNF- α , e esta última regulando a expressão de IL-17A (Fig. 9C). Assim, a TFA com própolis verde brasileira foi capaz de modular a resposta inflamatória mediada por citocinas tanto por aumentar diretamente a expressão de IL-17A e IL-12p70 quanto por modular a regulação da expressão de citocinas.



do pacote R *corrplot*. (C): Rede de interações bayesianas entre citocinas. As setas indicam causalidade e todas mostram o grau de força de inferência de uma variável em relação a outra. Os pacotes utilizados para construir as redes bayesianas foram *bnlearn* e *bnviewer*. n = 4-6; *: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001; ****: p < 0,0001.

6.9. Composição microemulsionada com própolis verde Brasileira é estável e passível de utilização em TFA

Após os testes utilizando-se a própolis verde Brasileira *in natura*, desenvolveu-se composição microemulsionada incorporada com a própolis verde, a fim de se observar se tal produto apresentava as características desejadas sob a perspectiva farmacotécnica, no que se refere ao tamanho das partículas, ao índice de polidispersividade (PDI), ao potencial zeta e ao pH dessa microemulsão. Assim, observou-se que composição na proporção de 1/1 de própolis verde/demais componentes da microemulsão apresentou melhores parâmetros farmacotécnicos quando comparado a composição na proporção de 1/10 (Tabela 4).

Tabela 4. Caracterização da microemulsão logo após o preparo.

Composição	Tamanho da Partícula (nm)	Índice de Polidispersividade (PDI)	Potencial Zeta	pH
Microemulsão sem a própolis verde	118,6	0,247	-7,97	6,0
Microemulsão com Própolis verde à 1/10	144,1	0,171	-19,5	5,4
Microemulsão com própolis verde à 1/1	26,83	0,444	-21,75	5,1

Tais parâmetros foram acompanhados por 24 e 48 horas, a fim de se observar se as composições apresentavam estabilidade inicial. Os resultados estão demonstrados na tabela 5.

Tabela 5. Avaliação da microemulsão com própolis verde 24 e 48 horas após o preparo.

Composição	Tempo após o preparo	Tamanho da Partícula (nm)	PDI	Potencial Zeta	pH
Microemulsão com Própolis verde à 1/10	24 horas	170,6	0,131	-18,0	6,8
	48 horas	239,8	0,116	-60,2	6,8
Microemulsão com própolis verde à 1/1	24 horas	20,61	0,376	-19,7	6,2
	48 horas	26,33	0,423	-30,6	6,2

A partir dos resultados obtidos, decidiu-se seguir com as análises da estabilidade com a microemulsão com própolis verde à 1/1. Por conseguinte, foram realizados os testes para se avaliar a estabilidade da microemulsão com própolis verde a fim de se avaliar se ela se mantinha estável após estímulos estressores. Como resultado, a microemulsão com própolis verde brasileira manteve-se estável após os testes de centrifugação. Nesse sentido, constatou-se que a microemulsão com própolis verde após o teste preliminar de estabilidade, o teste de estresse térmico e o teste de estabilidade preliminar, não apresentando variações significativas nos parâmetros aqui avaliados (Tabela 6).

Tabela 6 – Estudo de estabilidade da microemulsão contendo a própolis verde.

Teste	Aspecto Macroscópico	Tamanho da Partícula (nm)	PDI	Potencial Zeta	pH	Condutividade (mS/cm)	
Centrifugação	Antes	Translúcido	18,36	0,345	-33,0	6,2	0,0815
	Depois	Translúcido	16,64	0,249	-27,6	6,2	0,0686
Estresse Térmico	Antes	Translúcido	22,26	0,448	-27,7	6,05	0,0730
	Depois	Translúcido	15,62	0,192	-23,5	6,05	0,0934
Aquecimento / Resfriamento	Antes	Translúcido	22,96	0,457	-21,3	6,49	0,0707
	Depois	Translúcido	21,31	0,325	-19,4	6,49	0,103

Dessa forma, constatou-se que a microemulsão com própolis verde apresenta boa estabilidade e características farmacotécnicas que favorecem a sua aplicação para uso tópico no combate de infecções de pele através de protocolo de TFA.

Uma vez determinadas as características físico-químicas da microemulsão, seguiu-se para o teste final de atividade antimicrobiana, no qual se avaliou se a própolis verde brasileira incorporada a microemulsão mantinha o seu efeito fotodinâmico antimicrobiano. Assim, após o teste utilizando o método de halo de inibição, observou-se que a própolis verde brasileira mantém seu efeito antimicrobiano fotodinâmico na formulação na dose de 10mg e que tal efeito é significativamente aumentado com a fotoativação com luz azul (Figura 10).

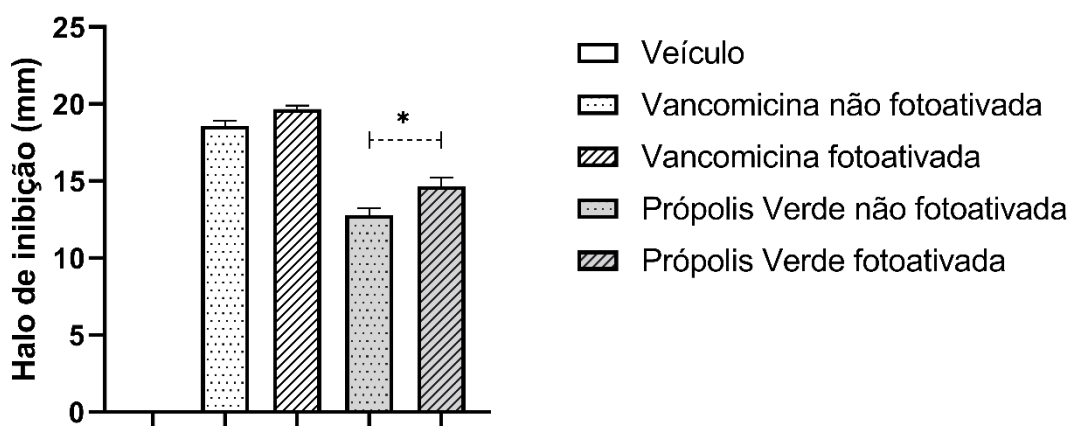


Figura 10. Avaliação do efeito fotodinâmico antimicrobiano da microemulsão com própolis verde brasileira. Em uma placa de petri, MRSA foi plaqueado em concentração de $1,5 \times 10^4$ UFC. Logo após, foi feito um furo na placa e adicionado 100 μ L de microemulsão sem própolis verde (Vehicle) ou com própolis verde na dose de 10mg, fotoativada ou não. Discos de difusão contendo vancomicina fotoativada ou não foram utilizados como grupos de controle positivo. As diferenças entre o grupo própolis verde não fotoativada e fotoativada estão indicadas pelo símbolo “*”. *: $p < 0,05$. $n = 6$.

7. DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstramos que a própolis verde é um excelente fotossensibilizador para ser utilizado na terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFA). Isto é evidente devido a sua propriedade de absorção de luz com efeito fotodinâmico, matando de maneira eficaz bactérias resistentes a antibióticos clinicamente relevantes, como MRSA e VISA, mesmo em baixas concentrações. Tal efeito antimicrobiano, mesmo em baixas doses, pode estar associado à localização da própolis verde nos microrganismos.

Os dados de potencial zeta obtidos neste estudo sugerem que a própolis verde poderia estar presente em regiões internas das bactérias analisadas. Além disso, observamos que a própolis verde compreende múltiplos compostos com efeito fotodinâmico bem estabelecidos. Esses diferentes compostos podem funcionar sinergicamente, aumentando assim o seu efeito fotodinâmico antimicrobiano.

A própolis verde brasileira é uma resina amplamente reconhecida por seus efeitos benéficos em diferentes contextos. Ela já foi sugerida como um composto potencial para o tratamento de doenças crônicas, infecções bacterianas e, mais recentemente, para indivíduos com COVID-19 (Quintino *et al.*, 2020; Silveira *et al.*, 2019, 2021). Porém, estudos explorando seu potencial fotodinâmico ainda estão em estágios iniciais e essa característica ainda não está bem estabelecida. Um estudo recente demonstrou que o efeito fotodinâmico da própolis verde brasileira foi observado quando estimulado com laser vermelho (Fonseca *et al.*, 2020). Porém, em nosso estudo, observamos que a própolis verde possui maior absorção de luz no espectro que varia de 400 a 450nm. Assim, a luz azul (450 nm \pm 20) parece ser mais eficaz na indução do efeito fotodinâmico da própolis verde devido à sua maior proximidade com o pico de absorção da própolis. Além disso, os comprimentos de onda abaixo desta gama incluem a radiação ultravioleta, que é conhecida por causar danos celulares e aumentar o risco de câncer, limitando assim a sua aplicação clínica (Hussein, 2005; Kozma e Eide, 2014). Esse achado está alinhado com estudo recente onde observaram a eficácia do controle de bactérias cariogênicas como *Streptococcus mutans* e *Candida albicans* em um modelo experimental de biofilme, visando o manejo de infecções relacionadas (Oliveira, de *et al.*, 2023). Portanto, o presente estudo ressalta a notável versatilidade da própolis verde em termos de seu potencial fotodinâmico, ativado por vários comprimentos de onda e sua eficácia contra diversos microrganismos, incluindo as cepas discutidas nesta pesquisa, que têm como alvo infecções de pele e tecidos moles. Essa ampla resposta a diferentes tipos e cores de luz é provavelmente atribuída à composição diversificada da própolis, que contém diversas moléculas que podem responder de maneira diferente a vários protocolos, seja envolvendo laser vermelho (660 nm) ou luz LED azul (450 nm) (Fonseca *et al.*, 2020; Nunes e Guerreiro, 2012; Oliveira, de *et al.*, 2023).

O surgimento de microrganismos multirresistentes tem aumentado ao longo dos anos, principalmente devido ao uso exacerbado de antibióticos (Carlet *et al.*, 2011). Entre eles, o *S. aureus* emergiu como um dos principais patógenos multirresistentes, sendo o

MRSA responsável por até 10 vezes mais infecções do que todos os patógenos gram-negativos multirresistentes combinados (Craft *et al.*, 2019). Além disso, surgiram também cepas resistentes aos principais antibióticos usados para tratar essas infecções, como o VISA, estirpe com resistência intermediária à vancomicina (Park *et al.*, 2019). Isso representa um desafio significativo para a comunidade científica, evidenciando a necessidade urgente de se desenvolver metodologias alternativas ao tratamento farmacológico tradicional. *S. aureus* tornou-se um excelente candidato para pesquisas focadas na exploração de novos fotossensibilizadores para TFA com métodos de irradiação luminosa prolongada. Isso porque, apesar do equipamento utilizado incorporar sistema de água para resfriamento da placa e empregar LEDs que geram relativamente pouco calor quando comparado a outras fontes, o *S. aureus* é conhecido por ser um microrganismo termotolerante, permanecendo viável mesmo após exposição prolongada a temperaturas entre 60 e 65°C (Frees *et al.*, 2004; Mohamed *et al.*, 2019). Assim, é improvável que a exposição à luz tenha induzido significativamente a morte bacteriana devido ao aquecimento, como pode ser observado nos grupos tratados apenas com luz, onde não foi observada diminuição da carga bacteriana.

Estudos relatam o potencial antimicrobiano da própolis verde contra infecções por *S. aureus*, incluindo MRSA (Azevedo, de *et al.*, 2021; Machado *et al.*, 2016). Em seu trabalho, Machado e colaboradores (2016) observaram concentração inibitória mínima de 630 µg/mL de própolis verde para inibir o crescimento de MRSA. Em nosso estudo, foram necessários apenas 5µg/mL de própolis verde em associação com luz azul em alta intensidade por 15 minutos para observar uma inibição significativa do crescimento de MRSA. Um padrão semelhante foi observado ao usar os mesmos parâmetros em relação ao VISA. Tal fato destaca o potencial da própolis verde como fotossensibilizador para TFA, mostrando alta indução de morte bacteriana mesmo em baixas concentrações. Tais características são essenciais para o desenvolvimento de métodos terapêuticos aplicáveis na clínica.

Outro achado interessante deste estudo foi a determinação de um possível local de ação da própolis verde como fotossensibilizador. O potencial zeta (ou potencial eletrocinético) está diretamente associado à carga elétrica superficial das células (Bhattacharjee, 2016). Tradicionalmente, vários estudos têm utilizado essa informação para estudar a aglutinação celular e a adesão celular, fatores diretamente relacionados com a carga da superfície celular (Fontes *et al.*, 2006; Lin, Zhong e Yao, 2006; Veronesi

et al., 2002). A partir disso, estudos demonstraram a aplicação do potencial zeta para indicar possível interação de moléculas como nanopartículas ou fotossensibilizadores com estruturas de superfície celular ou mesmo sua capacidade de penetrar nas células (Fan *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2008). Além disso, o potencial zeta tem sido utilizado como um bom indicador para medir a interação de compostos fotossensibilizantes com a superfície celular bacteriana ou sua penetração nelas, o que influencia diretamente a eficácia da TFA contra esses microrganismos (Fang *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2015). Conforme demonstrado neste trabalho, a exposição à própolis verde não alterou significativamente o potencial zeta do MRSA e VISA. Fang e colaboradores (2016) postularam em seu trabalho que a alteração do potencial zeta em diferentes bactérias, incluindo MRSA, estava relacionada à interação do fotossensibilizador com a superfície bacteriana, portanto, os fotossensibilizadores que não alteraram o potencial zeta estavam atuando em regiões mais internas da bactéria, como na membrana plasmática, principal local de ação da TFA (Choi *et al.*, 2012). Estudos sugerem que as moléculas que se ligam à membrana plasmática bacteriana poderiam alterar sua permeabilidade aos fotossensibilizadores tradicionais, como o azul de metileno (Freitas, de *et al.*, 2018). Essa característica é extremamente importante devido ao curto tempo de vida e ao raio de ação do $^1\text{O}_2$ em sistemas biológicos, de $<0,04$ ms e $<0,02$ μm , respectivamente (Delcanale *et al.*, 2015; Dougherty *et al.*, 1998; Ogilby, 2010). Assim, é possível que as moléculas presentes na própolis verde atuem de forma sinérgica ao interagir com as estruturas internas das bactérias, aumentando sua permeabilidade aos fotossensibilizadores, causando danos que levam à morte bacteriana. Porém, mais investigações são necessárias para quantificar quanto da própolis verde penetra na bactéria e qual o papel de cada composto neste contexto.

A própolis verde brasileira é conhecida por sua composição diversificada, incluindo ácido cinâmico e derivados, flavonoides, ácido benzóico, benzoatos, aromáticos não hidroxilados, ácidos e ésteres alifáticos (Chang *et al.*, 2008). A partir da análise de redes moleculares, identificamos em nosso trabalho que a própolis verde brasileira possui substâncias curcuminoides em sua composição. Isso ajuda a explicar o efeito fotodinâmico observado em nosso estudo quando estimulado pela luz azul, uma vez que a curcumina é um composto natural bem estabelecido que apresenta fotorreatividade quando estimulado pela luz azul (Muniz *et al.*, 2021; Santos, dos *et al.*, 2019). Pelas suas características estruturais, é possível que outros compostos também presentes na própolis

verde brasileira atuem de forma sinérgica, potencializando a TFA. Alguns exemplos são a presença do ácido *p*-cumárico, que é um precursor da artemilina C, compostos já descritos como associados à potencialização sinérgica da terapia fotodinâmica antitumoral (Arruda *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2017). O kampferol e o ácido caféico, por sua vez, têm sido relatados como compostos com atividade fotodinâmica no combate às células cancerígenas (Ahn, Biswas e Chung, 2013; Lee, Kim e Na, 2016). Assim, é possível que a própolis verde brasileira contenha diversos compostos que são fotoativados por diferentes comprimentos de onda e exibam atividade fotodinâmica antimicrobiana direta ou potencializem os efeitos dessa terapia através de outras vias antimicrobianas. Conseqüentemente, é possível obter maior eficácia terapêutica mesmo em baixas concentrações, como demonstrado em nosso estudo.

Nesse sentido, observamos que os compostos fotodinamicamente ativos identificados neste estudo, como a curcumina, o ácido *p*-cumárico, o kampferol e o ácido cafeioquímico, não apresentaram inter-relações na análise das redes moleculares. Essas redes moleculares bioativas permitem análises bioinformáticas, para determinar o potencial de bioatividade de uma molécula dentro de extratos ou produtos complexos, melhorando a compreensão de moléculas candidatas em um composto natural como a própolis verde (Nothias *et al.*, 2018). Conseqüentemente, tais redes moleculares podem sugerir quais outras moléculas contribuem para potencializar os efeitos fotodinâmicos antimicrobianos de compostos com potencial atividade fotodinâmica presentes na própolis verde brasileira. Essa direção é essencial para o desenvolvimento de protocolos combinados de diferentes compostos que, coletivamente, possibilitem maior eficácia na terapia fotodinâmica antimicrobiana (Freitas, de *et al.*, 2018).

Para além da caracterização *in vitro*, o presente trabalho é o primeiro a avaliar os efeitos do uso da própolis verde brasileira como fotossensibilizador para terapia fotodinâmica antimicrobiana em modelo animal de infecção intradérmica. Aqui foi constatado que a dose de 10µg de própolis verde brasileira utilizada no presente estudo, além de ter sido a menor dose suficiente para induzir morte de 100% das bactérias *in vitro*, não apresentou citotoxicidade significativa em células nucleadas ou anucleadas. Além disso, a TFA com própolis verde brasileira foi capaz de prevenir a perda de peso pela infecção, reduzir significativamente a carga bacteriana no sítio infeccioso, bem como modular positivamente o perfil celular do infiltrado inflamatório no tecido. Por fim, o tratamento também modulou a resposta inflamatória mediada por citocinas, por meio do

aumento da expressão de IL-17A e IL-12p70, além de modular o perfil de correlação e interações bayesianas de marcadores inflamatórios.

Estudos recentes demonstraram o efeito fotodinâmico antimicrobiano da própolis verde brasileira *in vitro* (Fonseca *et al.*, 2020; Oliveira, de *et al.*, 2023). Porém, como a indução da morte microbiana mediada pela TFA consiste em mecanismos inespecíficos, não ficou claro se as doses de fotossensibilizador utilizadas nos estudos *in vitro* seriam potencialmente tóxicas para as células eucarióticas do hospedeiro, fato que poderia ser um fator limitante na aplicação da TFA com própolis verde em modelos reais de infecção. No presente estudo observou-se que a própolis verde na dose de 10µg não apresentou citotoxicidade em células anucleadas (eritrócitos) ou em células nucleadas (HUVEC). Curiosamente, foi observada função citoprotetora quando comparada aos grupos controle que receberam apenas o veículo. Este resultado está de acordo com um estudo em que a própolis polonesa apresentou alto potencial antioxidante e citoprotetor em eritrócitos humanos contra o estresse oxidativo (Woźniak *et al.*, 2019). Da mesma forma, pesquisas mostram que a própolis obtida de diferentes biomas do território brasileiro também apresenta atividade citoprotetora em eritrócitos, com redução significativa da hemólise, corroborando os resultados aqui encontrados (Bonamigo *et al.*, 2017; Campos *et al.*, 2015). Padrão semelhante foi observado em células endoteliais humanas (HUVEC), onde a própolis verde brasileira não demonstrou citotoxicidade. Esse achado corrobora com o observado em outros estudos, nos quais foi possível observar o efeito citoprotetor da própolis verde brasileira sobre as HUVEC, com efeitos angiostáticos inibitórios relacionados à formação de tumores (Chikaraishi *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2019). Portanto, é possível que a própolis verde brasileira atue na proteção das células do tecido infectado, ao mesmo tempo em que induz a morte bacteriana mediada pela TFA, representando um duplo efeito desejado no combate às infecções.

As infecções bacterianas de modo geral, inclusive as causadas por *S. aureus*, tanto sistêmicas quanto cutâneas, estão frequentemente associadas à redução do peso corporal em hospedeiros infectados, resultando em prognósticos piores nesses indivíduos (Brown *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2023). Portanto, prevenir efeitos sistêmicos deletérios decorrentes do processo infeccioso é essencial para a eliminação do patógeno, bem como para a recuperação do paciente. Estudos com diferentes modelos experimentais de infecção demonstram que a própolis previne a perda de peso decorrente do processo infeccioso (Shimizu *et al.*, 2008; Takemura *et al.*, 2012). Aqui foi constatado que,

independentemente da aplicação da luz LED azul, a própolis verde brasileira promove a recuperação do peso perdido em decorrência do processo infeccioso. Assim, fica demonstrada a importância da utilização de produtos naturais como o fotossensibilizadores, pois é possível obter os efeitos antibacterianos proporcionados pela TFA sem perder outros efeitos positivos no contexto do combate às infecções, como a manutenção do peso corporal dos indivíduos infectados.

Estudos *in vitro* demonstram a eficácia da própolis verde brasileira no combate a diversos microrganismos, desde bactérias, fungos, entre outros (Bezerra *et al.*, 2020; Campos, Assis e Bernardes-Filho, 2020; Silva *et al.*, 2022). Estudos *in vivo* demonstram que tanto a própolis verde isoladamente quanto em combinação com antibióticos podem reduzir a carga bacteriana de animais infectados por *S. aureus*. Porém, altas doses de própolis são frequentemente utilizadas, o que, aliado à possibilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana, pode tornar o uso desse composto natural menos aplicável na prática clínica (Beserra *et al.*, 2023; Rana e Kumar, 2022). Em nosso estudo *in vitro*, demonstramos que TFA usando concentração de 10 µg/mL de própolis verde brasileira como fotossensibilizador induz a morte bacteriana de MRSA e VISA. Essa indução de morte bacteriana ocorre principalmente pela formação de espécies reativas de oxigênio, sendo o oxigênio singlete a principal espécie reativa de oxigênio formada a partir da própolis verde brasileira (Oliveira, de *et al.*, 2023). Aqui, relatamos pela primeira vez *in vivo* que o uso da própolis verde brasileira como fotossensibilizador para TFA é eficaz na redução da carga bacteriana em um modelo de infecção intradérmica. Este resultado valida a aplicabilidade da própolis verde brasileira como fotossensibilizador para TFA, pois é capaz de induzir morte bacteriana significativa, algo não observado quando administrado sem posterior tratamento com luz LED azul. Esse fato corrobora com outros estudos nos quais se observa ampla redução da carga bacteriana no local da infecção, mesmo com baixas doses do fotossensibilizador a partir de produtos naturais (Muniz *et al.*, 2021; Santos, dos *et al.*, 2019). Dessa forma, é possível ter uma alternativa terapêutica eficaz, de baixo custo e com baixa geração de resistência por microrganismos.

Além dos efeitos antimicrobianos, a própolis verde brasileira também possui outras funções importantes no tratamento de infecções. Ela é conhecida pelos seus efeitos anti-inflamatórios, estando associado à redução de células leucocitárias tanto no infiltrado inflamatório como em órgãos linfóides como medula óssea, baço e gânglios linfáticos (Machado *et al.*, 2012; Miranda, de *et al.*, 2019). Além disso, possui um efeito cicatrizante

bem estabelecido, que combinado com seus efeitos antimicrobianos, pode aumentar seus benefícios quando usado no tratamento de infecções de pele (Baygar, 2019). Contudo, seus efeitos em modelos de infecção intradérmica causada por *S. aureus* precisam ser melhor investigados. Isso porque além da redução do número total de células inflamatórias no local da infecção, os animais tratados apenas com própolis verde também apresentaram redução de células polimorfonucleares no tecido. Este fato pode representar um desafio neste contexto, uma vez que está bem estabelecido que os neutrófilos são as principais células responsáveis pelo combate inicial ao *S. aureus* (Machado *et al.*, 2012; Rigby e DeLeo, 2012; Spaan *et al.*, 2013). Portanto, essa modulação no recrutamento celular pode não ser benéfica no combate à infecção. No presente estudo, a própolis verde brasileira não induziu alterações no perfil de peroxidação lipídica na orelha infectada nem alterou o número de células leucocitárias no tecido infectado. Porém, quando associada à TFA, houve diminuição da peroxidação lipídica e aumento significativo de células leucocitárias no local da infecção, principalmente neutrófilos, que são as principais células de defesa no combate inicial ao MRSA. Assim, pode-se observar que a TFA com própolis verde brasileira foi capaz não apenas de induzir a redução da carga bacteriana no local da infecção, mas também de reduzir o dano tecidual observado devido ao menor nível de peroxidação lipídica, bem como, modular o recrutamento de células de defesa, aumentando a quantidade e proporção de neutrófilos no tecido. Esses efeitos provavelmente estão associados ao efeito antimicrobiano da TFA, além da mencionada ação citoprotetora da própolis verde. Esse efeito não é observado quando comparado a estudos utilizando fotossensibilizadores já consagrados, como a curcumina, o que torna a própolis verde brasileira uma excelente alternativa no combate às infecções causadas por MRSA (Muniz *et al.*, 2021).

Estudos demonstram que a imunomodulação induzida pela própolis verde no perfil de citocinas varia a depender do contexto em que é avaliada. Análises em macrófagos mostraram que tanto a própolis verde brasileira quanto um de seus principais componentes, a Artepilina C, reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias. A própolis verde (a partir de 25 µg/mL) diminuiu a produção das citocinas IL-1β, IL-6, IL-12p40 e TNF-α (Szliszka, Kucharska, *et al.*, 2013). A artepilina C (a partir de 50 µM), por sua vez, diminuiu a produção das citocinas IL-1β, IL-9, IL-12p40 (100 µM), IL-17 e TNF-α (Szliszka, Mertas, *et al.*, 2013). Além disso, em doses a partir de 20µg/mL a própolis verde pode induzir diminuição na produção de IL-12p70 e aumento na produção

de IL-10 pelas células dendríticas, corroborando assim sua conhecida atividade anti-inflamatória (Conti *et al.*, 2016). No entanto, apesar dos seus conhecidos efeitos anti-inflamatórios, também pode ter efeitos pró-inflamatórios benéficos no combate a infecções. Estudos demonstraram que a exposição à própolis verde pode aumentar a produção de IL-2 e IFN- γ , bem como a porcentagem de fagocitose e a produção de anticorpos IgG (Gao *et al.*, 2014; Szliszka, Mertas, *et al.*, 2013; Tsuruta *et al.*, 2022).

No presente estudo, a própolis verde brasileira por si só não interferiu na produção das citocinas aqui avaliadas. Porém, quando associado ao protocolo de TFA, induziu aumento da produção das citocinas IL-17A e IL-12p70 no linfonodo drenante retromaxilar. A IL-17 é produzida em grande parte pelos linfócitos T $\gamma\delta$ nos estágios iniciais da infecção e é essencial para o recrutamento adequado de neutrófilos, sendo importante para a proteção contra *S. aureus* em modelos de infecção cutânea, como lesões cutâneas ou dermatite atópica (Cho *et al.*, 2010; Narita *et al.*, 2010). A IL-12, por sua vez, é uma citocina chave na proteção contra *S. aureus*, sendo produzida principalmente por macrófagos M1 e associada à proteção e cura em modelos de infecção intradérmica em camundongos (Asai *et al.*, 2010). Estudos *in vitro* demonstram que espécies reativas de oxigênio estão associadas ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-8 e TNF- α (Lima *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2007). Aqui, postulamos pela primeira vez que TFA com própolis verde brasileira *in vivo* induz aumento na produção das citocinas IL-17A e IL-12p70. Dessa forma, mais estudos são necessários para avaliar se o aumento de IL-17A e IL-12p70 está diretamente relacionado à produção de espécies reativas de oxigênio da TFA com própolis verde brasileira ou se é um efeito secundário do tratamento e de outras moléculas presentes na própolis verde. Tais respostas podem elucidar os mecanismos pelos quais a TFA com própolis verde brasileira induz seu efeito protetor contra infecções bacterianas.

A própolis verde isoladamente foi associada a uma correlação negativa entre IL-12p70 e IL-10. Esse fato caracteriza-se como um problema no combate à infecção por MRSA, pois estudos demonstram que o desequilíbrio entre IL-10 e IL-12p70, com aumento de IL-10 e diminuição de IL-12p70, pode ser induzido pelo ácido lipoteicóico de *S. aureus*, favorecendo o estabelecimento da infecção e estando associado a piores resultados (Patou *et al.*, 2008). Porém, quando associada à TFA, a própolis verde brasileira induziu um perfil de correlação positivo entre IL-10 e TNF- α , fato reforçado pelo perfil de interação em redes bayesianas. Sabe-se que a morte celular induzida por

espécies reativas de oxigênio resultantes da TFA está correlacionada com o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (Warszyńska, Repetowski e Dąbrowski, 2023). Esse aumento ocorre por estimulação direta associada à morte de células bacterianas, expondo seus antígenos e estimulando a resposta imune, bem como por estimulação indireta de fagócitos e outras células do sistema imunológico (Garg *et al.*, 2010; Nowis *et al.*, 2005). Assim, é provável que as espécies reativas de oxigênio geradas a partir da TFA com própolis verde brasileira estejam associadas à modulação inflamatória observada no presente estudo, por vias diretas e indiretas, culminando em melhor proteção contra a infecção intradérmica por MRSA, podendo esse padrão ser estendido para infecções semelhantes causadas por outros microrganismos. Dessa forma, a TFA com própolis verde brasileira potencializa o sistema imunológico no combate ao MRSA ao aumentar a produção de IL-17 e IL-12p70, citocinas essenciais para o desenvolvimento de uma resposta protetora contra infecções causadas por MRSA.

Por fim, a microemulsão de uso tópico contendo própolis verde brasileira mostra-se passível de utilização em TFA. Isso fica claro uma vez que em nosso estudo a mesma apresentou características físico-químicas interessantes no contexto de microemulsões de uso tópico, com valores de tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial zeta considerados bons. Mais importante, a análise de difusão em meio sólido demonstrou que a microemulsão com própolis verde brasileira mantém seu efeito fotodinâmico observado anteriormente. Dessa forma, o tratamento com luz LED azul aumentou os efeitos antimicrobianos da própolis verde, culminando em um halo de inibição maior do que o grupo tratado com a própolis verde não fotoativada.

Microemulsões consistem em sistemas nanoestruturados de formação espontânea compostos por óleo e água estabilizados por surfactantes e possivelmente cosurfactantes, frequentemente utilizadas como sistemas de entrega de fármacos em diferentes sítios corpóreos, especialmente a pele (Szumała e Macierzanka, 2022). Isso porque ela apresenta maior solubilidade do composto incorporado, boa estabilidade termodinâmica e maior permeabilidade transdérmica, podendo apresentar baixa absorção sistêmica (Nastiti *et al.*, 2017; Sintov e Shapiro, 2004). Pelas razões supracitadas, microemulsões tem sido amplamente utilizadas como métodos de entrega de fármacos para o tratamento de infecções de pele causadas por diferentes microrganismos (Abruzzo *et al.*, 2022; Chhibber *et al.*, 2015; Shishu, Rajan e Kamalpreet, 2009).

Para o desenvolvimento de microemulsões como método de entrega de compostos por vias transdérmicas, espera-se que a mesma possua características físico-químicas que favoreçam tal utilização. Dentre os parâmetros físico-químicos importantes para o desenvolvimento de uma microemulsão estão o índice de polidispersividade (PDI), o tamanho da partícula e o potencial zeta. O PDI é um importante indicador de uniformidade das partículas, de modo que um PDI baixo indica um estado de homogeneidade na formulação (Amuti *et al.*, 2021). O tamanho da partícula, por sua vez, é uma das principais vantagens das microemulsões visto que possuem no máximo 100 μ m, o que facilita a sua passagem transdérmica, favorecendo uma maior clareza óptica e biodisponibilidade do composto ativo incorporado (Teixeira *et al.*, 2016). Por fim, o potencial zeta consiste em um importante marcador de estabilidade da microemulsão, de modo que é almejado um alto potencial zeta, uma vez que maiores forças de repulsão impedirão a formação de coágulos ou flóculos, garantindo assim a estabilidade da microemulsão por longos períodos (Mahboob *et al.*, 2022).

Em nosso estudo, a microemulsão apresentou, inicialmente, como parâmetros físico-químicos um PDI de 0,444, o tamanho de partícula de 26,83 nm e um potencial zeta de -21,75. Tais parâmetros mostram-se interessantes e muito promissores com relação ao desenvolvimento da microemulsão contendo a própolis verde brasileira como princípio ativo. O PDI consiste em um forte indicador de que a dispersão das partículas que compõem a microemulsão é uniforme, fazendo com que a mesma esteja homogênea, uma vez que valores de PDI até 0,7 são tidos como baixos e desejáveis (Montes, Villaseñor e Ríos, 2019). O tamanho da partícula de 26,83 nm aqui observada também é um excelente resultado, uma vez que para serem consideradas microemulsões, as misturas precisam apresentar partículas entre 1 e 100 μ m, o que faz com que o produto final possua as características pretendidas, sendo um fluido translúcido, homogêneo e estável ((Mahboob *et al.*, 2022). Por fim, o potencial zeta aqui encontrado inicialmente é razoável e indica boa estabilidade, uma vez que não está tão distante do valor tido como desejável, - 30mV, com carga eletrocinética superficial suficiente para evitar a agregação das partículas a partir da repulsão elétrica por ela induzida (Mohapatra *et al.*, 2019). Logo, as características físico-químicas observadas na formulação inicial atendem aos parâmetros desejados para o desenvolvimento de uma microemulsão de uso tópico.

Testes preliminares de estabilidade são um importante meio de triagem e avaliação inicial do produto em desenvolvimento, onde o objetivo não é avaliar a vida útil da

microemulsão, mas rastrear precocemente sinais de instabilidade (Cekić, Savić e Savić, 2023). Para além dos resultados iniciais, a microemulsão com própolis verde brasileira apresentou boa estabilidade nos testes de estabilidade preliminares, não sendo observada separação de fases na microemulsão após nenhum dos testes. Curiosamente, alguns parâmetros apresentaram melhores características físico-químicas após serem submetidas ao estímulo estressor, como a diminuição do tamanho da partícula e do PDI. Com relação ao potencial zeta, percebeu-se uma pequena diminuição após os testes preliminares de estabilidade, contudo, sem nenhuma alteração perceptível na estabilidade da amostra, o que sinaliza que não houve indução de instabilidade significativa na microemulsão. A falta de alteração significativa nos parâmetros supracitados após os testes de estabilidade preliminares também são relatados em outros trabalhos, no qual o desenvolvimento de uma microemulsão de uso tópico foi considerado excelente por apresentar resultados semelhantes aos nossos, com nenhuma alteração significativa observada (Garcia *et al.*, 2021). Dessa forma, uma microemulsão de uso tópico com própolis verde brasileira para aplicação de TFA mostra-se promissora. Porém, testes de estabilidade acelerada são recomendados a fim de que se estabeleça o tempo de vida útil dessa microemulsão.

Por fim, a incorporação da própolis verde brasileira na microemulsão manteve o seu efeito fotodinâmico antimicrobiano, observado através do teste de difusão em meio sólido. Nessa etapa, a fotoativação da microemulsão com própolis verde aumentou o halo de inibição do crescimento bacteriano, quando comparado ao grupo que não foi fotoativado. O método de difusão em meio sólido é uma estratégia bem estabelecida para a avaliação do efeito antimicrobiano de compostos microemulsionados (Khumpirapang *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2010). Contudo, ainda é pouco explorado em outros contextos, como a TFA. Dessa forma, o presente trabalho valida o método de difusão em meio sólido adaptado para avaliação do efeito fotodinâmico de compostos microemulsionados, uma vez que se pode avaliar tal efeito no presente estudo, servindo como base para análises posteriores com outros compostos microemulsionados. A incorporação de fotossensibilizadores oriundos de produtos naturais em microemulsão já é utilizada em diferentes contextos. Um dos mais bem estudados é a curcumina, no qual trabalhos relatam a sua incorporação em microemulsões para utilização com TFA visando o combate de infecções diversas (Liu, Lee e Wu, 2016; Rocha *et al.*, 2020). Assim, o presente estudo corrobora com os demais trabalhos publicados até o momento, fornecendo informações valiosas sobre mais um composto natural possível de

incorporação em microemulsão para utilização em TFA. Todavia, mais estudos são necessários para se avaliar, dentre outras questões, a permeabilidade dessa composição na pele, a fim de que se possa determinar a dose adequada de administração, viabilizando o desenvolvimento de um protocolo adequado para o tratamento de infecções de pele.

8. CONCLUSÕES

O presente trabalho consistiu na caracterização do potencial fotodinâmico da própolis verde brasileira utilizando diferentes protocolos e envolvendo diversas fontes de luz, intensidades e tempos de exposição. Esta pesquisa representa a primeira tentativa de identificar e caracterizar moléculas potenciais da própolis verde brasileira que possuam efeitos fotodinâmicos antimicrobianos. Além disso, propõe potenciais interações sinérgicas entre diferentes compostos antimicrobianos encontrados na própolis verde brasileira.

Este estudo valida pela primeira vez em *in vivo* a eficácia do uso da própolis verde brasileira como fotossensibilizador para TFA com luz LED azul no combate à infecções intradérmicas por MRSA. Aqui, foi demonstrado que a própolis verde não apresenta toxicidade relevante para células nucleadas ou anucleadas. Sistemicamente, a TFA manteve o efeito protetor da própolis verde na preservação do peso corporal durante a infecção. Além disso, a TFA foi capaz de reduzir significativamente a carga bacteriana no local da infecção, bem como modular o recrutamento de células de defesa recrutadas para o local. Foi observada ação imunomoduladora protetora induzida pela TFA através do aumento da produção das citocinas IL-17A e IL-12p70 no linfonodo drenante retromaxilar. Assim, a própolis verde brasileira caracteriza-se como uma excelente candidata a fotossensibilizador para TFA, preservando as funções benéficas da própolis verde e agregando propriedades antibacterianas e imunomoduladoras mesmo em baixas doses. Nesse sentido, mais estudos são necessários para avaliar se resultados semelhantes são encontrados em infecções causadas por outras bactérias ou em diferentes locais do corpo.

Por fim, desenvolvimento de uma microemulsão com própolis verde brasileira se mostra promissor. Isso porque a microemulsão aqui apresentada mostrou-se estável na avaliação preliminar e com efeito fotodinâmico antimicrobiano, quando avaliado contra MRSA. Assim, mostra-se possível a utilização de microemulsão como sistema de entrega da própolis verde brasileira em infecções intradérmicas, diminuindo a dor associada a

inoculação do fotossensibilizador e aumentando a aceitação do método terapêutico. Dessa forma, mais estudos são necessários a fim de que se defina qual o tempo de vida útil desse produto bem como qual a dose de aplicação necessária para que se tenha resultados eficazes no combate a infecções de pele de origem bacteriana, bem como contra os demais microrganismos causadores desse tipo de infecção.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRUZZO, A. *et al.* Development and Characterization of Azithromycin-Loaded Microemulsions: A Promising Tool for the Treatment of Bacterial Skin Infections. **Antibiotics**, v. 11, n. 8, p. 1040, 2 ago. 2022.
- AHN, J.-C.; BISWAS, R.; CHUNG, P.-S. Synergistic effect of radachlorin mediated photodynamic therapy on propolis induced apoptosis in AMC-HN-4 cell lines via caspase dependent pathway. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 3, p. 236–243, set. 2013.
- ALGAMMAL, A. M. *et al.* Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA): One Health Perspective Approach to the Bacterium Epidemiology, Virulence Factors, Antibiotic-Resistance, and Zoonotic Impact. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 13, p. 3255–3265, set. 2020.
- ALI, A.; BANERJEA, A. C. Curcumin inhibits HIV-1 by promoting Tat protein degradation. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 27539, 10 jun. 2016.
- ALMEIDA, P. P. *et al.* Photodynamic therapy controls of Staphylococcus aureus intradermal infection in mice. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 6, p. 1337–1342, 23 ago. 2017.
- AMARAL, J. G. *et al.* Fragmentation pathway and structural characterization of new glycosylated phenolic derivatives from Eremanthus glomerulatus Less (Asteraceae) by electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 52, n. 11, p. 783–787, nov. 2017.
- AMUTI, A. *et al.* Formulation and characterization of curcumin-loaded microemulsions: Evaluation of antioxidant stability and in vitro release. **Journal of Molecular Liquids**, v. 336, p. 116881, ago. 2021.
- APPELBERG, R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 87–92, fev. 2007.
- ARAÚJO, L. M. P. C.; THOMAZINE, J. A.; LOPEZ, R. F. V. Development of microemulsions to topically deliver 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 75, n. 1, p. 48–55, maio 2010.
- ARON, A. T. *et al.* Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. **Nature Protocols**, v. 15, n. 6, p. 1954–1991, 13 jun. 2020.
- ARRUDA, C. *et al.* Effect of light, oxygen and temperature on the stability of artemisinin C and p-coumaric acid from Brazilian green propolis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 178, p. 112922, jan. 2020.
- ASAI, A. *et al.* Pathogenic Role of Macrophages in Intradermal Infection of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Thermally Injured Mice. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 10, p. 4311–4319, out. 2010.
- AYRES, D. C. *et al.* Potential utility of hyperbaric oxygen therapy and propolis in enhancing the leishmanicidal activity of glucantime. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 6, p. 329–334, dez. 2011.
- AZEVEDO, M. N. DE *et al.* Disinfectant effects of Brazilian green propolis alcohol solutions on the Staphylococcus aureus biofilm of maxillofacial prosthesis polymers. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, maio 2021.

- BAE, Y.-S. *et al.* Differential Signaling of Formyl Peptide Receptor-Like 1 by Trp-Lys-Tyr-Met-Val-Met-CONH 2 or Lipoxin A4 in Human Neutrophils. **Molecular Pharmacology**, v. 64, n. 3, p. 721–730, set. 2003.
- BARRIERE, S. L. Clinical, economic and societal impact of antibiotic resistance. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 151–153, 22 jan. 2015.
- BAYGAR, T. Characterization of silk sutures coated with propolis and biogenic silver nanoparticles (AgNPs); an eco-friendly solution with wound healing potential against surgical site infections (SSIs). **TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES**, 2019.
- BECKER, S. *et al.* Release of protein A from the cell wall of *Staphylococcus aureus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 4, p. 1574–1579, 28 jan. 2014.
- BESERRA, F. P. *et al.* **Brazilian Green Propolis-Based Nanostructured System and its use in diabetic rats of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin (MRSA)-infected wounds** ASPET 2023 Annual Meeting Abstract - Pharmacogenomics and Translational Pharmacology. **Anais...American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 18 jun. 2023 Disponível em: <<http://jpet.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/jpet.122.569100>>
- BEZERRA, C. R. F. *et al.* Highly efficient antibiofilm and antifungal activity of green propolis against *Candida* species in dentistry materials. **PLOS ONE**, v. 15, n. 12, p. e0228828, 23 dez. 2020.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, ago. 2016.
- BOLDOCK, E. *et al.* Human skin commensals augment *Staphylococcus aureus* pathogenesis. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 8, p. 881–890, 16 ago. 2018.
- BONAMIGO, T. *et al.* Antioxidant and cytotoxic activity of propolis of *Plebeia droryana* and *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae) from the Brazilian Cerrado biome. **PLOS ONE**, v. 12, n. 9, p. e0183983, 12 set. 2017.
- BRAFF, M. H. *et al.* Keratinocyte Production of Cathelicidin Provides Direct Activity against Bacterial Skin Pathogens. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 6771–6781, out. 2005.
- BROWN, E. L. *et al.* The Pantón–Valentine leukocidin vaccine protects mice against lung and skin infections caused by *Staphylococcus aureus* USA300. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 2, p. 156–164, fev. 2009.
- BUENO-SILVA, B. *et al.* Effect of neovestitol–vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm in vitro and development of dental caries in vivo. **Biofouling**, v. 29, n. 10, p. 1233–1242, 7 nov. 2013.
- CALLENDER, S. P. *et al.* Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 526, n. 1–2, p. 425–442, jun. 2017.
- CAMERON, D. R. *et al.* Serine/Threonine Phosphatase Stp1 Contributes to Reduced Susceptibility to Vancomycin and Virulence in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 11, p. 1677–1687, 1 jun. 2012.
- CAMPANHOLI, K. DA S. S. *et al.* Photodamage on *Staphylococcus aureus* by natural extract from *Tetragonia tetragonoides* (Pall.) Kuntze: Clean method of extraction, characterization and photophysical studies. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 203, p. 111763, jan. 2020.
- CAMPOS, J. F. *et al.* Antimicrobial, Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Cytotoxic Activities

of Propolis from the Stingless Bee *Tetragonisca fiebrigi* (Jataí). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–11, 2015.

CAMPOS, J. V. DE; ASSIS, O. B. G.; BERNARDES-FILHO, R. Atomic force microscopy evidences of bacterial cell damage caused by propolis extracts on *E. coli* and *S. aureus*. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 55–61, mar. 2020.

CAO, Y. H.; WANG, Y.; YUAN, Q. Analysis of Flavonoids and Phenolic Acid in Propolis by Capillary Electrophoresis. **Chromatographia**, v. 59, n. 1–2, p. 135–140, 2004.

CARLET, J. *et al.* Society's failure to protect a precious resource: antibiotics. **The Lancet**, v. 378, n. 9788, p. 369–371, jul. 2011.

CEKIĆ, N.; SAVIĆ, SANELA; SAVIĆ, SNEŽANA. Stability evaluation of emulsion-based topical preparations: A valuable potential of dynamicmechanical thermoanalysis (DMTA) test as a rapid rheological alternative to conventional freezethaw test. **Arhiv za farmaciju**, v. 73, n. 5, p. 358–389, 2023.

ČERPNIJAK, K. *et al.* Lipid-based systems as a promising approach for enhancing the bioavailability of poorly water-soluble drugs. **Acta Pharmaceutica**, v. 63, n. 4, p. 427–445, 1 dez. 2013.

CHANG, R. *et al.* Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 549–556, 2008.

CHEN, H. *et al.* Exploring the Role of *Staphylococcus aureus* in Inflammatory Diseases. **Toxins**, v. 14, n. 7, p. 464, 6 jul. 2022.

CHENG, A. G. *et al.* Genetic requirements for *Staphylococcus aureus* abscess formation and persistence in host tissues. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 10, p. 3393–3404, 12 out. 2009.

_____. Contribution of Coagulases towards *Staphylococcus aureus* Disease and Protective Immunity. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 8, p. e1001036, 5 ago. 2010.

_____. A play in four acts: *Staphylococcus aureus* abscess formation. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 225–232, maio 2011.

CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 547–569, 31 dez. 2021.

CHHIBBER, T. *et al.* Phospholipid structured microemulsion as effective carrier system with potential in methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA) involved burn wound infection. **Journal of Drug Targeting**, v. 23, n. 10, p. 943–952, 26 nov. 2015.

CHIKARAISHI, Y. *et al.* Angiostatic effects of Brazilian green propolis and its chemical constituents. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 4, p. 566–575, 7 abr. 2010.

CHO, J. S. *et al.* IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 5, p. 1762–1773, 3 maio 2010.

CHOI, J. H. *et al.* Cutaneous Immune Defenses Against *Staphylococcus aureus* Infections. **Journal of Lifestyle Medicine**, v. 4, n. 1, p. 39–46, 31 mar. 2014.

CHOI, K.-H. *et al.* Photosensitizer and vancomycin-conjugated novel multifunctional magnetic particles as photoinactivation agents for selective killing of pathogenic bacteria. **Chemical Communications**, v. 48, n. 38, p. 4591, 2012.

- CIEPLIK, F. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don't. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 571–589, 3 set. 2018.
- CLEGG, J. *et al.* Staphylococcus aureus Vaccine Research and Development: The Past, Present and Future, Including Novel Therapeutic Strategies. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 7 jul. 2021.
- CLIFFORD, M. N. *et al.* Characterization by LC-MS n of Four New Classes of p -Coumaric Acid-Containing Diacyl Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 4095–4101, 1 jun. 2006.
- CONTI, B. J. *et al.* Propolis modulates miRNAs involved in TLR-4 pathway, NF-κB activation, cytokine production and in the bactericidal activity of human dendritic cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 12, p. 1604–1612, 16 nov. 2016.
- CORL, K. A. *et al.* Delay in Antibiotic Administration Is Associated With Mortality Among Septic Shock Patients With Staphylococcus aureus Bacteremia*. **Critical Care Medicine**, v. 48, n. 4, p. 525–532, abr. 2020.
- COSTA, P. *et al.* Role of the antioxidant properties in the gastroprotective and gastric healing activity promoted by Brazilian green propolis and the healing efficacy of Artepillin C. **Inflammopharmacology**, v. 28, n. 4, p. 1009–1025, 19 ago. 2020.
- COURVALIN, P. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. Supplement_1, p. S25–S34, 1 jan. 2006.
- CRAFT, K. M. *et al.* Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. **MedChemComm**, v. 10, n. 8, p. 1231–1241, 2019.
- DANIELL, M. D.; HILL, J. S. A HISTORY OF PHOTODYNAMIC THERAPY. **ANZ Journal of Surgery**, v. 61, n. 5, p. 340–348, maio 1991.
- DANIELSSON, I.; LINDMAN, B. The definition of microemulsion. **Colloids and Surfaces**, v. 3, n. 4, p. 391–392, dez. 1981.
- DELCANALE, P. *et al.* Subdiffraction localization of a nanostructured photosensitizer in bacterial cells. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 15564, 23 dez. 2015.
- DEMARQUE, D. P. *et al.* Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v. 33, n. 3, p. 432–455, 2016.
- DIAS, M. R. DE J. *et al.* Therapeutic or lifelong training effects on pancreatic morphological and functional parameters in an animal model of aging and obesity. **Experimental Gerontology**, v. 175, p. 112144, maio 2023.
- DOBROWOLSKI, J. W. *et al.* Antibacterial, antifungal, antiamoebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 77–82, out. 1991.
- DOUGHERTY, T. J. *et al.* Photodynamic Therapy. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889–905, 17 jun. 1998.
- DRYDEN, M. S. Complicated skin and soft tissue infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. Supplement 3, p. iii35–iii44, 1 nov. 2010.
- FAN, H. Y. *et al.* Utilizing zeta potential measurements to study the effective charge, membrane partitioning, and membrane permeation of the lipopeptide surfactin. **Biochimica et Biophysica**

Acta (BBA) - Biomembranes, v. 1838, n. 9, p. 2306–2312, set. 2014.

FANG, Y. *et al.* Water-soluble benzylidene cyclopentanone based photosensitizers for in vitro and in vivo antimicrobial photodynamic therapy. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28357, 21 jun. 2016.

FERREIRA, J. M. *et al.* New propolis type from north-east Brazil: chemical composition, antioxidant activity and botanical origin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 11, p. 3552–3558, 8 ago. 2017.

FIORINI, A. C. *et al.* Antiviral activity of Brazilian Green Propolis extract against SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome - Coronavirus 2) infection: case report and review. **Clinics**, v. 76, p. e2357, 2021.

FISCHER, D. *et al.* In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. **Biomaterials**, v. 24, n. 7, p. 1121–1131, mar. 2003.

FONSECA, A. DE M. V. *et al.* Photodynamic Therapy With Propolis: Antibacterial Effects on Staphylococcus aureus, Streptococcus mutans and Escherichia coli Analysed by Atomic Force Microscopy. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 11, n. Suppl 1, p. S107–S112, 30 dez. 2020.

FONTES, A. *et al.* Studying Red Blood Cell Agglutination by Measuring Electrical and Mechanical Properties with a Double Optical Tweezers. **Microscopy and Microanalysis**, v. 12, n. S02, p. 1758–1759, 31 ago. 2006.

FORSQREN, A.; FORSUM, U. Role of Protein A in Nonspecific Immunofluorescence of Staphylococcus aureus. **Infection and Immunity**, v. 2, n. 4, p. 387–391, out. 1970.

FOSTER, T. J. Immune evasion by staphylococci. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 948–958, dez. 2005.

_____. Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Current status and future prospects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 430–449, 1 maio 2017.

FRASER, J. D. Clarifying the Mechanism of Superantigen Toxicity. **PLoS Biology**, v. 9, n. 9, p. e1001145, 13 set. 2011.

FREES, D. *et al.* Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in Staphylococcus aureus. **Molecular Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1445–1462, 8 out. 2004.

FREITAS, A. DA S. DE *et al.* A palynological analysis of Brazilian propolis samples. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v. 3, n. 2, p. 67–74, 1 abr. 2011.

FREITAS, L. M. DE *et al.* Antimicrobial Photodynamic therapy enhanced by the peptide aurein 1.2. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 4212, 9 dez. 2018.

FROTA, V. M. *et al.* Inhibitory Activity of Brown Propolis Extracts on a Norfloxacin-Resistant Strain of Staphylococcus aureus. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, n. 2, p. 249–255, 21 abr. 2021.

GALANTINI, M. P. L. *et al.* Physical activity reduces intradermal bacterial load in a murine model submitted to forced swim training – a pilot study. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, n. 2, 2022.

GAO, W. *et al.* Brazilian green propolis improves immune function in aged mice. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 55, n. 1, p. 7–10, 2014.

- GARCIA, L. B. *et al.* Incorporation of glycolic extract of cocoa beans (*Theobroma cacao* L.) into microemulsions and emulgels for skincare. **Industrial Crops and Products**, v. 161, p. 113181, mar. 2021.
- GARDETE, S. *et al.* Genetic Pathway in Acquisition and Loss of Vancomycin Resistance in a Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Strain of Clonal Type USA300. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 2, p. e1002505, 2 fev. 2012.
- GARDETE, S.; TOMASZ, A. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 7, p. 2836–2840, 1 jul. 2014.
- GARG, A. D. *et al.* Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity. **Apoptosis**, v. 15, n. 9, p. 1050–1071, 10 set. 2010.
- GIMENES, S. N. C. *et al.* Antitumoral effects of γ CdcPLI, a PLA2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* via PI3K/Akt pathway on MDA-MB-231 breast cancer cell. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7077, 1 ago. 2017.
- GOLDMANN, O.; MEDINA, E. *Staphylococcus aureus* strategies to evade the host acquired immune response. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 6, p. 625–630, ago. 2018.
- GONÇALVES, C. V. *et al.* Inflammaging and body composition: New insights in diabetic and hypertensive elderly men. **Experimental Gerontology**, v. 170, p. 112005, dez. 2022.
- GOODYEAR, C. S.; SILVERMAN, G. J. Death by a B Cell Superantigen. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 9, p. 1125–1139, 5 maio 2003.
- GRAILLE, M. *et al.* Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 10, p. 5399–5404, 9 maio 2000.
- GUERRA, F. E. *et al.* Epic Immune Battles of History: Neutrophils vs. *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 30 jun. 2017.
- HAAS, C. J. C. DE *et al.* Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus*, a Bacterial Antiinflammatory Agent. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 5, p. 687–695, 1 mar. 2004.
- HARDER, J. *et al.* A peptide antibiotic from human skin. **Nature**, v. 387, n. 6636, p. 861–861, jun. 1997.
- HE, C.-X.; HE, Z.-G.; GAO, J.-Q. Microemulsions as drug delivery systems to improve the solubility and the bioavailability of poorly water-soluble drugs. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 7, n. 4, p. 445–460, 4 abr. 2010.
- HOAR, T. P.; SCHULMAN, J. H. Transparent Water-in-Oil Dispersions: the Oleopathic Hydro-Micelle. **Nature**, v. 152, n. 3847, p. 102–103, jul. 1943.
- HODGKINSON, N.; KRUGER, C. A.; ABRAHAMSE, H. Targeted photodynamic therapy as potential treatment modality for the eradication of colon cancer and colon cancer stem cells. **Tumor Biology**, v. 39, n. 10, p. 101042831773469, 9 out. 2017.
- HOLMES, N. *et al.* Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Vancomycin and Beyond. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 36, n. 01, p. 017–030, 2 fev. 2015.

- HOWDEN, B. P. *et al.* Evolution of Multidrug Resistance during *Staphylococcus aureus* Infection Involves Mutation of the Essential Two Component Regulator WalKR. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 11, p. e1002359, 10 nov. 2011.
- HU, Q.; PENG, H.; RAO, X. Molecular Events for Promotion of Vancomycin Resistance in Vancomycin Intermediate *Staphylococcus aureus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 13 out. 2016.
- HU, Z. *et al.* The Impact of Aging and Toll-like Receptor 2 Deficiency on the Clinical Outcomes of *Staphylococcus aureus* Bacteremia. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 228, n. 3, p. 332–342, 11 ago. 2023.
- HUSSEIN, M. R. Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 32, n. 3, p. 191–205, mar. 2005.
- HUTCHINGS, M. I.; TRUMAN, A. W.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72–80, out. 2019.
- IKUTA, K. S. *et al.* Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 400, n. 10369, p. 2221–2248, dez. 2022.
- ILLEL, B. *et al.* Follicles Play an Important Role in Percutaneous Absorption. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, n. 5, p. 424–427, maio 1991.
- IWAKURA, Y. *et al.* The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. **Immunological Reviews**, v. 226, n. 1, p. 57–79, 30 dez. 2008.
- JAHANTIGH, H. R. *et al.* The Candidate Antigens to Achieving an Effective Vaccine against *Staphylococcus aureus*. **Vaccines**, v. 10, n. 2, p. 199, 27 jan. 2022.
- JENSEN, S. O.; LYON, B. R. Genetics of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiology**, v. 4, n. 5, p. 565–582, jun. 2009.
- JNEID, J. *et al.* Exploring the Microbiota of Diabetic Foot Infections With Culturomics. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, 14 ago. 2018.
- JUNGE, S. *et al.* Factors Associated with Worse Lung Function in Cystic Fibrosis Patients with Persistent *Staphylococcus aureus*. **PLOS ONE**, v. 11, n. 11, p. e0166220, 18 nov. 2016.
- KALKA, K.; MERK, H.; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 42, n. 3, p. 389–413, mar. 2000.
- KASTING, G. B. *et al.* Mobility of Water in Human Stratum Corneum. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 11, p. 2326–2340, nov. 2003.
- KHUMPIRAPANG, N. *et al.* Development of Microemulsion Containing *Alpinia galanga* Oil and Its Major Compounds: Enhancement of Antimicrobial Activities. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 2, p. 265, 15 fev. 2021.
- KLOOS, W. E.; WOLFSHOHL, J. F. Identification of *Staphylococcus* species with the API STAPH-IDENT system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 509–516, set. 1982.
- KOBAYASHI, S. D.; MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Abscesses. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 6, p. 1518–1527, jun. 2015.
- KOGAN, A.; GARTI, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 123–126, p. 369–385, nov. 2006.

- KONOPKA, K.; GOSLINSKI, T. Photodynamic Therapy in Dentistry. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 8, p. 694–707, 12 ago. 2007.
- KOZMA, B.; EIDE, M. J. Photocarcinogenesis. **Dermatologic Clinics**, v. 32, n. 3, p. 301–313, jul. 2014.
- KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S77–S98, nov. 2002.
- KRISHNA, S.; MILLER, L. S. Innate and adaptive immune responses against *Staphylococcus aureus* skin infections. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 2, p. 261–280, 6 mar. 2012.
- KUNZ, D. *et al.* In- vitro-activity of additive application of hydrogen peroxide in antimicrobial photodynamic therapy using LED in the blue spectrum against bacteria and biofilm associated with periodontal disease. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 26, p. 306–312, jun. 2019.
- KURLEND, J.; GRINHOLC, M. Alternative therapies in *Staphylococcus aureus* diseases. **Acta Biochimica Polonica**, v. 59, n. 2, 11 maio 2012.
- LEE, A. S. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 18033, 7 jun. 2018.
- LEE, J.; KIM, K. S.; NA, K. Caffeic acid-coated multifunctional magnetic nanoparticles for the treatment and bimodal imaging of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 160, p. 210–216, jul. 2016.
- LEITE, D. P. V. *et al.* Effects of Photodynamic Therapy with Blue Light and Curcumin as Mouth Rinse for Oral Disinfection: A Randomized Controlled Trial. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 32, n. 11, p. 627–632, nov. 2014.
- LI, K. *et al.* A bivalent cationic dye enabling selective photo-inactivation against Gram-negative bacteria. **Chemical Communications**, v. 51, n. 37, p. 7923–7926, 2015.
- LIM, C. *et al.* Epidemiology and burden of multidrug-resistant bacterial infection in a developing country. **eLife**, v. 5, 6 set. 2016.
- LIMA, L. K. F. *et al.* A Brief Review on the Neuroprotective Mechanisms of Vitexin. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–8, 5 dez. 2018.
- LIN, D.-Q.; ZHONG, L.-N.; YAO, S.-J. Zeta potential as a diagnostic tool to evaluate the biomass electrostatic adhesion during ion-exchange expanded bed application. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95, n. 1, p. 185–191, 5 set. 2006.
- LIU, C.-H.; LEE, W.-S.; WU, W.-C. Photodynamic inactivation against *Pseudomonas aeruginosa* by curcumin microemulsions. **RSC Advances**, v. 6, n. 67, p. 63013–63022, 2016.
- LIU, W. *et al.* Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. **Journal of Drug Targeting**, v. 24, n. 8, p. 694–702, 13 set. 2016.
- LLEWELYN, M.; COHEN, J. Superantigens: microbial agents that corrupt immunity. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 156–162, mar. 2002.
- LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* Infections. **New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520–532, 20 ago. 1998.
- MACHADO, C. S. *et al.* Comparative Study of Chemical Composition and Biological Activity of Yellow, Green, Brown, and Red Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and**

- Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1–11, 2016.
- MACHADO, J. L. *et al.* Brazilian Green Propolis: Anti-Inflammatory Property by an Immunomodulatory Activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1–10, 2012.
- MAHBOOB, A. *et al.* EOR Perspective of microemulsions: A review. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 208, p. 109312, jan. 2022.
- MAISCH, T. *et al.* Fast and Effective Photodynamic Inactivation of Multiresistant Bacteria by Cationic Riboflavin Derivatives. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e111792, 3 dez. 2014.
- _____. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14, n. 8, p. 1518–1526, 2015.
- MANANDHAR, S. *et al.* Evaluation of methods to detect in vitro biofilm formation by staphylococcal clinical isolates. **BMC Research Notes**, v. 11, n. 1, p. 714, 10 dez. 2018.
- MANFREDI, R.; CALZA, L.; CHIODO, F. Epidemiology and microbiology of cellulitis and bacterial soft tissue infection during HIV disease: a 10-year survey. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 29, n. 3, p. 168–172, mar. 2002.
- MCCLEMENTS, D. J. Nanoscale Nutrient Delivery Systems for Food Applications: Improving Bioactive Dispersibility, Stability, and Bioavailability. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 7, 12 jul. 2015.
- MCCUISTION, L. E. *et al.* **Pharmacology**. [s.l.: s.n.].
- MCGUINNESS, W. A.; MALACHOWA, N.; DELEO, F. R. Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 90, n. 2, 2017.
- MIAO, J. *et al.* Current methodologies on genotyping for nosocomial pathogen methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 17–28, jun. 2017.
- MILLER, L. G. *et al.* Incidence of skin and soft tissue infections in ambulatory and inpatient settings, 2005–2010. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 362, 21 dez. 2015.
- MIRANDA, M. B. DE *et al.* Hydroalcoholic extract of Brazilian green propolis modulates inflammatory process in mice submitted to a low protein diet. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 610–620, jan. 2019.
- MIRZAEI, R. *et al.* Role of <sc>microRNAs</sc> in *Staphylococcus aureus* infection: Potential biomarkers and mechanism. **IUBMB Life**, v. 72, n. 9, p. 1856–1869, 9 set. 2020.
- MOHAMED, W. *et al.* THERMOTOLERANCE OF *Staphylococcus aureus* AFTER SUBLETHAL HEAT SHOCK. **Arab Universities Journal of Agricultural Sciences**, v. 27, n. 1, p. 467–477, 1 mar. 2019.
- MOHAPATRA, S. S. *et al.* **Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery**. [s.l.] Elsevier, 2019.
- MONTEIRO, J. S. C. *et al.* Effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy (AmPDT) on *Staphylococcus aureus* using phenothiazine compound with red laser. **Lasers in Medical Science**, v. 32, n. 1, p. 29–34, 27 jan. 2017.
- MONTES, C.; VILLASEÑOR, M. J.; RÍOS, Á. Analytical control of nanodelivery lipid-based systems for encapsulation of nutraceuticals: Achievements and challenges. **Trends in Food Science & Technology**, v. 90, p. 47–62, ago. 2019.

- MUNIZ, I. P. R. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) with curcumin controls intradermal infection by *Staphylococcus aureus* in mice with type 1 diabetes mellitus: a pilot study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 224, p. 112325, nov. 2021.
- MURRAY, C. J. L. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, fev. 2022.
- MUZAFFAR, F.; SINGH, U. K.; CHAUHAN, L. REVIEW ON MICROEMULSION AS FUTURISTIC DRUG DELIVERY. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 3, 2013.
- NAGATA, J. Y. *et al.* Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: Evaluation of the photosensitizers used and light source properties. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 9, n. 2, p. 122–131, jun. 2012.
- NARITA, K. *et al.* Role of Interleukin-17A in Cell-Mediated Protection against *Staphylococcus aureus* Infection in Mice Immunized with the Fibrinogen-Binding Domain of Clumping Factor A. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 10, p. 4234–4242, out. 2010.
- NASCIMENTO, T. G. DO *et al.* Caseinates loaded with Brazilian red propolis extract: preparation, protein-flavonoids interaction, antioxidant and antibacterial activities. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 147, n. 2, p. 1329–1343, 3 jan. 2022.
- NASTITI, C. *et al.* Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, p. 37, 21 set. 2017.
- NDEDY, M. M. *et al.* A cross-sectional study on the prevalence and drug susceptibility pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from patients in the Buea Health District, Cameroon. **Pan African Medical Journal**, v. 45, 2023.
- NESME, J.; SIMONET, P. The soil resistome: a critical review on antibiotic resistance origins, ecology and dissemination potential in telluric bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 913–930, 17 abr. 2015.
- NOTHIAS, L.-F. *et al.* Bioactivity-Based Molecular Networking for the Discovery of Drug Leads in Natural Product Bioassay-Guided Fractionation. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 4, p. 758–767, 27 abr. 2018.
- NOWIS, D. *et al.* The influence of photodynamic therapy on the immune response. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 4, p. 283–298, dez. 2005.
- NUNES, C. A.; GUERREIRO, M. C. Characterization of Brazilian green propolis throughout the seasons by headspace GC/MS and ESI-MS. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 2, p. 433–438, 30 jan. 2012.
- OGILBY, P. R. Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 8, p. 3181, 2010.
- OGONOWSKA, P. *et al.* Colonization With *Staphylococcus aureus* in Atopic Dermatitis Patients: Attempts to Reveal the Unknown. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 11 jan. 2021.
- OLIVEIRA, A. B. DE *et al.* Potential Use of Brazilian Green Propolis Extracts as New Photosensitizers for Antimicrobial Photodynamic Therapy against Cariogenic Microorganisms. **Pathogens**, v. 12, n. 2, p. 155, 17 jan. 2023.
- OLIVEIRA CARDOSO, E. DE *et al.* Brazilian green propolis: A novel tool to improve the cytotoxic and immunomodulatory action of docetaxel on MCF-7 breast cancer

- cells and on women monocyte. **Phytotherapy Research**, v. 36, n. 1, p. 448–461, 4 jan. 2022.
- OTREBA, M. *et al.* Propolis as Natural Product in the Oral Cavity Bacterial Infections Treatment: A Systematic Review. **Applied Sciences**, v. 12, n. 19, p. 10123, 9 out. 2022.
- OTTONELLO, L. *et al.* Nonleukoreduced red blood cell transfusion induces a sustained inhibition of neutrophil chemotaxis by stimulating in vivo production of transforming growth factor- β 1 by neutrophils: role of the immunoglobulinlike transcript 1, sFasL, and sHLA-I. **Transfusion**, v. 47, n. 8, p. 1395–1404, ago. 2007.
- PARK, J. W. *et al.* Characterization of Infections with Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus (VISA) and Staphylococcus aureus with Reduced Vancomycin Susceptibility in South Korea. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 6236, 17 dez. 2019.
- PATOU, J. *et al.* Staphylococcus aureus enterotoxin B, protein A, and lipoteichoic acid stimulations in nasal polyps. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 1, p. 110–115, jan. 2008.
- PAULI, N. T. *et al.* Staphylococcus aureus infection induces protein A-mediated immune evasion in humans. **Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 12, p. 2331–2339, 17 nov. 2014.
- PÉREZ, G. *et al.* Community-acquired Staphylococcus aureus bacteremia in children: a cohort study for 2010-2014. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v. 114, n. 6, 1 dez. 2016.
- PETERSON, P. K. *et al.* Effect of protein A on staphylococcal opsonization. **Infection and Immunity**, v. 15, n. 3, p. 760–764, mar. 1977.
- PETROVIC FABIJAN, A. *et al.* Publisher Correction: Safety of bacteriophage therapy in severe Staphylococcus aureus infection. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 652–652, 5 abr. 2020.
- PICCINELLI, A. L. *et al.* Chemical Composition and Antioxidant Activity of Algerian Propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 21, p. 5080–5088, 29 maio 2013.
- PILON, A. *et al.* REDES MOLECULARES: UMA ANÁLISE SOBRE ANOTAÇÕES E DESCOBERTA DE NOVOS ATIVOS. **Química Nova**, 2021.
- PILON, A. C. *et al.* Mass Spectral Similarity Networking and Gas-Phase Fragmentation Reactions in the Structural Analysis of Flavonoid Glycoconjugates. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 16, p. 10413–10423, 20 ago. 2019.
- PRAŽMO, E. *et al.* Photodynamic Therapy As a Promising Method Used in the Treatment of Oral Diseases. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 25, n. 4, p. 799–807, 2016.
- PRZYBYŁEK, I.; KARPIŃSKI, T. M. Antibacterial Properties of Propolis. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2047, 29 maio 2019.
- QUINTINO, R. L. *et al.* Brazilian Green Propolis: Chemical Composition of Essential Oil and Their In Vitro Antioxidant, Antibacterial and Antiproliferative Activities. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, 2020.
- RANA, A.; KUMAR, N. R. Antioxidative potential of propolis on Staphylococcus aureus infected BALB/c mice: A biochemical study. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 59, n. 10, p. 1006–1015, 2022.
- RAYA-CRUZ, M. *et al.* Factors associated with readmission and mortality in adult patients

with skin and soft tissue infections. **International Journal of Dermatology**, v. 58, n. 8, p. 916–924, 15 ago. 2019.

RIBEIRO, I. S. *et al.* Association between body composition and inflammation: A central role of IL-17 and IL-10 in diabetic and hypertensive elderly women. **Experimental Gerontology**, v. 127, p. 110734, nov. 2019.

RIBEIRO, V. P. *et al.* Phytochemical, Antiplasmodial, Cytotoxic and Antimicrobial Evaluation of a Southeast Brazilian Brown Propolis Produced by *Apis mellifera* Bees. **Chemistry & Biodiversity**, v. 18, n. 9, 20 set. 2021.

RIGBY, K. M.; DELEO, F. R. Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 2, p. 237–259, 12 mar. 2012.

RINEH, A. *et al.* Attaching the NorA Efflux Pump Inhibitor INF55 to Methylene Blue Enhances Antimicrobial Photodynamic Inactivation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Vitro and in Vivo. **ACS Infectious Diseases**, v. 3, n. 10, p. 756–766, 13 out. 2017.

RISHI, P. *et al.* Incidence, outcomes, and risk factors for hemorrhagic complications in eyes with polypoidal choroidal vasculopathy following photodynamic therapy in Indian subjects. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 65, n. 8, p. 712, 2017.

ROCHA, M. P. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy in dentistry using an oil-in-water microemulsion with curcumin as a mouthwash. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 32, p. 101962, dez. 2020.

RUDRA, P.; BOYD, J. M. Metabolic control of virulence factor production in *Staphylococcus aureus*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 55, p. 81–87, jun. 2020.

RUFATTO, L. C. *et al.* Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 7, p. 591–598, jul. 2017.

SADER, H. S. *et al.* Antimicrobial Activity of Ceftaroline Tested against *Staphylococcus aureus* from Surgical Skin and Skin Structure Infections in US Medical Centers. **Surgical Infections**, v. 17, n. 4, p. 443–447, ago. 2016.

SALATINO, A. *et al.* Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33–38, 2005.

SANTEZI, C.; REINA, B. D.; DOVIGO, L. N. Curcumin-mediated Photodynamic Therapy for the treatment of oral infections—A review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 409–415, mar. 2018.

SANTOS, D. C. DOS; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. L. Composição química, atividade citotóxica e antioxidante de um tipo de própolis da Bahia. **Química Nova**, 29 set. 2016.

SANTOS, D. P. DOS *et al.* Individual variation is the key to the development of a vaccine against *Staphylococcus aureus*: a comparative study between mice lineages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 5, 2018.

SANTOS, D. P. DOS *et al.* Efficacy of photoactivated *Myrciaria cauliflora* extract against *Staphylococcus aureus* infection – A pilot study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 191, p. 107–115, fev. 2019.

_____. Photoactivated resveratrol controls intradermal infection by *Staphylococcus aureus* in mice: a pilot study. **Lasers in Medical Science**, v. 35, n. 6, p. 1341–1347, 3 ago. 2020.

SANTOS, F. F. DOS *et al.* A review on the anti-inflammatory activities of Brazilian green,

- brown and red propolis. **Journal of Food Biochemistry**, v. 46, n. 10, 26 out. 2022.
- SANTOS, L. A. *et al.* Brazilian Red Propolis shows antifungal and immunomodulatory activities against *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 277, p. 114181, set. 2021.
- SANTOS, M. F. C. *et al.* Isolation of diterpenes from *Araucaria* sp Brazilian brown propolis and development of a validated high-performance liquid chromatography method for its analysis. **Journal of Separation Science**, v. 44, n. 16, p. 3089–3097, 11 ago. 2021.
- SCHUEPFLIN, R. J.; BLANK, I. H. Permeability of the skin. **Physiological Reviews**, v. 51, n. 4, p. 702–747, 1 out. 1971.
- SCHULMAN, J. H.; STOECKENIUS, W.; PRINCE, L. M. Mechanism of Formation and Structure of Micro Emulsions by Electron Microscopy. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 63, n. 10, p. 1677–1680, 1 out. 1959.
- SEILIE, E. S.; BUBECK WARDENBURG, J. Staphylococcus aureus pore-forming toxins: The interface of pathogen and host complexity. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 72, p. 101–116, dez. 2017.
- SERAFIM, M. S. *et al.* Eucalyptus botryoides ' resin and its new 2- O -galloyl-1,6- O -di- trans - p -coumaroyl- β -D-glycopyranoside compound display good antimicrobial activity. **Natural Product Research**, v. 37, n. 4, p. 618–627, 16 fev. 2023.
- SHANG, W. *et al.* Comparative Fitness and Determinants for the Characteristic Drug Resistance of ST239-MRSA-III-t030 and ST239-MRSA-III-t037 Strains Isolated in China. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 3, p. 185–192, abr. 2016.
- SHANNON, P. *et al.* Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, nov. 2003.
- SHI, C. *et al.* Efficacy and safety of cefazolin versus antistaphylococcal penicillins for the treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 508, 11 dez. 2018.
- SHIMIZU, T. *et al.* Anti-Influenza Virus Activity of Propolis in Vitro and its Efficacy against Influenza Infection in Mice. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 19, n. 1, p. 7–13, 1 fev. 2008.
- SHISHU; RAJAN, S.; KAMALPREET. Development of Novel Microemulsion-Based Topical Formulations of Acyclovir for the Treatment of Cutaneous Herpetic Infections. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, n. 2, p. 559–565, 9 jun. 2009.
- SIEVERT, D. M. *et al.* Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 5, p. 668–674, 1 mar. 2008.
- SILVA-JUNIOR, E. A. *et al.* Chemical Diversity in a Stingless Bee–Plant Symbiosis. **ACS Omega**, v. 4, n. 12, p. 15208–15214, 17 set. 2019.
- SILVA, R. S. O. *et al.* Effects of Brazilian green propolis glycolic solutions against bacterial biofilm on elastomers used in maxillofacial prostheses. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3, p. e40111326739, 1 mar. 2022.
- SILVEIRA, M. A. D. *et al.* Effects of Brazilian green propolis on proteinuria and renal function in patients with chronic kidney disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **BMC Nephrology**, v. 20, n. 1, p. 140, 25 dez. 2019.

- _____. Efficacy of Brazilian green propolis (EPP-AF®) as an adjunct treatment for hospitalized COVID-19 patients: A randomized, controlled clinical trial. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 138, p. 111526, jun. 2021.
- SINTOV, A. C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 95, n. 2, p. 173–183, mar. 2004.
- SOHAIL, M.; LATIF, Z. Molecular analysis, biofilm formation, and susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains causing community- and health care-associated infections in central venous catheters. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 51, n. 5, p. 603–609, out. 2018.
- SOUZA SILVA, T. DE *et al.* Green and Red Brazilian Propolis: Antimicrobial Potential and Anti-Virulence against ATCC and Clinically Isolated Multidrug-Resistant Bacteria. **Chemistry & Biodiversity**, v. 18, n. 8, 22 ago. 2021.
- SPAAN, A. N. *et al.* Neutrophils Versus *Staphylococcus aureus* : A Biological Tug of War. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 629–650, 8 set. 2013.
- SPAULDING, A. R. *et al.* Staphylococcal and Streptococcal Superantigen Exotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 3, p. 422–447, jul. 2013.
- STAERCK, C. *et al.* Microbial antioxidant defense enzymes. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 56–65, set. 2017.
- SUAYA, J. A. *et al.* Incidence and cost of hospitalizations associated with *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections in the United States from 2001 through 2009. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 296, 2 dez. 2014.
- SULAEMAN, A.; FIKRI, A. M.; MULYATI, A. H. The bee propolis for preventing and healing non-communicable diseases. *In: Functional Foods and Nutraceuticals in Metabolic and Non-Communicable Diseases*. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 465–479.
- SZLISZKA, E.; KUCHARSKA, A. Z.; *et al.* Chemical Composition and Anti-Inflammatory Effect of Ethanolic Extract of Brazilian Green Propolis on Activated J774A.1 Macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–13, 2013.
- SZLISZKA, E.; MERTAS, A.; *et al.* Inhibition of Inflammatory Response by Artepillin C in Activated RAW264.7 Macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–11, 2013.
- SZUMAŁA, P.; MACIERZANKA, A. Topical delivery of pharmaceutical and cosmetic macromolecules using microemulsion systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 615, p. 121488, mar. 2022.
- TAKEMURA, T. *et al.* 3,4-Dicaffeoylquinic Acid, a Major Constituent of Brazilian Propolis, Increases TRAIL Expression and Extends the Lifetimes of Mice Infected with the Influenza A Virus. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1–7, 2012.
- TEGOS, G. P. *et al.* Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps Potentiate Antimicrobial Photoinactivation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3202–3209, set. 2008.
- TEICHMANN, A. *et al.* Comparison of stratum corneum penetration and localization of a lipophilic model drug applied in an o/w microemulsion and an amphiphilic cream. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n. 3, p. 699–706, nov. 2007.

- TEIXEIRA, C. C. C. *et al.* Microparticles Containing Curcumin Solid Dispersion: Stability, Bioavailability and Anti-Inflammatory Activity. **AAPS PharmSciTech**, v. 17, n. 2, p. 252–261, 4 abr. 2016.
- TEIXEIRA, É. W. *et al.* Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 85–92, 2005.
- TIGABU, A.; GETANEH, A. Staphylococcus aureus, ESKAPE Bacteria Challenging Current Health Care and Community Settings: a Literature Review. **Clinical Laboratory**, v. 67, n. 07/2021, 2021.
- TONG, S. Y. C. *et al.* Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 603–661, jul. 2015.
- TROMBERG, B. J. *et al.* In vivo TUMOR OXYGEN TENSION MEASUREMENTS FOR THE EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF PHOTODYNAMIC THERAPY. **Photochemistry and Photobiology**, v. 52, n. 2, p. 375–385, ago. 1990.
- TRUSHEVA, B. *et al.* Bioactive Constituents of Brazilian Red Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 249–254, 2006.
- TSURUTA, H. *et al.* Enhanced production of IL-2 from anti-CD3 antibody-stimulated mouse spleen cells by artemillin C, a major component of Brazilian green propolis. **Journal of Oral Biosciences**, v. 64, n. 3, p. 366–375, set. 2022.
- TUCHSCHERR, L. *et al.* Staphylococcus aureus requires less virulence to establish an infection in diabetic hosts. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 7, p. 761–769, out. 2018.
- TURNER, N. A. *et al.* Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an overview of basic and clinical research. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 203–218, 8 abr. 2019.
- UTAY, N. S. *et al.* MRSA Infections in HIV-Infected People Are Associated with Decreased MRSA-Specific Th1 Immunity. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 4, p. e1005580, 19 abr. 2016.
- VERONESI, B. *et al.* The Surface Charge of Visible Particulate Matter Predicts Biological Activation in Human Bronchial Epithelial Cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 178, n. 3, p. 144–154, fev. 2002.
- VLAEMINCK, J. *et al.* Exploring Virulence Factors and Alternative Therapies against Staphylococcus aureus Pneumonia. **Toxins**, v. 12, n. 11, p. 721, 18 nov. 2020.
- WAINWRIGHT, M. *et al.* Photoantimicrobials—are we afraid of the light? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. e49–e55, fev. 2017.
- WANG, C.-C. *et al.* Brazilian Green Propolis Extract Synergizes with Protoporphyrin IX-mediated Photodynamic Therapy via Enhancement of Intracellular Accumulation of Protoporphyrin IX and Attenuation of NF-κB and COX-2. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 732, 4 maio 2017.
- WANG, M. *et al.* Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 8, p. 828–837, 9 ago. 2016.
- WARSZYŃSKA, M.; REPETOWSKI, P.; DĄBROWSKI, J. M. Photodynamic therapy combined with immunotherapy: Recent advances and future research directions. **Coordination**

Chemistry Reviews, v. 495, p. 215350, nov. 2023.

WILSON, B. C.; PATTERSON, M. S. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. **Physics in Medicine and Biology**, v. 53, n. 9, p. R61–R109, 7 maio 2008.

WOŹNIAK, M. *et al.* The role of seasonality on the chemical composition, antioxidant activity and cytotoxicity of Polish propolis in human erythrocytes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 301–308, maio 2019.

WU, H.-Y. *et al.* Coronavirus disease 2019 (COVID-19) associated bacterial coinfection: Incidence, diagnosis and treatment. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 55, n. 6, p. 985–992, dez. 2022.

XU, S. X.; MCCORMICK, J. K. Staphylococcal superantigens in colonization and disease. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, 2012.

XU, X. *et al.* The Chemical Composition of Brazilian Green Propolis and Its Protective Effects on Mouse Aortic Endothelial Cells against Inflammatory Injury. **Molecules**, v. 25, n. 20, p. 4612, 10 out. 2020.

YANG, D. *et al.* Pro-inflammatory cytokines increase reactive oxygen species through mitochondria and NADPH oxidase in cultured RPE cells. **Experimental Eye Research**, v. 85, n. 4, p. 462–472, out. 2007.

YUAN, W. *et al.* Brazilian Green Propolis Inhibits Ox-LDL-Stimulated Oxidative Stress in Human Umbilical Vein Endothelial Cells Partly through PI3K/Akt/mTOR-Mediated Nrf2/HO-1 Pathway. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, p. 1–12, 7 jul. 2019.

ZABAIYOU, N. *et al.* Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 207, p. 214–222, out. 2017.

ZENG, D. *et al.* Approved Glycopeptide Antibacterial Drugs: Mechanism of Action and Resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 12, p. a026989, dez. 2016.

ZHANG, H. *et al.* Characterization and antimicrobial activity of a pharmaceutical microemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 395, n. 1–2, p. 154–160, ago. 2010.

ZHANG, S. *et al.* The effect of dietary soyabean isoflavones on photodynamic therapy in K562 leukemia cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 110, p. 28–33, maio 2012.

ZHANG, Y. *et al.* Zeta potential: a surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. **Biomedical Microdevices**, v. 10, n. 2, p. 321–328, 29 abr. 2008.

ZHOU, F. *et al.* Risk factors for nosocomial infection among hospitalised severe influenza A(H1N1)pdm09 patients. **Respiratory Medicine**, v. 134, p. 86–91, jan. 2018.

ZHOU, L. *et al.* A nanoencapsulated hypocrellin A prepared by an improved microemulsion method for photodynamic treatment. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 21, n. 7, p. 2095–2101, 3 jul. 2010.

ZIEGLER, C. *et al.* The dynamics of T cells during persistent *Staphylococcus aureus* infection: from antigen-reactivity to in vivo anergy. **EMBO Molecular Medicine**, v. 3, n. 11, p. 652–666, 2 nov. 2011.

ZULHENDRI, F. *et al.* Propolis in Metabolic Syndrome and Its Associated Chronic Diseases: A Narrative Review. **Antioxidants**, v. 10, n. 3, p. 348, 26 fev. 2021.