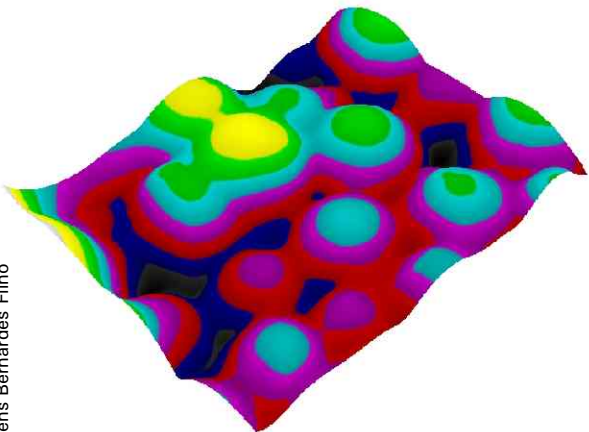


Imagem de AFM: Tassiane Regina Alves Corrêa e
Rubens Bernardes Filho

Análise do Própolis como Elemento Inibidor do Crescimento de Bactéria *Staphylococcus aureus*

Tassiane Regina Alves Corrêa¹
Alexandra Manzoli²
Paulo Renato Orlandi Lasso³
Rubens Bernardes Filho⁴

A utilização de coberturas comestíveis em alguns alimentos, vem despertando maior interesse dos produtores, comerciantes e consumidores, pois trata-se de uma alternativa para a conservação dos alimentos com apelo ecológico e natural. Neste contexto, o própolis será utilizado como um elemento inibidor do crescimento de bactérias na conservação dos alimentos para aumentar o tempo de prateleira.

Foi testado o efeito de várias concentrações de própolis sobre a bactéria *Staphylococcus aureus* que é uma das mais comuns e uma das mais antigas bactérias parasitas do homem, sendo o seu habitat natural o intestino. É uma bactéria Gram-positiva, (Figura 1), com forma esférica, que pode causar infecções intestinais e respiratórias.

Os *Staphylococcus* são anaeróbios facultativos ou seja, podem viver em meios aeróbios, usando oxigênio, ou anaeróbios através de fermentação, mas crescem muito mais rapidamente na presença de oxigênio. Não têm flagelo, nem cílios, logo são incapazes de se mover por si só. A sua temperatura de cultivo é 37°C, muito próxima a do corpo humano.

Os *Staphylococcus* são destruídos por desinfetantes, sabão, altas temperaturas e solução de álcool 70%. Resistem bem à desidratação, durante longos períodos no homem. O contágio normalmente ocorre por contato direto com pessoas ou objetos contaminados.

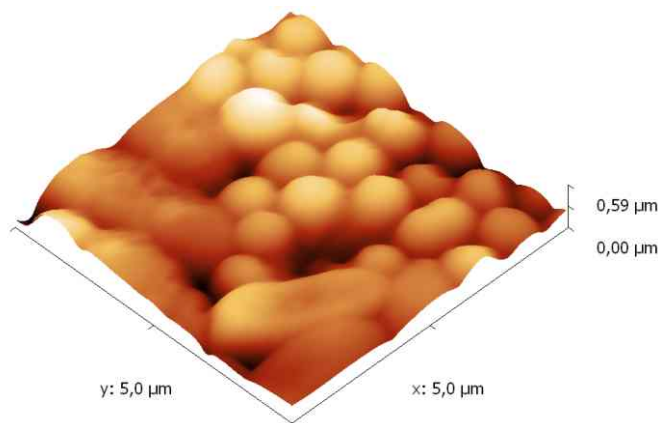


Fig. 1 - Imagem de *Staphylococcus aureus*, depositada sobre a mica, obtida com microscopia de força atômica.

Própolis é uma substância resinosa obtida pelas abelhas através da coleta de resinas das flores e alteradas pela ação das enzimas contidas em sua saliva. A cor, sabor e o aroma do Própolis variam de acordo com sua origem botânica. Sua composição típica é de 55% de resinas vegetais; 30% de cera de abelhas; 8 a 10% de óleos essenciais; e 5% de pólen aproximadamente (PARK, et al, 1998). Podem ocorrer variações em sua composição devido a origem da matéria prima e espécie de abelha que o produz.

¹Graduando em biologia, aluna de Inic. Científica, Embrapa Instrumentação Agropecuária, Rua XV de novembro, 1452, São Carlos, SP, CEP 13560-970, tassiane@cnpdia.embrapa.br.

²Química, Dr., aluna de Pós Doutorado da Embrapa Instrumentação Agropecuária, Rua XV de novembro, 1452, São Carlos, SP, CEP 13560-970, alexandra@cnpdia.embrapa.br.

³Engenheiro Eletrônico, Msc, Analista da Embrapa Instrumentação Agropecuária, Rua XV de novembro, 1452, São Carlos, SP, CEP 13560-970, lasso@cnpdia.embrapa.br.

⁴Físico, Dr. Pesquisador da Embrapa Instrumentação Agropecuária, Rua XV de novembro, 1452, São Carlos, SP, CEP 13560-970, rubens@cnpdia.embrapa.br.

Dos mais de 200 compostos químicos já foram identificados no Própolis, entre os principais compostos ativos podemos citar os flavonóides, ácidos aromáticos, terpenóides, aldeídos, álcoois, ácidos alifáticos e ésteres, aminoácidos, esteróides, açúcares, etc (VARGAS, et al, 2004).

O Própolis possui diversas propriedades terapêuticas. Desde a antiguidade o Própolis já era utilizado como medicamento popular no tratamento de feridas e infecções. As histórias das medicinas das civilizações Chinesa, Tibetana, Egípcia e também a greco-romana são ricas, todas contendo em seus escritos antigos centenas de receitas onde entram principalmente mel, própolis, larvas de abelhas e às vezes as próprias abelhas, para curar ou prevenir enfermidades. O Própolis é conhecido como um poderoso antibiótico natural.

Hoje o Própolis é utilizado com maior frequência na prevenção e tratamento de feridas e infecções da via oral, também como antimicótico e cicatrizante. Estudos mais recentes indicam eficiente ação de alguns de seus compostos ativos com ação imuno-estimulante e antitumoral (PARK, et al, 1998).

A microscopia de força atômica (MFA) é uma técnica que tem a capacidade de fornecer informações que não eram possíveis de se obter com o uso da microscopia eletrônica de varredura. Por conseguir obter imagens de superfície de materiais sob as mais variadas condições (ar, vácuo e em meio líquido), tornou-se um dos equipamentos mais adequados para o estudo de superfície de materiais nas escalas micro (10^6 m) e nano (10^9 m) (BERNARDES-FILHO, MATTOSO, 2003).

O funcionamento do MFA baseia-se na atração ou repulsão de uma sonda ultra fina pela superfície da amostra. Como a força envolvida nesta interação é muito fraca, foi necessário desenvolver um sistema ultra sensível de medição. Ele trabalha de forma semelhante às agulhas de um toca-discos. No lugar da agulha, encontra-se o cantilever, que consiste de uma haste flexível em cuja parte inferior é crescida uma ponta com dimensão de poucas micra. Para percorrer a amostra de forma a obter uma imagem, é utilizado um sistema de posicionamento que utiliza cerâmicas piezoelétricas, capazes de realizar movimentos nas três direções (xyz), com precisão de angstroms (Å). Durante esta varredura, emprega-se também um sistema de alinhamento com feixe de laser, que incide sobre o cantilever e reflete em um sensor de quatro quadrantes. O sensor fornece informações de localização para o sistema de realimentação e controle, que corrige a posição do cantilever de forma a manter o contato com a amostra, durante a varredura e permitir a obtenção da imagem (OSIRO, 1998).

Essa técnica apresenta várias vantagens em relação às microscopias eletrônica (ME) de varredura e eletrônica de transmissão, dentre elas a de dispensar o uso de vácuo ou do recobrimento da amostra, características muito convenientes no estudo de material de origem biológica. Além da possibilidade de realizar medidas diretas de altura e rugosidade. As imagens obtidas com os diferentes tipos de MFA são relacionadas com a natureza das forças envolvidas: repulsão coulombica (MFA modo contato), interação de van der Waals (MFA modo não contato e contato intermitente) (OSIRO, et al, 1997).

O objetivo foi determinar a faixa ideal de valores de concentração de própolis para promover a inibição do crescimento bacteriano e, conseqüentemente, o aumento do tempo de prateleira de alimentos revestidos com filmes que contenham própolis.

Materiais e Métodos

Para a realização dos experimentos foram utilizados os seguintes materiais:

- *Staphylococcus aureus* inóculos fornecidos pelo laboratório de Biofísica do Instituto de Física de São Carlos
- Meio LB (5g de Extrato de Levedura (Acumedia), 10g de NaCl, 15g de ágar (Acumedia), 10g de Tripitona (Acumedia) e 1L de água destilada)
- Álcool 70% PA (Synth)

Os experimentos foram realizados utilizando os seguintes equipamentos:

- Espectrofotômetro UV Shimadzu modelo 1601 PC.
- Própolis fornecido pela empresa Wenzel e Mecca.
- Estufa para crescimento de bactérias.
- Microscópio de força atômica Veeco modelo Dimension V.

Os ambientes de crescimento e manipulação da bactéria foram higienizados com uso de álcool 70%.

O meio LB foi preparado e ajustado para o pH 7,0. Depois de preparado o mesmo foi autoclavado por 25 min a 120° , para esterilização. Em seguida o meio foi distribuído em placas de petri, previamente esterilizadas.

Preparou-se 4 soluções estoque diferentes: 0,01g/ml de própolis, 0,05g/ml de própolis, 0,1g/ml de própolis e natural (sem própolis).

Depois foi feito um pré-inóculo da *S. aureus* em 100 mL de meio de cultura para distribuir nos erlenmeyer com própolis. Após deixou crescer por 12h e desse pré-inóculo, inoculou-se 10 mL em cada erlenmeyer, contendo assim 0,001g/mL, 0,0015g/mL, 0,005g/mL e natural (sem própolis) logo foi deixado no agitador. O tempo do experimento foi de 10h, utilizando o espectrofotômetro de UV.

Resultados

Para as diferentes concentrações de própolis foram obtidos os seguintes resultados mostrados na Tabela 1 e Figura 2.

Tabela 1 - Curvas de Crescimento da *Staphylococcus aureus* com diferentes concentrações de própolis analisado no UV.

	0,001 g/mL	0,0015 g/mL	Natural
0 h	0,4164	0,3723	0,1990
1 h	0,3645	0,3124	0,4302
2 h	0,4626	0,4031	0,6627
3 h	0,5044	0,4633	0,7943
4 h	0,5974	0,5854	0,8169
5 h	0,7666	0,6387	0,9138
6 h	0,7548	0,6384	0,9363
7 h	0,9045	0,7177	2,0655
8 h	0,9560	0,7578	2,1045
9 h	0,9774	0,7950	2,1618
10 h	0,9960	0,8278	2,2272

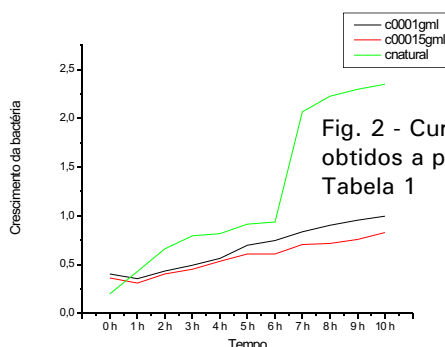


Fig. 2 - Curvas de crescimento obtidas a partir dos valores da Tabela 1

O experimento foi repetido, e as curvas resultantes apresentaram pouca variação em relação aos gráficos da figura 2. As variações podem ser atribuídas a pequenas variações de temperatura no laboratório durante a realização dos experimentos.

Observou-se que as concentrações de 0,001g/mL e 0,0015g/mL, apresentaram resultado de inibição de crescimento da bactéria *S. aureus* e, que foi comprovado na repetição do procedimento.

Depois foram feitas imagens da bactéria no microscópio de força atômica (AFM), e plotados os gráficos das curvas de força a partir das quais foram obtidos os valores das forças de adesão entre a amostra e a agulha do MFA.

Para todas as medidas de curva de força, foram marcados 81 pontos igualmente espaçados sobre uma região de 5 x 5 m.

Para obtenção da curva de força da *Staphylococcus aureus* na concentração de 0,001 g/ml de própolis foram utilizados 28 pontos que estavam exatamente sobre a bactéria visualizada. A força de adesão média nesses 28 pontos foi de 38,505 nN.

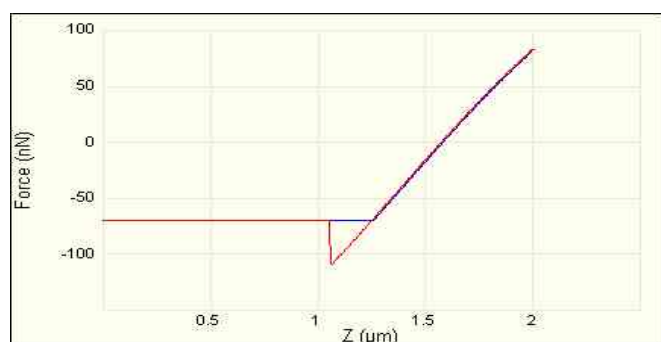


Fig. 3 - Curva de força típica do *Staphylococcus aureus* obtida sobre a presença de uma concentração de 0,001g/ml de própolis

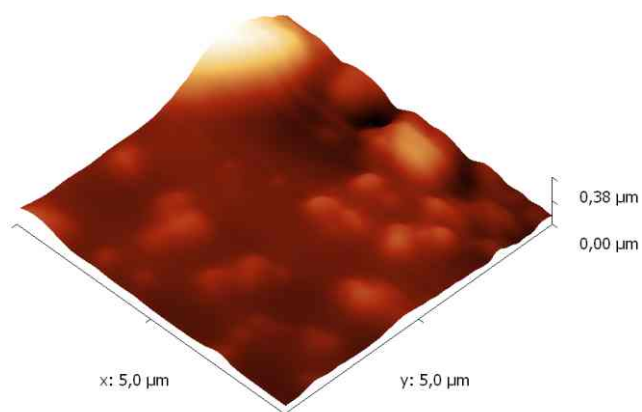


Fig. 4 - Imagem de AFM da bactéria *Staphylococcus aureus* sobre a mica na concentração de 0,001 g/ml de própolis

Para obtenção da curva de força da *Staphylococcus aureus* na concentração de 0,0015 g/ml de própolis foram utilizados 54 pontos que estavam exatamente sobre a bactéria visualizada. A força de adesão média nesses 54 pontos foi de 18,3353 nN.

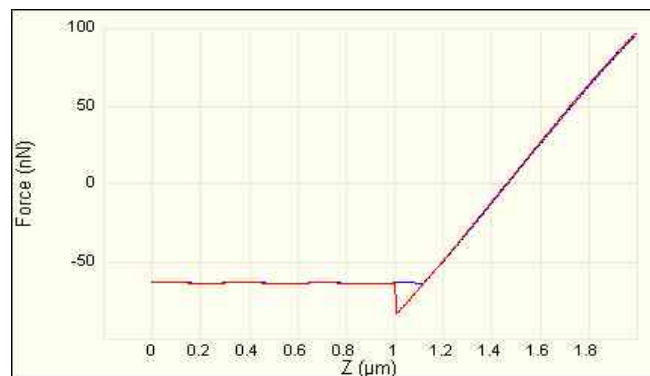


Fig. 5 - Curva de força típica do *Staphylococcus aureus* obtida sobre a presença de uma concentração de 0,0015 g/ml de própolis

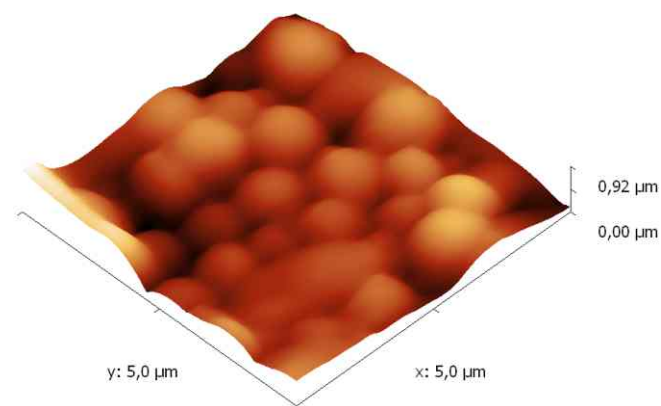


Fig. 6 - Imagem de AFM da bactéria *Staphylococcus aureus* sobre a mica na concentração de 0,0015 g/ml de própolis

Para obtenção da curva de força da *Staphylococcus aureus* em solução LB puro, sem concentração nenhuma de própolis foram utilizados 45 pontos que estavam exatamente sobre a bactéria visualizada. A força de adesão média nesses 45 pontos foi de 123,14 nN.

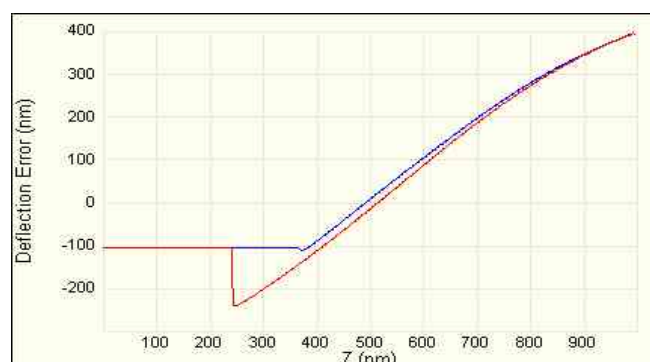


Fig. 7 - Curva de força típica do *Staphylococcus aureus* obtido em meio LB puro (sem própolis)

Também foi obtido uma curva de força do própolis sobre a mica, para comparar com as demais curvas da bactéria *Staphylococcus aureus*. Também foram utilizados os mesmos procedimentos, mas foram marcados 81 pontos na amostra e desses utilizou-se todos os pontos visualizados. A força de adesão média nesses 81 pontos foi de 27,92 nN.

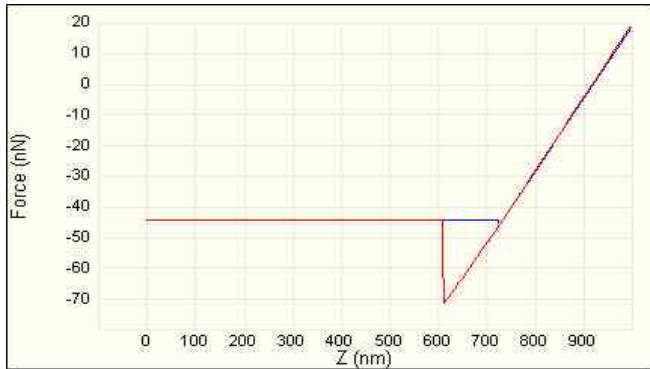


Fig. 8 - Curva de força do Própolis

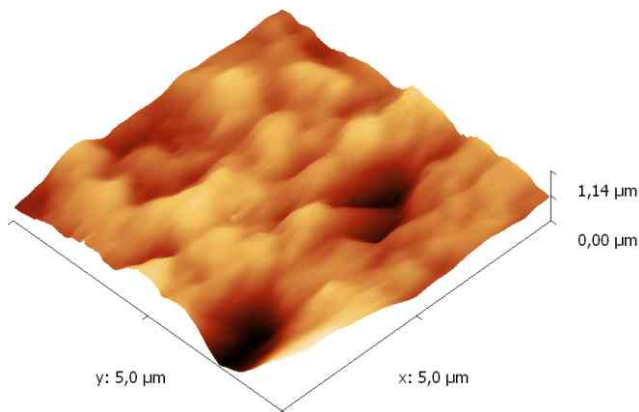


Fig. 9 - Imagem de AFM do própolis sobre a mica.

Conclusão

Com base nos resultados obtidos por espectrofotometria UV, pode-se concluir que as concentrações de própolis na faixa de 0,001g/ml a 0,0015g/ml são as ideais para promover a inibição do crescimento da *Staphylococcus aureus*.

Concentrações acima desta faixa não inibiram o crescimento bacteriano. Conclui-se também que o própolis utilizado apresentou efeito bacteriostático e não bactericida.

Tendo por base os resultados obtidos nas medidas de curvas de força, conclui-se que a adesão da agulha nas amostras com concentrações acima da faixa ideal é maior que a adesão da agulha nas amostras com concentrações de 0,001 g/ml e 0,0015 g/ml. Isto sugere que a solução com menor concentração (0,001 g/ml) recobre de maneira mais uniforme as bactérias da amostra, tendo uma ação mais efetiva sobre elas. Nas

soluções com maiores concentrações deve ocorrer a formação de aglomerados de própolis não permitindo um recobrimento uniforme da amostra o que deve prejudicar a ação do própolis sobre as bactérias.

Agradecimento

A W. Wenzel Industria e Comércio de Produtos Apícolas Ltda pelo fornecimento da resina de própolis para o desenvolvimento do trabalho.

Referências

- BERNARDES FILHO, R.; MATTOSO, L. H. C. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo. Editora Artliber, 2003. p. 201-207.
- BERNARDES FILHO, R.; OSIRO, D., HERRMANN, P. S. P.; COLNAGO, L. A.; FROMMER, J. E. **Uso da Microscopia de Força Atômica para visualização de bacteriófagos filamentosos**. São Carlos: EMBRAPA-CNPDIA, 1996. 4 p. (EMBRAPA-CNPDIA. Pesquisa em andamento, 6).
- OSIRO, D.; COLETA FILHO, E. D.; MACHADO, M. A.; COLNAGO, L. A. Estudos iniciais da Xylella Fastidiosa por microscopia de força atômica. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE INSTRUMENTAÇÃO AGROPECUÁRIA, 2., 2000, São Carlos. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2000. p. 267-272. Editores: Paulo Estevão Cruvinel; Luiz Alberto Colnago; Andre Torre Neto.
- OSIRO, D.; BERNARDES FILHO, R.; COLNAGO, L. A. **Preparação de amostras de bactérias para realização de imagens de microscopia de força atômica**. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 1997. 7 p. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Comunicado Técnico, 20).
- OSIRO, D. **Análise de vírus e bactérias por microscopia de força atômica**. 1998. 93 f. Dissertação (Mestrado - Ciências Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago.
- PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia**, Rio de Janeiro, v. 18. n. 3, 1998.
- VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N. M.; COSTA, M. M.; SILVA, M. S.; VIANA, L. R. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcóolico de própolis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 159-163, 2004.

Comunicado Técnico, 91

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Instrumentação Agropecuária
 Rua XV de Novembro, 1542 - Caixa Postal 741
 CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: 16 3374 2477
Fax: 16 3372 5958
E-mail: sac@cnpdia.embrapa.br
 www.cnpdia.embrapa.br

1a. edição
 1a. impressão 2007: tiragem 300

Comitê de Publicações

Presidente: Dr. Carlos Manoel Pedro Vaz
Membros: Dra. Débora Marcondes B. P. Milori,
 Dr. João de Mendonça Naime,
 Dr. Washington Luiz de Barros Melo
 Valéria de Fátima Cardoso

Membro Suplente: Dr. Paulo S. P. Herrmann Junior

Expediente

Revisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Tratamento das ilustrações: Valentim Monzane
Editoração eletrônica: Valentim Monzane