

ANÁLISE POR AFM DA AÇÃO DO EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE SOBRE AS MORFOLOGIAS DE BACTÉRIAS *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*

Jessica Valéria de Campos^{1,2}, Odílio Benedito Garrido Assis², Rubens Bernardes Filho²

¹PPG Biotecnologia – UFSCar, São Carlos, SP. jessicavcampos@yahoo.com.br

²Embrapa Instrumentação, Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio, São Carlos, SP. odilio.assis@embrapa.br; rubens.bernardes@embrapa.br

Classificação: Desenvolvimentos de nanocompósitos a partir de fontes renováveis

Resumo

Pesquisas sobre novas alternativas de agentes ativos naturais possibilitam a substituição, ainda que de forma parcial, de drogas antimicrobianas sintéticas. Neste contexto, o interesse na caracterização das atividades biológicas da própolis tem ganhado importância. A ação antimicrobiana da própolis está comprovada em diversos estudos, entretanto, ainda são escassas informações sobre os mecanismos de sua ação antimicrobiana. Análises por microscópio de força atômica (AFM) permitem avaliar alterações das estruturas superficiais de bactérias tratadas com o extrato de própolis, sendo este o principal objetivo do presente trabalho. Para as análises foi selecionado o extrato etanólico (EEP) por apresentar uma maior capacidade de ação. Os componentes presentes neste extrato interagem com a *S. aureus* (Gram-positiva), gerando um aumento do volume celular, e provável ocorrência de bacteriólise. Quando em contato com a *E. coli* (Gram-negativa) foi necessário uma maior concentração de EEP para a detecção de claras alterações celulares, sendo identificado a presença de irregularidades na parede celular. De uma forma geral, a própolis indicou que a ação sobre a parede celular das bactérias é o principal mecanismo que leva a inibição de crescimento.

Palavras-chave: própolis; atividade antibacteriana; parede celular; AFM.

AFM ANALYSIS OF THE ACTION OF GREEN PROPOLIS EXTRACT ON THE MORPHOLOGY OF *Staphylococcus aureus* AND *Escherichia coli* BACTERIA.

Abstract

Research on new alternatives for natural agents allows the substitution, even partially, of the synthetic antimicrobial drugs. In this context, the interest in the characterization of the biological activities of propolis has gained importance. The antimicrobial action of this resin has been proven in several studies however, the analysis of the mechanism of its antimicrobial action is still scarce. Analyzes by atomic force microscopy (AFM) allows evaluating modifications on the surface structures of bacteria treated with propolis extract, which is the main aim of this work. The ethanolic extract (EEP) was selected for analyses because of its greater antibacterial capacity. The components present in this extract caused interactions with *S. aureus* (Gram-positive), leading to an increase in cell volume, and a probable occurrence of bacteriolysis. When in contact with *E. coli* (Gram-negative), a higher concentration of EEP was required to generate a clear cellular alterations observable on the cell walls. In general, propolis has been shown to have action under the cell wall of bacteria, leading to their inhibition of growth.

Keywords: propolis; antibacterial activity; cellular wall; AFM.

Publicações relacionadas:

De CAMPOS, J.V. Avaliação da atividade antimicrobiana e análise morfológica por microscopia de força atômica (AFM) da ação de extratos de própolis verde sobre bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, São Carlos, 2016.

1 INTRODUÇÃO

A resistência de micro-organismos patogênicos a agentes antibacterianos tem se tornado um problema de escala global, decorrente do uso indiscriminado de antimicrobianos sintéticos, seja no setor agropecuário e, principalmente, no de saúde humana, o que tem gerado a ocorrência de patogênicos de alta resistividade. Assim, o emprego de antimicrobianos naturais, como a própolis, que é capaz de inibir o desenvolvimento desses micro-organismos é altamente desejável. A própolis pode ser definida como uma substância resinosa natural, coletada pelas abelhas em diversas partes das plantas (GHISALBERTI, 1978).

Diversos estudos mencionam que extratos etanólicos de própolis (EEP) apresentam alta capacidade de inibição do crescimento de bactérias do tipo Gram-positivas e inferior atividade sobre as Gram-negativas. Sforcin e colaboradores (2000), registraram a forte ação do EEP a baixas concentrações contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* o que, no entanto foram necessárias maiores concentrações para ações satisfatórias contra a Gram-negativa *Escherichia coli*. O possível mecanismo de ação antibacteriana da própolis é interpretado com base na interferência introduzida no processo de divisão celular, alterações na membrana plasmática e também na possibilidade de deformações das paredes celulares, resultando em bacteriolise que pode gerar desequilíbrios osmóticos.

A microscopia de força atômica (AFM) é uma ferramenta de análise superficial que não necessita de revestimento condutor na superfície da amostra, tornando-a ideal para análises em amostras de origem biológica, em particular na caracterização morfológica de bactérias (HODGES, 2002; OSIRO et al., 2012). Assim, no presente estudo, as alterações de morfologia das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* após interação temporal com EEP foram investigadas com o auxílio do AFM com o objetivo principal de avaliar a intensidade das ações desse composto sobre a morfologia bacteriana.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O extrato etanólico de própolis (EEP) foi produzido de acordo com o processo desenvolvido pela Embrapa no qual, 13,75 g da própolis triturada foi submetida a maceração em 100 mL de álcool etílico absoluto. A solução permaneceu sob agitação magnética em 180 rpm, por 15 dias em 28°C±2,0. A 24 h de repouso e então retirado o sobrenadante que foi filtrado em filtro com membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com diâmetro de poros de 0,2 µm.

Para análise em AFM as bactérias foram imobilizadas sob lâminas vítreas segundo adaptação do método apresentado por Santana et al. (2012). O preparo inicial dos micro-organismos consistiu na inoculação em tubo falcon em meio Müller-Hinton e incubação por 24 h em 35°C. O tubo foi centrifugado (2090 xg) e o precipitado bacteriano lavado por três vezes com solução salina 0,9% e ressuspensão em 5 mL da mesma solução. Posteriormente foram ressuspensas na concentração de 10⁷ UFC/mL em dois tubos contendo 5 mL de solução salina, sendo um designado como controle e o outro identificado como tratamento. No tubo do grupo tratamento foram adicionados separadamente o volume de 5 µL de EEP para a bactéria *S. aureus* e 156 µL para a *E. coli*, conforme valores previamente definidos. Os tubos foram incubados por 4 h em 35°C sob agitação (180 rpm). O mesmo procedimento foi realizado para o período de 12 horas. Após o tempo de incubação, os tubos foram centrifugados (6150 xg) por 15 min a 28°C, a suspensão bacteriana foi lavada três vezes com água deionizada e ressuspensa em 5 mL de água deionizada. Finalmente, uma alíquota de 20 µL foi vertida sobre a superfície de uma lâmina de vidro com secagem espontânea ao ar. Anterior à imobilização, as lâminas foram tratadas durante 10 minutos em ultrassom com isopropanol e, posteriormente, lavadas com água deionizada. Na análise em AFM, foi utilizado o microscópio de força atômica da VEECO – Nanosurf e imagens (5 x 5 µm) geradas em modo intermitente no ar e em temperatura 28°C.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 estão apresentadas as imagens de *S. aureus* que foram analisadas para o período de 4 horas de interação com o EEP. É possível visualizar células com forma esférica, com a estrutura íntegra características de cocos, enquanto as bactérias expostas ao tratamento apresentaram pequenas

alterações morfológicas como aumentos da altura celular e da rugosidade superficial associada a indícios de deformação estrutural podem supor a ocorrência de lise. Através do Software Gwyddion foram obtidos os valores médios de volume dos grupos controle e tratamento, dispostos na Tabela 1. Comparando os valores da tabela, temos que as bactérias expostas ao extrato apresentam aumento do volume medido, sugerindo a ocorrência de bacteriólise conforme indicado na Figura 1C.

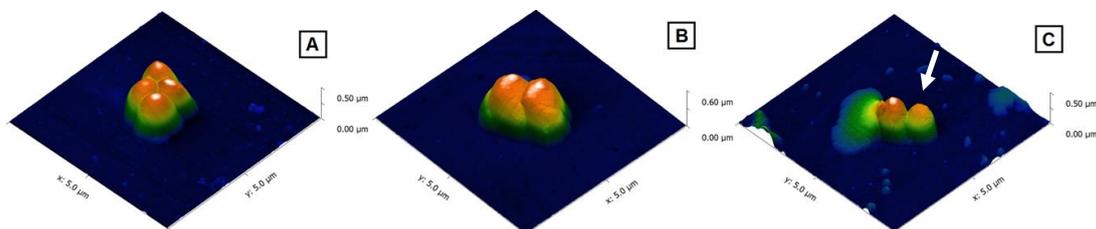


Figura 1. Imagens topográficas das células de *S. aureus* em 4 horas. (A) Grupo controle, (B) e (C) grupo tratado com extrato EEP. A seta na imagem (C) indica uma estrutura deformada por uma aparente bacteriólise.

Tabela 1. Média das dimensões morfológicas de *S. aureus* expostas e não ao EEP durante 4 horas

<i>S. aureus</i>		
Dimensões	Grupo controle	Grupo tratamento
Volume (μm^3)	0,251 \pm 0,107 ^a	0,338 \pm 0,106 ^b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas a $p < 0,05$

Na análise para o período de 12 horas (Fig. 2) foram observadas bactérias íntegras na forma característica de cocos no grupo controle. Entretanto, as bactérias do grupo tratamento apresentaram aumento do volume celular decorrentes da degeneração morfológica (perdas das características de cocos), resultando em estruturas disformes (n=23) sugerindo a presença de bactérias que sofreram lise celular, como as visualizadas na Figura 2C. Os valores das dimensões bacterianas (Tabela 2) confirmam as alterações celulares, indicando o aumento do volume das células do grupo tratamento quando comparadas ao grupo controle. Além disso, quando comparadas os valores nota-se que a influência do tempo de exposição das células ao EEP é fundamental para a ação da propolis. As bactérias *E. coli* do grupo controle no período de 4 h (Fig. 3) apresentaram estruturas características como a forma bastão. O grupo tratamento exibe alterações nesta estrutura além de um incremento da rugosidade (Fig. 3C), em concordância com as observações visuais (imagens).

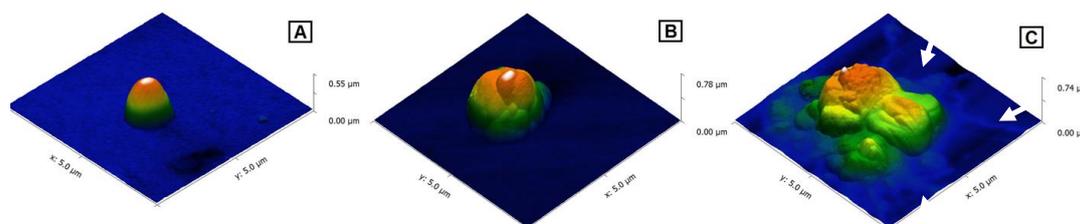


Figura 2. Imagens topográficas das células de *S. aureus* em 12 horas. A) Grupo controle, (B) e (C) grupo tratado com extrato EEP. As setas na imagem (C) indicam estruturas deformadas por aparente bacteriólise.

Tabela 2. Média das dimensões morfológicas de *S. aureus* expostas e não ao EEP durante 12 horas

<i>S. aureus</i>		
Dimensões	Grupo controle	Grupo tratamento
Volume (μm^3)	0,266 \pm 0,119 ^a	0,751 \pm 0,193 ^b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas a $p < 0,05$.

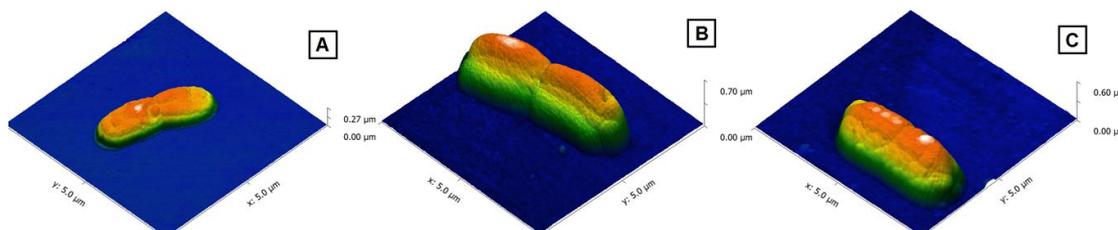


Figura 3. Imagens das células de *E. coli* em 4 horas de interação. A) Grupo controle, (B) e (C) grupo tratado.

Tabela 3. Média das dimensões morfológicas de *E. coli* expostas e não ao EEP durante 4 horas

<i>E. coli</i>		
Dimensões	Grupo controle	Grupo tratamento
Volume (μm^3)	0,300 \pm 0,045 ^a	1,661 \pm 0,473 ^b

Letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença estatística (Tukey, $p < 0,05$).

As bactérias expostas pelo período de 12 h apresentaram maior degradação de suas estruturas, como observado na Figura 4. As bactérias do grupo apresentaram suas características de bacilo, enquanto que as bactérias expostas ao extrato apresentaram danos na parede celular. Pelos dados da Tabela 4 pode-se afirmar que a própolis tem ação degradativa sobre a estabilidade celular o que leva a uma deformação estrutural acarretando um aumentando das dimensões celulares.

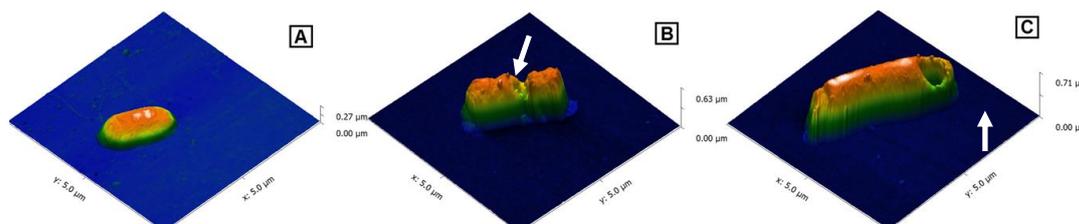


Figura 4. Imagens topográficas das células de *E. coli* em 12 horas. A) Grupo controle, (B) e (C) grupo tratado com extrato EEP. As setas nas imagens (B) e (C) indicam alteração da parede celular

Tabela 4. Média das dimensões morfológicas de *E. coli* expostas e não ao EEP durante 12 horas

<i>E. coli</i>		
Dimensões	Grupo controle	Grupo tratamento
Volume (μm^3)	0,560 \pm 0,167 ^a	1,396 \pm 0,443 ^b

Letras diferentes na mesma linha indicam que há diferença estatística (Tukey, $p < 0,05$).

4 CONCLUSÃO

A atividade antibacteriana do EEP sobre a parede celular pôde ser confirmada através dos resultados obtidos pelas imagens de AFM, sendo possível diferenciar a capacidade degradativa da própolis frente às bactérias estudadas. Foi possível confirmar a maior eficiência do EEP sobre a *S. aureus* (Gram-positiva) do que contra a *E. coli* (Gram-negativa), provavelmente devido as diferenças de interação com as paredes celulares dessas bactérias.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da UFSCar, a CAPES e a Rede AgroNano por auxílios recebidos. Agradecem também a Wenzel Indústria e Comércio de Produtos Apícolas LTDA pelo fornecimento da própolis e as técnicas Joana Dias Bresolin e Silvine Zanni da Embrapa Instrumentação.

REFERÊNCIAS

- GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. *Bee World*, v. 60, n.2, p. 59-84, 1978.
- HODGES, C. S. Measuring forces with the AFM: polymeric surfaces in liquids. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 99, n.1, p. 13-75, 2002.
- OSIRO, D.; BERNARDES FILHO, R.; ASSIS, O.B.G.; JORGE, L.A.C.; COLNAGO, L.A. Measuring bacterial cells size with AFM. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, n. 1, p. 341-347, 2012.
- SFORCIN, J. M.; FERNANDES Jr., A.; LOPES, C. A. M. BANKOVA, V. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73, n. 1-2, p. 243-249, 2000.
- SANTANA, H.F.; BARBOSA, A.A.T.; MANTOVANI, H.C. Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n. 2, p. 485-491, 2012.