

# Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha

Y. L. F. Maia-Araújo<sup>1</sup>; L. S. Mendonça<sup>2</sup>; S. C. Orellana<sup>3</sup>, E. D. Araujo<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Cromatografia e Flavor, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-SE, Brasil

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente da Universidade Tiradentes, 49045-000, Aracaju-SE, Brasil

<sup>3</sup> Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, 30190-110 - Belo Horizonte-MG – Brasil

<sup>4</sup> Laboratório de Genética e Conservação de Recursos Naturais, Universidade Federal de Sergipe, 49100-000, São Cristóvão-SE, Brasil

ylmaia@yahoo.com.br

(Recebido em 28 de março de 2011; aceito em 11 de abril de 2011)

A própolis é uma resina natural extraída de vegetais e modificada pelas abelhas melíferas. Esta resina possui ação antimicrobiana e serve para vedar caixas e manter a assepsia da colmeia. O objetivo deste estudo foi comparar os métodos de difusão em agar (técnicas do poço e do disco de papel) avaliando a atividade antibacteriana do extrato de própolis vermelha obtidas na região da foz do rio São Francisco em três diluições frente à *Staphylococcus aureus*. O extrato hidroalcoólico de própolis vermelha possui atividade antibacteriana frente a *S. aureus*, sendo a quantidade de 15 µL a que melhor inibiu o microrganismo, caracterizando dose-dependência. Não houve diferença estatística significativa entre as duas técnicas avaliadas, porém, pode sugerir que a técnica de difusão em poço apresenta maior confiabilidade nos resultados apresentados neste estudo.

Palavras-chave: difusão, microrganismo, *Apis mellifera*

Propolis is a natural resin extracted from plants or modified by the honeybee. This resin has antimicrobial action and serves to seal hives and keep the colonies sterile. The aim of this study was to compare the methods of agar diffusion (techniques of the well and disc), evaluating the antibacterial activity of red propolis extract, obtained from São Francisco mouth area, in three dilutions against *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600). The extract of propolis has antibacterial activity against *S. aureus*, the quantity of 15 µL to best inhibit the microorganism, characterizing dose-dependency. There was no statistically significant difference between the two techniques evaluated, however, may suggest that the diffusion in the well has greater confidence in the results presented in this study.

Keywords: diffusion, microorganism, *Apis mellifera*

## 1. INTRODUÇÃO

A própolis é uma mistura complexa de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas colhidas por abelhas melíferas de brotos, flores e exsudatos de plantas, às quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para a elaboração do produto final [1].

Esta resina é responsável pelo fechamento de frestas e pela assepsia da colmeia por apresentar ação antimicrobiana, e durante séculos vem sendo muito utilizada por suas propriedades farmacêuticas [2 e 3]. Além de sua atividade antibacteriana, antifúngica e propriedade antiviral, as variedades de própolis podem apresentar muitos outros benefícios, tais como: atividade antioxidante, antitumoral, antiinflamatória, hepatoprotetora, anestésica local, imunoestimuladora, antimutagênica, dentre outras [4,5,6 e 7]. Em geral, as própolis são compostas por 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleo essencial e compostos aromáticos, 5% de pólen e 5% de várias outras substâncias, incluindo restos orgânicos [8].

Numa revisão considerando 100 anos de pesquisas com própolis [9], pesquisadores analisaram a relação existente entre as propriedades biológicas de própolis e sua composição química, e sugeriram que a ação antimicrobiana das própolis brasileiras esteja intimamente relacionada com a concentração de flavonóides e ácido cafeico encontrados. De acordo com estudo realizado para a classificação de própolis [10], as diversidades brasileiras foram categorizadas em doze tipos quanto à aparência e coloração dos extratos. Um novo tipo de própolis de coloração vermelha, de colmeias encontradas ao longo da praia e

dos rios do nordeste do Brasil, foi classificado como própolis do grupo 13, de acordo com as características físico-químicas e biológicas diferenciais [11]. Essa própolis ocorre também no litoral sergipano e tem demonstrado atividade de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos com uso de membranas biológicas de colágeno, ação antioxidante e antimicrobiana [12,13 e 14].

Diversos métodos laboratoriais podem ser empregados para prever a sensibilidade *in vitro* de bactérias aos agentes antimicrobianos de própolis. Muitos laboratórios de análises clínicas usam, de forma rotineira, o método de difusão em disco para testar a sensibilidade de patógenos comuns de crescimento rápido e certas bactérias fastidiosas frente a antimicrobianos [15]. Outro método qualitativo também usado para analisar atividade antimicrobiana em laboratórios de análise microbiológica de medicamentos ou mesmo de extratos naturais é a técnica do poço [16 e 17].

Considerando a escassez de informações sobre a eficácia dos dois principais métodos empregados nos laboratórios, este trabalho teve como objetivo comparar os métodos de difusão em agar (técnicas do poço e do disco) avaliando a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha em três diluições frente à *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600).

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

A amostra de própolis vermelha foi coletada em um apiário localizado no município de Brejo Grande/SE situado na região da Foz do rio São Francisco. A extração foi realizada em banho ultrassônico usando 1,0 grama de própolis para 15 mL de etanol 70% seguindo metodologia proposta por Park *et al.*, [10] com modificações. O extrato hidroalcoólico de própolis (EHP) foi evaporado em capela de exaustão e em seguida deixado em dissecador com sílica para evaporação da parte aquosa até manter peso constante. Para avaliação do teste de sensibilidade, o extrato foi ressuscitado na concentração de 50 mg/mL em etanol 70%. A avaliação da atividade antibacteriana da própolis vermelha sobre *S. aureus* (ATCC 12600) foi realizada em nove repetições. Os volumes dos extratos testado em cada técnica foi de 5, 10 e 15  $\mu$ L.

O inóculo padronizado de acordo com o número 0,5 da escala de Mc Farland foi semeado em placas de Petri contendo meio agar Mueller Hinton. Em seguida foram marcados os poços de 5,0 mm de diâmetro em cada placa, e com o auxílio de uma bomba a vácuo os poços foram succionados usando uma ponteira de polipropileno estéril cortada e acoplada à extremidade de uma mangueira. A técnica de difusão em disco foi realizada utilizando o método padrão recomendado pelo NCCLS [15] com modificações, onde os discos foram distribuídos na superfície do agar e a quantidade de extrato era dispensada no centro de cada disco. O controle negativo usado no teste foi o solvente etanol 70% e o controle positivo o cloranfenicol na mesma concentração do disco comercialmente vendido.

O ensaio biológico pelo método de difusão envolvendo as duas técnicas (poço e disco) foi submetido à análise de variância (ANOVA), e posteriormente, ao teste de Tukey para comparação das médias do tamanho dos halos de inibição [18].

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo revelaram atividade antibacteriana frente a *S. aureus* (ATCC 12600), tanto na técnica do poço como na técnica de difusão em disco como apresentado na figura 1.

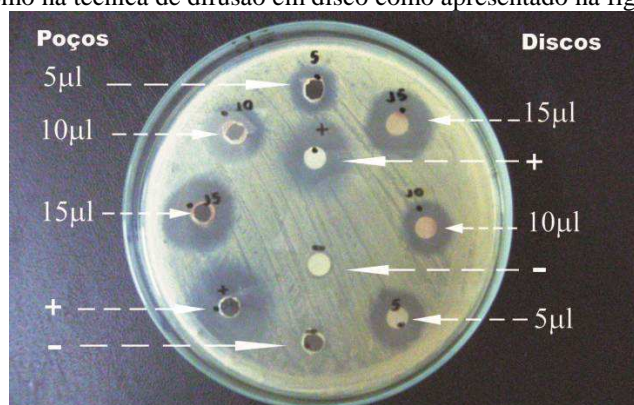


Figura 1 – Inibição produzida pelo extrato de própolis vermelha frente a *S. aureus*.

Trabalho realizado por Vital *et al* [16], avaliaram que tanto a técnica de difusão em disco como a de difusão em poços usando cilindros inoxidáveis são confiáveis para avaliação antimicrobiana de

diferentes fármacos e que a técnica de difusão em disco pode substituir a de poços nas análises microbiológicas. Como apresentado na tabela 1, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a técnica de difusão em disco e em poços nas diferentes quantidades de extrato de própolis usado frente a *S. aureus*.

Tabela 1. Comparação das médias dos diâmetros (mm) dos halos de inibição, usando 5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$  e 15  $\mu\text{L}$  do EHP no poço e no disco de papel frente a *S. aureus*.

Técnica de Difusão	Quantidade de EHP ( $\mu\text{L}$ )	Média $\pm$ DP
Poços	5	11,11 <sup>d</sup>
	10	14,00 <sup>bc</sup>
	15	15,66 <sup>a</sup>
Disco	5	11,22 <sup>d</sup>
	10	13,11 <sup>c</sup>
	15	14,77 <sup>ab</sup>

Letras iguais na mesma coluna representam valores estatisticamente iguais para o teste de Tukey ( $p < 0,01$ ).

O volume de 15  $\mu\text{L}$  demonstrou ser o mais eficiente por determinar um maior halo de inibição (tabela 1) frente a este microrganismo, caracterizando dose-dependência. Em um teste prévio usando quantidade superior a 15  $\mu\text{L}$  do extrato de própolis vermelha, foi verificado que o extrato excedia o limite do poço e transbordava para o meio. Ao adicionar extrato no disco de papel, é percebido que o mesmo não suporta o volume e aos poucos é espalhado para a superfície podendo gerar um halo de inibição falso-positivo.

Em um estudo comparativo utilizando duas técnicas da Farmacopéia brasileira de avaliação da atividade antimicrobiana [16], discos de papel filtro estéreis foram embebidos nas soluções antimicrobianas e esta técnica demonstrou ser eficiente frente à *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341) e *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601). Resultado semelhante foi observado em outro estudo que tratou da preparação de extratos [19], onde discos de papel foram embebidos por 15 minutos em extratos de própolis verde e em seguida secos em dessecador com sílica. Entretanto, com o uso desta técnica, os autores não podem afirmar quanto de solução cada disco possui o que torna inviável a reprodutibilidade dos resultados. Por outro lado, na técnica de difusão em poços, é possível afirmar exatamente quanto de extrato cada poço possui e os resultados por ele apresentados podem ser, portanto, considerados confiáveis e de fácil reprodutibilidade.

A utilização de telas de nylon sobre placas de Petri estéreis é outra forma de testar atividade antimicrobiana por meio da técnica de difusão em disco. Nesse caso os discos são depositados sobre a tela e o extrato adicionado no centro, mantendo-se na capela de fluxo até secar completamente [20]. No entanto, em testes piloto, foi percebido que a massa do extrato fica retida na rede de nylon, havendo uma perda do volume inicialmente dispensado no disco, o que também pode superestimar a concentração utilizada no experimento.

Diante do exposto, é importante ressaltar que a técnica de disco-difusão é uma técnica preconizada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards*– NCCLS e está normatizada como parâmetro de análise antimicrobiana na Farmacopéia Brasileira. Entretanto, considerando a avaliação realizada neste estudo, pode-se sugerir que dentre as duas técnicas utilizadas a de difusão em poços pode ser considerada de maior potencial de reprodutibilidade de resultados.

#### 4. CONCLUSÃO

O extrato hidroalcoólico de própolis vermelha possui atividade antibacteriana frente a *S. aureus*. Dentre os três volumes de extrato utilizados, 15  $\mu\text{L}$  foi o que apresentou o maior grau de inibição do microrganismo, caracterizando dose-dependência. Quanto às duas técnicas avaliadas, não houve diferença significativa de resultados, mas em termos operacionais a técnica de difusão em poço apresenta maior garantia da concentração de extrato utilizada, por possibilitar que a quantidade de amostra que interage com o microrganismo durante o teste de sensibilidade seja igual ao volume pipetado em cada poço inicialmente nas condições metodológicas testadas. O mesmo não ocorre com a técnica de difusão em disco, uma vez que é impossível garantir a quantidade exata que cada disco de papel consegue absorver quando embebido no extrato, possibilitando ainda o extravasamento de amostra em função da saturação da capacidade de absorção do disco, dificultando a obtenção de resultados mais precisos quando comparado com a técnica de poços.

1. FUNARI, C.S.; FERRO, O. Análise de própolis. *Ciência Tecnologia de Alimento* 26(1), p171-178, 2006.
2. BANKOVA, S, CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31, p.3-15. 2000.
3. GHISALBERTI, E.L. Propolis; A review. *Bee World*, v.60, p.59-84, 1979.
4. KUJUMGIEV A, TSVETKOVA I, SERKEDJIEVA Y, BANKOVA V, CHRISTOV R, POPOV S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal Ethnopharmacology*. 64(3), p.235-240, 1999.
5. BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological and research of propolis. *Phytotherapy Research*, 15, p. 561-571, 2001.
6. KIM, D.-M., LEE, G.-D., AUM, S.-H., & KIM, H.-J. (2008). Preparation of propolis nanofood and application to human cancer. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31, 1704–1710.
7. Kalogeropoulos, N., Konteles, S.J., Troullidou, E., Mourtzinou, I., Karathanos, V.T. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry* 116 (2009) 452–461.
8. BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36, p. 347-363, 1998.
9. PEREIRA, A. D. S., SEIXAS, F. R. M. S. E NETO, F. R. D. A. Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*, 25, p. 321-326, 2002.
10. PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. Classificação da própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. *Mensagem Doce*, 58, p.3-7, 2000.
11. DAUGSCH, A; MORAES, C.S.; FORT, P.; PARK, Y.K. Brazilian Red Propolis – Chemical Composition and Botanical Origin. *eCAM*, 5(4), p.435-441, 2007.
12. BARRETO, A.L.S. *Estudo histomorfológico do efeito de membranas de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos*. Dissertação de mestrado, UNIT, Aracaju, SE, Brasil, 2008.
13. MAIA-ARAUJO, Y.L.F. 2009. *Estudo da atividade antimicrobiana de variedades de própolis da região da foz do Rio São Francisco – Brasil*. Dissertação de mestrado, UNIT, Aracaju, SE, Brasil, 2009.
14. BITTENCOURT, F.O. *Desenvolvimento e avaliação da atividade antimicrobiana contra Candida albicans de formulações semi-sólidas contendo própolis vermelha*. Dissertação de mestrado, Universidade Tiradentes - UNIT, Aracaju, SE, Brasil, 2008.
15. NCCLS - *National Committee for Clinical Laboratory*. Standards Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard—Eighth. NCCLS document M2-A8, Pennsylvania, USA: Edition Wayne, 2003.
16. VITAL, T.M., REIS, C., GARCÍA-ZAPATA, M.T.A., CUNHA, L.C. Estudo comparativo de duas técnicas farmacopéicas de avaliação da atividade antimicrobiana dos fármacos: nistatina, eritromicina, neomicina e gentamicina. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 40, n. 2, abr./jun., 2004.
17. ORLANDO, S.C. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto da casca do *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Barbatimão). 89f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Promoção da Saúde), Universidade de Franca, Franca, SP, Brasil, 2005.
18. ZAR, J.H. *Biostatistical Analysis*. New Jersey, USA: Prentice Hall, 1999.
19. PARK, Y.K.; IKEGARI, M.; ABREU, J.A.S.; ALCICI, N.M.F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 18(3), p.313-318, 1998.
20. S. JUNIOR, L.F. MARTINS, D.T.O. Avaliação da técnica de impregnação de discos na triagem de plantas medicinais com atividade antifúngica pelo método de difusão em agar. *Anais do IV Congresso Brasileiro de Micologia*. 2004.