

Biossorção de compostos bioativos de extrato de *Centella asiatica* e *Olea europaea L.* em celulose bacteriana

Biosorption of bioactive compounds from *Centella asiatica* and *Olea europaea L.* extract in bacterial cellulose

RESUMO

Mellany Sarah Cabral Ozaki
mellanyozaki.sc@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Charles Windson Isidoro Haminiuk
haminiuk@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Giselle Maria Maciel
gisellemariam@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Isabela de Andrade Arruda Fernandes
isabela_aaferrandes@gmail.com
Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

A celulose bacteriana (CB) é um polímero produzido por diversas bactérias e que tem atraído a atenção da indústria por suas diversas características como pureza, biocompatibilidade e grande capacidade de retenção de água. Contudo, a CB não possui propriedades bioativas e antioxidantes. Deste modo, esta pesquisa aborda o estudo da biossorção de compostos fenólicos na membrana de CB, produzida pela *Gluconacetobacter xylinus*, a partir de dois extratos vegetais, sendo eles, da folha de oliveira (*Olea europaea L.*) e da *Centella asiatica*. Além disso, caracterizou-se os extratos em relação a concentração de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante. Os extratos da folha de oliveira e *Centella asiatica* apresentaram concentrações de fenólicos totais (278,00 e 217,50 mg equivalentes de ácido gálico por litro), flavonoides totais (226,88 e 46,81 mg equivalentes de catequina por litro) e atividade antioxidante pelo método FRAP (38,89 e 26,78 mmol equivalentes de trolox por grama), DPPH (169,29 e 118,13 (mmol.g⁻¹)) e ABTS (40,59 e 1250,00 (mmol.g⁻¹)), respectivamente. O teste de cinética de biossorção foi feito com o extrato de folha de oliveira onde observou-se tendência da CB em adsorver e dessorver os compostos fenólicos, o que aponta a necessidade de um mecanismo que controle a biossorção de forma efetiva.

PALAVRAS-CHAVE: Fenólicos. Atividade antioxidante. Biopolímeros.

ABSTRACT

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



Bacterial cellulose (BC) is a polymer produced by several bacteria and has attracted the attention of the industry for its diverse characteristics such as purity, biocompatibility and great water retention capacity. However, BC does not have bioactive and antioxidant properties. Thus, this research addresses the study of the biosorption of phenolic compounds in the BC membrane, produced by *Gluconacetobacter xylinus*, from two plant extracts, namely, the olive leaf (*Olea europaea L.*) and *Centella asiatica*. In addition, the extracts were characterized in relation to the concentration of phenolics, total flavonoids and antioxidant activity. The extracts of olive leaf and *Centella asiatica* showed concentrations of total phenolics (278.00 and 217.50 mg equivalent of gallic acid per liter), total flavonoids (226.88 and 46.81 mg equivalent of catechin per liter) and activity antioxidant by the FRAP method (38.89 and 26.78 mmol equivalent of Trolox per gram), DPPH (169.29 and 118.14 (mmol.g⁻¹)) and ABTS (40.59 and 1250.00 (mmol.g⁻¹)). The biosorption kinetics test was performed with the olive leaf extract where the tendency of

BC to adsorb and desorb the phenolic compounds was observed, which points to the need for a mechanism to control the biosorption effectively.

KEYWORDS: Phenolics. Antioxidant activity. Biopolymers.

INTRODUÇÃO

A celulose bacteriana é um biopolímero produzido por bactérias dos gêneros *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Aerobacter*, *Azobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Gluconacetobacter*, sendo esta última a mais estudada e a que mais produz CB (EL-SAIED et al., 2007). Ela tem sido muito pesquisada para a aplicação na indústria, sendo que alguns de seus usos é na indústria médica como curativo para feridas e na indústria alimentícia como um aditivo (LIN et al., 2020; AHMED; GULTEKINOGLU; EDIRISINGHE, 2020), suas características que chamam atenção são a fácil obtenção e a grande capacidade de absorção de água e com isso tem-se a possibilidade da adsorção de compostos bioativos pela celulose bacteriana.

Compostos bioativos são conhecidos por apresentarem compostos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos, cumarinas, entre outros) e atividade antioxidante que promovem diversos benefícios a saúde humana na prevenção de doenças neurais, doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, inflamação, entre outras doenças (RASHMI H.B et al., 2020). Esses compostos podem ser encontrados em vários alimentos como frutas, grãos e vegetais. Os compostos bioativos existentes em extratos de folha de Oliveira (*Olea europaea* L.) e a *Centella asiatica* têm despertado interesse da comunidade científica, uma vez que são ricos em compostos fenólicos, atividade antioxidante e por promoverem benefícios à saúde (ZAINOL, M. K. et al., 2002; PEREIRA et al., 2007).

O cultivo de Oliveira é um dos mais antigos e difundidos do Mediterrâneo, com um grande impacto socioeconômico a nível mundial pelo consumo de seus frutos *in natura* e/ou da extração do seu azeite (DIAS et al., 2018). Estudos demonstram que as folhas de oliveira possuem atividades antioxidante e antimicrobiana e tem sido usada como remédio caseiro para tratamento de febres e outras doenças (SILVA et al., 2006).

A *Centella asiatica* é uma das plantas mais importantes do pantanal e de seus rios, possuindo diversas propriedades medicinais, incluindo melhoria da cognição (aprendizagem e melhoria da memória), efeitos neuroprotetivos e capacidade de cicatrização de feridas atribuídas a sua propriedade antioxidante (DOULAH; MAHMOODI E BORUJENI, 2020).

Neste contexto, o potencial bioativo de compostos fenólicos da folha de oliveira e da *Centella asiatica* pela membrana de celulose bacteriana evidencia uma oportunidade inovadora de estudo das propriedades antioxidantes da CB com característica bioativa.

MATERIAIS E METODOS

A *Gluconacetobacter xylinus*, foi cultivada em poços de cultivo junto com o meio que consistiu em sacarose, chá branco e complexo vitamínico. Após os 7 dias de incubação, as membranas de CB foram purificadas por um tratamento de NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ à $80 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 horas e então lavadas com água destilada para posterior liofilização.

Para os testes de fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante os extratos de *Centella asiatica* e folha de oliveira foram preparados. Dois gramas de cada extrato foram colocados em Erlenmeyers com 100 ml de água ultrapura a

90 °C e então submetido a agitação (shaker a 150 rpm) por 15 minutos. Após o tempo de infusão, os extratos foram filtrados com papel filtro qualitativo.

O teste de determinação de compostos fenólicos totais (CFT) foi adaptado do método de Singleton e Rossi (1965) e Ribeiro et al. (2019) onde foi usado o reagente Folin-Ciocalteu e ácido gálico como padrão de referência. No teste, 1000 µL do extrato foram misturados com 5150 µL de água ultrapura e reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, St. Luis, USA), sendo que após essa etapa, submeteu-se a repouso na ausência de luz por 3 minutos a 25 °C. Em seguida adicionou-se 1400 µL de carbonato de sódio a 20% e colocou-se em repouso na ausência de luz novamente, deste vez por 2 horas. A leitura foi feita em um espectrofotômetro a 765 nm. Para construir a curva de calibração ($y = 0,001x - 0,022$, $R^2 = 0,9985$) foi utilizado ácido gálico em diferentes concentrações.

A determinação de flavonoides totais (FT) foi realizado através da metodologia de Chang et al. (2002), onde 250 µL de extrato foram misturados com 1525 µL de água ultrapura e 75 µL de NaNO₂ a 5%. A mistura foi repousada por 6 minutos e então adicionou-se 150 µL de AlCl₃.10H₂O 10%, esperou-se mais 5 minutos e adicionou-se 500 µL de NaOH 1 mol.L⁻¹. A leitura foi realizada com um espectrofotômetro a 510 nm. Os resultados estão expressos como miligramas equivalentes de catequina (EC) por litro de amostra, com base na curva de calibração da catequina ($y = 0,0023x + 0,0160$, $R^2 = 0,9882$).

Foram realizados três métodos para determinação da capacidade antioxidante. O primeiro método foi o potencial antioxidante redutor de ferro (FRAP), realizado de acordo com a metodologia descrita por Thaipong et al. (2006). O reagente FRAP foi preparado com uma solução tampão de acetato de sódio (300 mmol.L⁻¹ a pH 3,6), solução TPTZ (10 mmol.L⁻¹, previamente diluída em ácido clorídrico a 40 mmol.L⁻¹) e uma solução de cloreto férrico (20 mmol.L⁻¹). Os três reagentes foram misturados na proporção de 10/1/1 (v/v/v). Em tubos de ensaio foram adicionados 150 µL de extrato e 2850 µL do reagente FRAP. Agitou-se e incubou-se os tubos na ausência de luz por 30 minutos. Passado o tempo de incubação, a leitura foi feita em um espectrofotômetro a 593 nm. O potencial antioxidante redutor foi expresso em unidades de mol de Trolox equivalente por litro de extrato, calculado a partir de uma curva padrão com a concentração variando de 0 a 500 µmol.L⁻¹ de Trolox ($y = 0,0023x + 0,0472$, $R^2 = 0,9956$).

O método de atividade sequestrante de radicais livres (DPPH) foi realizado, utilizando um método abordado por Brand-Williams et al. (1995), com modificações. Misturou-se 1180 µL de etanol, 1070 µL de solução de DPPH e 250 µL de extrato e colocou-se a mistura em repouso na ausência de luz por 30 minutos. Posterior ao tempo de repouso, determinou-se a absorbância com um espectrofotômetro a 517 nm. Utilizando como branco o etanol. A curva de padrão de Trolox foi construída com concentrações entre µmol.L⁻¹ ($y = -0,0017x + 0,9637$, $R^2 = 0,9801$).

O método da atividade sequestrante de radicais livres por ABTS seguiu a metodologia de Re et al. (1999) com modificações. Adicionou-se 4 ml de radical ABTS em 40 µL de extrato e repousou-se a mistura por 6 minutos a temperatura ambiente. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro a 734 nm. A capacidade antioxidante dos extratos foi representada em µmol de Trolox equivalente por litro de extrato, calculada a partir de uma curva padrão onde a concentração variou de 0 a 2000 µmol.L⁻¹ de Trolox ($y = -0,0002x + 0,6729$, $R^2 = 0,9776$).

A biossorção de compostos fenólicos foi realizada com o extrato de folha de oliveira e com o extrato da *Centella asiatica*. Em Erlenmeyer foram adicionados membranas de celulose bacteriana liofilizadas e 15 ml de cada extrato. Os Erlenmeyer foram colocados em agitação (shaker a 150 rpm) e foram sendo retiradas alíquotas de cada Erlenmeyer para a análise de concentração de fenólicos totais, em intervalos de tempo de 10, 20, 30, 60, 120 e 240 minutos. Cada teste foi feito em duplicata, assim como também foi feito um branco contendo apenas o extrato de folha de oliveira para cada intervalo de tempo.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os compostos bioativos são divididos em terpenos e terpenóides, alcaloides e compostos fenólicos e podem ser comumente encontrados em frutas, vegetais, cereais, oleaginosas, óleos, chás e vinhos (CROTEAU; KUTCHAN E LEWIS, 2000; KRIS-ETHERTON et al., 2002; REN et al., 2013). Dentre as classes de fenólicos, os flavonoides possuem um alto potencial antioxidante. Os resultados dos testes entre a *Centella asiatica* e a folha de oliveira mostraram que a folha de oliveira apresentou uma maior concentração de fenólicos e flavonoides.

A literatura apresenta uma concentração de fenólicos totais para o extrato de folha de oliveira entre 0,04 a 0,25 (g.L⁻¹) expressos em concentração de ácido tânico por litro (SILVA et al., 2006). Para a *Centella asiatica* a concentração de fenólicos totais é encontrada em 2,86 g.100 g⁻¹ em equivalentes de ácido tânico e flavonoides totais iguais a 0,361 g.100 g⁻¹ em equivalentes de rutina. (PITTELLA et al., 2009). Os resultados obtidos nesta pesquisa para fenólicos e flavonoides totais dos extratos de *Centella asiatica* e folha de oliveira podem ser vistos na Tabela 1, onde nota-se uma concentração maior de fenólicos e flavonoides na folha de oliveira.

Tabela 1 – Fenólicos totais (CFT), Flavonoides totais (FT) dos extratos

Extrato	CFT (mg EAG.L ⁻¹)	FT (mg CE.L ⁻¹)
<i>Centella Asiatica</i>	217,50 ± 2,85	46,81 ± 0,25
Folha de oliveira	278,00 ± 8,20	226,88 ± 0,95

Fonte: A autoria própria (2020).

Para a atividade antioxidante (Tabela 2), a folha de oliveira apresentou uma melhor concentração para o método FRAP (38,89 mmol.g⁻¹) e para o método DPPH (169,29 mmol.g⁻¹) em relação a *Centella asiatica*. Contudo, para o método ABTS a *Centella asiatica* apresentou uma maior concentração. É importante salientar que as variações de resultado entre os métodos se dão devido ao radical DPPH reagir com compostos fenólicos, enquanto que o radical ABTS reage não somente com os compostos fenólicos, mas também com outros compostos com atividade antioxidante, devido a sua alta reatividade. Logo, as absorbâncias dos antioxidantes determinados pelo DPPH e pelo ABTS são parcialmente diferentes (MARECEK et al., 2017). A análise estatística foi realizada pelo método de ANOVA e pelo método de Tukey e todos os valores tiveram diferença significativa.

Tabela 2 – Atividade antioxidante dos extratos (mmol.g⁻¹)

Extrato	FRAP	DPPH	ABTS
<i>Centella Asiatica</i>	26,78 ± 0,13	118,14 ± 4,51	1250,00 ± 19,7
Folha de oliveira	38,89 ± 0,21	169,29 ± 0,73	40,59 ± 1,5

Fonte: Autoria própria (2020).

O teste de cinética de bioadsorção dos compostos fenólicos da folha de oliveira em celulose bacteriana (Tabela 3) mostrou um padrão da celulose bacteriana em adsorver e dessorver os compostos bioativos dos extratos, onde aos 60 minutos a celulose bacteriana obteve uma concentração muito pequena de compostos fenólicos, voltando a adsorver o composto em 120 minutos e aos 240 minutos o dessorver novamente. Sendo assim, nota-se a necessidade de algum mecanismo que controle esse processo. O teste de cinética de bioadsorção dos compostos fenólicos da *Centella asiatica* não puderam ser realizados devido ao SARS-CoV-2.

Tabela 3 – Cinética de bioadsorção dos compostos fenólicos da Folha de Oliveira em celulose bacteriana.

Tempo (min)	Concentração de fenólicos (mg.g ⁻¹)	Absorção (%)
10	424,42 ± 20,99	15,67
20	247,88 ± 18,28	12,77
30	266,70 ± 16,09	13,81
60	-	-
120	206,71 ± 17,64	12,65
240	-	-

Fonte: Autoria própria (2020).

CONCLUSÃO

O uso de extratos vegetais ricos em compostos fenólicos e com potencial antioxidante para a bioadsorção em celulose bacteriana traz um maior valor agregado ao biomaterial, expandindo sua aplicação nas indústrias farmacêuticas, cosméticas, médicas e alimentícia. Portanto faz-se necessário o aprimoramento e controle do sistema de bioadsorção da membrana CB.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Iniciação Científica, a Universidade Tecnológica Federal do Paraná e Fundação Araucária pela infraestrutura e recursos financeiros.

REFERÊNCIAS

- AHMED, J.; GULTEKINOGLU, M.; EDIRISINGHE, M. Bacterial cellulose micro-nano fibres for wound healing applications. *Biotechnology Advances*, v. 41, p. 107549, 2020.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- CELESTE DIAS, M. et al. UV-B radiation modulates physiology and lipophilic metabolite profile in *Olea europaea*. *Journal of Plant Physiology*, v. 222, n. December 2017, p. 39–50, 2018.
- CHANG, C. et al. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 10, n. 3, p. 7802, 2002.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, p.1250-1318, 2000.
- DOULAH, A.; MAHMOODI, G.; POURMAHDI BORUJENI, M. Evaluation of the pre-treatment effect of *Centella asiatica* medicinal plants on long-term potentiation (LTP) in rat model of Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, v. 729, p. 135026, 2020.
- EL-SAIED, H.; BASTA, A. H.; GOBRAN, R. H. Polymer-Plastics Technology and Engineering Research Progress in Friendly Environmental Technology for the Production of Cellulose Products (Bacterial Cellulose and Its Application) Research Progress in Friendly Environmental. n. November 2014, p. 37–41, 2007.
- KRIS-ETHERTON, P. M. et al. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *American Journal of Medicine*, v. 113, n. 9 SUPPL. 2, p. 71–88, 2002.
- LIN, D. et al. International Journal of Biological Macromolecules Bacterial cellulose in food industry: Current research and future prospects. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 158, p. 1007–1019, 2020.

MARECEK, V.; MIKYSKA, A.; HAMPEL, D.; CEJKA, P.; NEUWIRTHOVA, J.; MALACHOVA, A., et al. ABTS and DPPH methods as a tool for studying antioxidant capacity of spring barley and malt. *Journal of Cereal Science*, v.73, p.40-45, 2017.

PITTELLA, F. et al. Antioxidant and cytotoxic activities of *Centella asiatica* (L) Urb. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 10, n. 9, p. 3713–3721, 2009.

RASHMI H.B., NEGI P.S. Health Benefits of Bioactive Compounds from Vegetables. In: Swamy M. (eds) **Plant-derived Bioactives**. Springer, Singapore, 2020.

RIBEIRO, V. R. et al. Improvement of phenolic compound bioaccessibility from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extracts after biosorption on *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Research International**, v. 126, n. April, p. 108623, 2019

RE, R., PELLEGRINE, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., & RICE-EVANS, C. Antioxidant Activity Applying an Improved Abts Radical Cation Decolorization Assay Roberta. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9/10), p. 1231–1237, 1999.

REN, Q.; XING, H.; BAO, Z.; SU, B.; YANG, Q.; YANG, Y.; ZHANG, Z. Recent Advances in Separation of Bioactive Natural Products. *Chinese Journal Of Chemical Engineering*, [s.l], v.21, n.9, p.937-952, 2013

SILVA, S. et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Olea europaea* L. Fruits and leaves. **Food Science and Technology International**, v. 12, n. 5, p. 385–396, 2006.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144 LP – 158, 1 jan. 1965.

THAIPONG, K. et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6–7, p. 669–675, 2006.

ZAINOL, M. K. et al. Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) Urban. **Food Chemistry**, v. 81, n. 4, p. 575–581, 2003.