



Produção e desenvolvimento de novos produtos baseados em biocelulose

Production and development of new biocellulose-based products

Juliana Heimbecher Arias*, Gustavo Henrique Couto†

RESUMO

O uso de plantas medicinais pela humanidade visando a cura de doenças, remonta a passagem de antigas civilizações. Essa prática tem se mantido atualmente na população pela tradição no uso de plantas ou devido às dificuldades de acesso aos serviços de saúde e a aquisição de medicamentos, associados à facilidade de obtenção e do uso das plantas. A *Alternanthera brasiliana* é uma planta medicinal com diversas ações como anti-inflamatória, analgésica, antiviral e antimicrobiana. A biocelulose ou nanocelulose bacteriana é um tipo de celulose produzido na forma de membrana hidrogel por algumas bactérias e que possui propriedades únicas, tais como, elevada pureza e cristalinidade, alta capacidade de retenção de água (>98%), resistência mecânica, estrutura tridimensional das fibrilas de celulose em escala nanométrica e biocompatibilidade. O presente trabalho tem como objetivo a análise das propriedades antibacterianas do extrato bruto da planta *Alternanthera brasiliana* associado à membrana de biocelulose produzida por *Komagataeibacter hansenii*. Para isso, inicialmente foram produzidas membranas de biocelulose por fermentação estática de *K. hansenii* seguido pela purificação destas, secagem e corte no formato de discos circulares de 6 mm. A atividade antimicrobiana foi feita seguindo o método in vitro de difusão em disco no qual discos de papel filtro estéril ou NCB medindo 6 mm de diâmetros foram impregnados com 5µL, 10µL ou 15µL do extrato bruto de *A. brasiliana*.

Palavras-chave: *Alternanthera brasiliana*, nanocelulose bacteriana, *S. aureus*, *E. coli*.

ABSTRACT

The use of medicinal plants by humanity for the cure of diseases dates back to the passage of ancient civilizations. This practice has currently been maintained in the population due to the tradition of using plants or due to difficulties in accessing health services and the acquisition of medicines, associated with the ease of obtaining and using plants. *Alternanthera brasiliana* is a medicinal plant with several actions such as anti-inflammatory, analgesic, antiviral and antimicrobial. Bacterial biocellulose or nanocellulose is a type of cellulose produced in the form of a hydrogel membrane by some bacteria and has unique properties such as high purity and crystallinity, high water retention capacity (>98%), mechanical strength, three-dimensional structure of cellulose fibrils at the nanometric scale and biocompatibility. The present work aims to analyze the antibacterial properties of the crude extract of the *Alternanthera brasiliana* plant associated with the biocellulose membrane produced by *Komagataeibacter hansenii*. For this, biocellulose membranes were initially produced by static fermentation of *K. hansenii* followed by their purification, drying and cutting in the shape of 6 mm circular discs. The antimicrobial activity was performed following the in vitro disk diffusion method in which sterile filter paper or NCB disks measuring 6 mm in diameter were impregnated with 5µL, 10µL or 15µL of the crude extract of *A. brasiliana*.

Keywords: *Alternanthera brasiliana*, bacterial nanocellulose, *S. aureus*, *E. coli*.

1 INTRODUÇÃO



O emprego de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído ao longo dos tempos, desde as formas mais simples de tratamento, até as formas tecnologicamente mais avançadas através da fabricação industrial, que é possível graças à existência de substâncias nas plantas, que administradas de forma correta têm propriedades para trazer reações benéficas no seu uso humano. O interesse nas plantas medicinais é muito pertinente, visto que estão amplamente encontradas em várias regiões do Brasil, rico em biodiversidade em todos os níveis, o que proporciona uma vasta gama de plantas a serem estudadas e analisadas quanto às suas propriedades e aplicações. A busca por formas alternativas e naturais de controle de microrganismos patogênicos e no tratamento de infecções e feridas é pertinente, pois, segundo informações do Ministério da Saúde, feridas são um problema, por conta do elevado número de indivíduos com alterações na integridade da pele. Isto dificulta a qualidade de vida das pessoas e traz um enorme gasto aos órgãos públicos (MORAIS et al, 2008).

As infecções cutâneas por bactérias são muito comuns e frequentes, principalmente quando se trata da bactéria *Staphylococcus aureus*. Esta pode ser encontrada naturalmente na superfície da pele humana, entretanto, em certas circunstâncias, pode causar infecções. A resistência de algumas delas à antibióticos já foi comprovada, o que dificulta o seu combate. Outra bactéria que também pode causar infecções é a *Escherichia coli*, mais comumente encontrada no intestino de humanos e animais de sangue quente, mas que podem causar infecções urinárias, produzir toxinas causando diarreias e infecções associadas (MARQUES et al, 2020). Devido ao grave problema de resistência aos agentes antimicrobianos hoje disponíveis, é indispensável não apenas pesquisas para o desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas, mas também a busca pelo desenvolvimento de novas abordagens para o tratamento de infecções bacterianas. Nesse sentido, a procura de propriedades antibacterianas de extratos de plantas tem sido incentivada e intensificada, uma vez que estes produtos naturais podem apresentar eficiência semelhante em relação aos remédios sintéticos.

A espécie *Alternanthera brasiliana*, é uma planta medicinal encontrada em vários estados no Brasil, sendo popularmente conhecida como “penicilina” ou “terramicina” e conhecida por apresentar efeitos benéficos para o tratamento de feridas, devido suas propriedades cicatrizantes, anti-inflamatórias, antitumorais e antimicrobianas. Estudos fitoquímicos mostraram a principalmente a presença de triterpenos esteroidais, betacianinas e compostos fenólicos (taninos e flavonóides) (PEREIRA et al., 2007). Estudos realizados com o extrato da *A. brasiliana* apresentaram potencial antimicrobiano contra várias estirpes *S. aureus* utilizando Teste de Difusão em Ágar, com um halo de inibição de 22 mm comparado ao antibiótico padrão (34 mm) (CAETANO et al., 2002).

Em outro estudo, o extrato bruto etanólico (70%) de folhas de *A. brasiliana* foi testado em diversos microrganismos pelo método de microdiluição em placas para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) (FEREIRA et al., 2007). Os resultados mostraram que o extrato bruto e algumas frações apresentaram atividades moderadas contra *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Prototheca zopffi*.

A celulose é o biopolímero mais abundante do mundo. Tem importância fundamental para a indústria, sendo encontrada em vários setores, como o têxtil e alimentício (GUIMARÃES et al., 2019). Além das plantas, nas quais a celulose é produzida como principal componente estrutural da parede celular, diversas espécies de microrganismos, principalmente bactérias, são capazes de produzir celulose, comumente denominada nanocelulose bacteriana (NCB), com características estruturais e mecânicas particulares. Os gêneros mais utilizados para a produção da NCB são: *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes* (COLLA et al., 2014). Atualmente, a NCB tem sido muito estudada devido as suas características únicas como biocompatibilidade, grau de pureza, elevado nível de polimerização e fibras com diâmetro nanométrico (~30–50 nm), elevada porosidade e área superficial (FISCHER et al, 2017); sendo, portanto, um suporte ou matriz



interessante para a adsorção e imobilização de biomoléculas. Por apresentar alta permeabilidade para gases e líquidos e alta resistência no estado úmido, a NCB tem sido aplicada com sucesso comercialmente no Brasil como pele artificial para o tratamento de queimaduras e curativos para feridas (Membracel[®], produzida e comercializada pela Vuelo Pharma no Paraná; e a Biocel[®], produzida e comercializada pela empresa Bionext Produtos Biotecnológicos no estado de São Paulo). Em um trabalho anterior, visando a aplicação da membrana de NCB como curativo, estudamos a adição de agentes plastificantes (glicerol e o polietilenoglicol) na membrana de NCB. A adição de glicerina 1% resultou um filme maleável mais aderente à superfície da pele visando potencializar sua ação cicatrizante. Visando otimizar a cicatrização e impedir a contaminação por microrganismos do ambiente, é possível a associação na NCB de extratos vegetais ou biomoléculas com propriedades cicatrizantes e antimicrobianas.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de extratos brutos etanólico de partes aéreas de *A. brasiliana*, contra as bactérias *S. aureus* e *E. coli*. Primeiramente, foram produzidas por fermentação estática membranas de NCB utilizando a bactéria *K. hansenii*, seguido por purificação e secagem e plastificação. Numa segunda etapa, a planta *A. brasiliana* foi colhida, seca, triturada e extraída com etanol. Com os extratos foram realizados testes antimicrobianos em disco (discos de membranas de NCB ou papel) com a bactéria *S. aureus* e *E. coli*, no qual os discos foram esterilizados e impregnados com os extratos.

2 MÉTODO (OU PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS DA PESQUISA)

Produção, purificação e secagem de nanocelulose bacteriana

Para a produção de NCB, *K. hansenii* foi cultivado sob condições estáticas durante 10 dias a 28°C utilizando o meio de cultura HS (g/L) formado por glucose 20g; peptona bacteriológica: 5g; extrato de levedura: 5g; ácido cítrico: 1,15g; e K₂HPO₄: 2,7g. Para a purificação da membrana os discos produzidos foram tratados com uma solução 0,1 M de NaOH a 80°C durante 60 minutos. Para a remoção do alcali as membranas passaram por sucessivas lavagens com água destilada até que o pH da solução ficasse neutro.

Preparo dos Extratos das Plantas e Incorporação em Nanocelulose Bacteriana

A obtenção do extrato hidroetanólico de *A. brasiliana* foi de acordo com PEREIRA et al., 2007. Para isso 32,16 g de folhas secas foram maceradas e o extrato bruto foi extraído com 800 mL de etanol 70% por sete dias com agitação diária no escuro. Após a filtração (Figura 1), o extrato foi evaporado sob pressão reduzida para remover o etanol e obter uma suspensão aquosa. A suspensão aquosa (120 mg/mL), que compõe o extrato bruto, foi utilizada nos testes de difusão em ágar com as bactérias teste.

Figura 1 – Filtração do extrato bruto

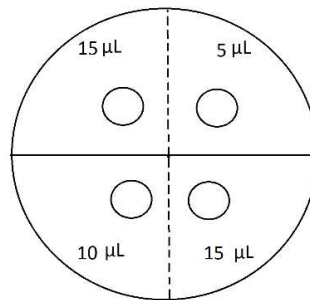


Fonte: autoria própria (2021)

Avaliação da atividade antimicrobiana

Para avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizadas as bactérias padrões *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. A atividade antimicrobiana foi feita seguindo o método in vitro de difusão em disco de papel de BAUER; KIRBY, 1966. Discos de papel filtro estéril ou NCB medindo seis mm de diâmetros foram impregnados com 5 μ L, 10 μ L ou 15 μ L do extrato bruto de *A. brasiliensis*. Os discos foram colocados sobre a superfície do meio Agar Muller-Hinton já semeado com as suspensões dos microrganismos, esta suspensão foi padronizada pela escala de McFarland 0,5 a concentração aproximada da suspensão bacteriana é de 10⁸ UFC/ml (Figura 2). As placas foram incubadas a 37 °C, pelo período de 24 horas, em seguida foi realizada a leitura dos resultados, medindo o diâmetro do halo de inibição formado em volta do disco.

Figura 2 – configuração experimento na placa de Petri



Fonte: autoria própria (2021)

3 RESULTADOS

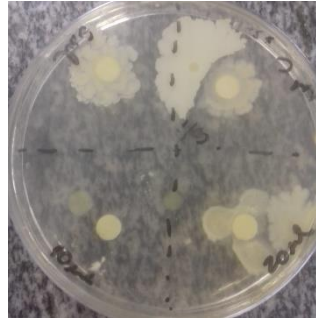
Como só foi possível realizar um experimento para cada uma das bactérias devido a complicações causadas pela pandemia, os resultados obtidos na pesquisa foram inconclusivos. Torna-se necessário, portanto, a realização de maiores testes.

Nos dois testes feitos, o foi possível visualizar a inibição do crescimento bacteriano no entorno dos discos. Entretanto, a correta avaliação qualitativa entre a maior eficácia entre as concentrações não foi possível



visualmente. No teste realizado com *E. coli*, houve contaminação na placa. As figuras 3 e 4 são referentes às experiências. Na imagem 3, o valor de 20 µL corresponde, na realidade, a 15 µL.

Figura 3 – Teste *E. coli*



Fonte: autoria própria (2021)

Figura 3 – Teste *S. aureus*



Fonte: autoria própria (2021)

4 CONCLUSÃO

A planta *A. brasiliana* junto à membrana de NCB manteve suas propriedades antibacterianas, ao menos sob bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Como os testes foram feitos apenas uma vez, torna-se necessário repeti-los para maiores conclusões.

A partir do que foi feito, para pesquisar futuras, seria interessante analisar possíveis mudanças nas propriedades cicatrizantes das membranas de NCB quando associadas à *A. brasiliana*. A fim realizar um estudo comparativo, a liofilização do extrato pode ser feita.

Por conta da pandemia de SARS-CoV-2, maiores testes foram impossibilitados.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho foi desenvolvido com o apoio de bolsa concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq - Brasil.



REFERÊNCIAS

ATAIDE, Janaína; CARVALHO, Nathália Mendes de. **Nature Conferences: Bacterial Nanocellulose Loaded with Bromelain: Assessment of Antimicrobial, Antioxidant and Physical-Chemical Properties.**2017.

BADIN, Ana Zulmira D. ;CALOMENO, Luíz Henrique A. **Arquivos Catarinenses de Medicina: membrana porosa de celulose no tratamento de queimaduras.** Curitiba, 2007.

BAUER, A.W., W.M.M. KIRBY, J.C. SHERRIS, M. TURCK. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.** 45:493-496.

CAETANO, N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R.; CARVALHO, D.; PIMENTEL, M. C. B.; MAIA, M. B. S. Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como anti-inflamatório. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 132-135, 2002.

COELHO, Guilherme Andrade; MAGALHÃES, Maria Angélica Baron. **Os Curativos de Nanocelulose de Pinus e Nanocelulose Bacteriana são Semelhantes no Tratamento da Quiemadura de Segundo Grau? Estudo Experimental em Ratos.** Curitiba, 2020

FISCHER, Michele Roberta; GARCIA, Michele Cristina Formolo. **Revista Matéria: biossíntese e caracterização de nanocelulose bacteriana para engenharia de tecidos.** Santa Catarina, 2017.

MARQUES, Sílvio Alencar; ABBADE, Luciana P. F. **Anais Brasileiros de Dermatologia: infecções cutâneas bacterianas graves.** São Paulo, 2020.

MORAIS, Gleicyanne F. da C; OLIVEIRA, Simone H. dos S. **Avaliação de feridas pelos enfermeiros de instituições hospitalares da rede pública.** João Pessoa, 2008.

PEREIRA, Danielle Fontana. Morfoanatomia e Histoquímica Comparativa entre *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Alternanthera dentata* (Moench) Stuchlik; Estudo Fitoquímico e Biológico de *Alternanthera brasiliana*. 2007. 111p. Dissertação (Mestrado) – Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

ROCHA, Patrícia; MARCHETE, Rogério. **Revista Saúde em Foco: principais atividades da planta *Alternanthera brasiliana*.** 10. ed. São Paulo, 2018.

SILVA, Luciane; PEGORARO, Kamm A. **Latin America Journal of Pharmacy: Antimicrobial Activity of *Alternanthera brasiliana* Kuntze (Amaranthaceae): a Biomonitored Study.** Ponta Grossa, 2011.