



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UnICEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

AMANDA SAGRILO TONDOLO

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIBIÓTICA DE EXTRATOS DE
PLANTAS MEDICINAIS

BRASÍLIA

2019



AMANDA SAGRILO TONDOLO

CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIBIÓTICA DE EXTRATOS DE
PLANTAS MEDICINAIS

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica
apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e
Pesquisa.

Orientação: Carlos Alberto da Cruz Junior
Co-orientação: Francislete Rodrigues Melo

BRASÍLIA

2019

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde e perseverança para concluir este projeto.

Ao UniCEUB, pela oportunidade de aprimoramento pessoal e profissional.

Aos meus pais, sem os quais nada seria possível.

Às pessoas do grupo de pesquisa, em especial à professora Francislete Melo e ao professor Carlos Júnior pelo suporte, incentivo e apoio incondicional em cada etapa desta pesquisa.

RESUMO

A *Centella asiatica* é uma planta medicinal utilizada desde a época pré-histórica. É utilizada pela medicina tradicional para o tratamento de diversas patologias, como diarreia, indigestão, doenças neurodegenerativas e cicatrização de ferimentos. Além disso, estudos mostram que ela também possui ação antimicrobiana. A *C. asiatica* produz metabólitos secundários envolvidos em sua atividade antioxidante, a qual parece ser responsável por seus efeitos terapêuticos. Nesse contexto, o presente estudo objetivou caracterizar a atividade antioxidante e antibiótica de extratos de folhas, de caules e de raízes da planta *C. asiatica* cultivada em solo e em aquaponia. A atividade antioxidante foi determinada por meio do método de captura do radical ABTS e mostrou que o extrato de folhas da *Centella* produzida em aquaponia apresentou o maior nível de atividade antioxidante, enquanto os extratos de raízes das plantas produzidas em aquaponia obteve o menor nível dentre todos os extratos analisados. Já o teor de compostos fenólicos foi determinado por meio do método Folin-Ciocalteu e evidenciou que o extrato de folhas das amostras cultivadas em aquaponia apresentaram a maior concentração de compostos fenólicos, sendo que o extratos de raízes das plantas produzidas em aquaponia apresentou a menor concentração. Evidenciou-se, assim, uma associação entre o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante. A análise da atividade antibiótica por meio do método disco-difusão não pode ser realizada em virtude da resistência bacteriana detectada, por meio dos testes preliminares, nas amostras das cepas de bactérias disponíveis no laboratório.

Palavras-Chave: *Centella*. Antioxidante. Fenólicos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1. COLETA E PREPARO DOS EXTRATOS	11
3.2. DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	12
3.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	13
3.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1. DOSAGEM DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	15
4.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	18
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
6. REFERÊNCIAS	23
7. APÊNDICE	26
7.1. APÊNDICE A – FOTOS DAS AMOSTRAS DE SOLO	26
7.2. APÊNDICE B – FOTOS DAS AMOSTRAS DE AQUAPONIA	28
7.3. APÊNDICE C – FOTOS DA PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE AQUAPONIA	28

1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho está inserido nos estudos relacionados à atividade antioxidante e antimicrobiana de plantas medicinais. O estresse oxidativo é caracterizado como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade do organismo de neutralizar seus efeitos deletérios por meio da ação de antioxidantes (KUMARI et al, 2016). Radicais livres são compostos químicos que contêm um ou mais elétrons não pareados (LI; JIA; TRUSH, 2016) e são altamente tóxicos para todos os tipos de moléculas incluindo DNA, lipídeos, proteínas e carboidratos; sendo a principal causa de muitas doenças degenerativas, como aterosclerose, câncer, doenças cardiovasculares, doença inflamatória intestinal, demência e artrite (CHOUDHARY; TANDON, 2009). Já os antioxidantes são compostos que inibem a oxidação, a qual consiste em uma reação química que pode produzir radicais livres (SALEHI et al, 2018), e agem por 3 mecanismos principais: neutralizando diretamente os radicais já formados; inibindo a formação de novos radicais; e removendo ou reparando os danos causados pelos radicais (LI; JIA; TRUSH, 2016). Logo, os antioxidantes protegem os seres humanos contra doenças induzidas pelo estresse oxidativo (HISAM et al, 2018).

As plantas são uma importante fonte de antioxidantes naturais (YADANG et al, 2019). Produzem metabólitos secundários como polifenóis, alcalóides, terpenóides, óleos essenciais, entre outros (OTHMAN; SLEIMAN; ABDEL-MASSIH, 2019); os quais são produtos naturais que regulam as interações entre as plantas e seu ambiente (JAMES; DUBERY, 2009). Seus polifenóis têm se destacado por possuírem potente atividade antioxidante e efeitos na prevenção de diversas doenças (DAI; MUMPER, 2010), além de serem um dos mais abundantes e diversificados grupos de metabólitos secundários, sendo que as suas propriedades antioxidantes fundamentam os efeitos antimicrobianos (OTHMAN; SLEIMAN; ABDEL-MASSIH, 2019). Nesse sentido, a medicina tradicional está cada vez mais receptiva ao uso de medicamentos fitoterápicos, à medida em que os antibióticos tradicionais se tornam ineficazes e novas doenças, principalmente virais, não respondem a esse tipo de medicação (COWAN, 1999). Ademais, a resistência microbiana tem aumentado provocando incertezas acerca da futura utilização de medicamentos antimicrobianos (HOSSAIN, 2018). Dessa forma, a utilização de extratos de plantas com propriedades antimicrobianas pode ser de grande importância terapêutica (NASCIMENTO et al, 2000).

Por fim, plantas medicinais costumam ter menor custo, serem localmente disponíveis e de fácil consumo, sendo que as práticas medicinais tradicionais atualmente representam uma importante parte da medicina complementar (SURVESWARAN et al, 2007). Sendo assim, a identificação e o desenvolvimento de compostos ou extratos fenólicos de diversas plantas tem se tornado uma grande área de pesquisa médica e em saúde (DAI; MUMPER, 2010) e há vários estudos acerca da atividade antioxidante de diversas plantas com propriedades medicinais (SURVESWARAN et al, 2007). Nesse contexto, o objetivo desta pesquisa foi caracterizar a atividade antioxidante e antibiótica de extratos da planta *Centella asiatica* cultivada em solo e em aquaponia.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A *Centella asiatica* é uma trepadeira perene pertencente à família *Umbellifere (Apiceae)* encontrada na maioria dos países tropicais e subtropicais, incluindo partes da Índia, Paquistão, Sri Lanka, Madagascar, África do Sul e Leste Europeu (GOHIL; PATEL; GAJJAR, 2010). Os caules dessas plantas são verdes a verde-avermelhados e seus nódulos originam longos pecíolos (5-15 cm) que sustentam as folhas, as quais são verdes, finas e macias, possuindo superfície lisa, ápices arredondados e podendo medir de 1 a 5 cm de largura (BANDARA; LEE; THOMAS, 2011). Floresce entre Agosto e Setembro, com flores de coloração violeta claro, e cresce em lugares úmidos em altitudes entre 0 e 2500 metros acima do nível do mar (BRINKHAUS et al, 2000).

É uma planta utilizada para fins medicinais desde a época pré-histórica (BANDARA; LEE; THOMAS, 2011). Em Assam, na Índia, ela é conhecida como 'Manimuni' e é amplamente empregada como agente antimicrobiano durante infecções gastrintestinais (BHAGAWATI et al, 2018), além de fazer parte da dieta Ayurvedica para tratamento de disenteria, diarreia, dor abdominal e indigestão (BRINKHAUS et al, 2000). Bhagawati et al (2018) demonstrou em seu estudo que o extrato da *Centella* é provavelmente eficaz contra *Shigella dysenteriae* (bactéria patogênica), mas sem agir sobre *Bacillus coagulans* (bactéria residente), e que pode ser utilizada como uma alternativa aos antibióticos ou associada a eles nos casos de disenteria por *S. dysenteriae*. Já Harnvoravongchai et al (2018) evidenciou que o ácido asiaticosídeo presente nos extratos de *Centella* possui importante atividade antimicrobiana contra a

bactéria *Clostridium difficile* por prejudicar a permeabilidade da membrana celular. Além disso, o extrato de *Centella* também apresenta atividade antifúngica, como demonstrado no ensaio de Senthilkumar (2018), no qual os extratos, mesmo em baixas concentrações, tiveram atividade antifúngica próxima à dos antifúngicos comerciais.

No geral, extratos de *Centella* contendo o glicosídeo madecassosídeo possuem atividade anti-inflamatória, enquanto aqueles contendo asiaticosídeo parecem estimular a cicatrização de ferimentos (BANDARA; LEE; THOMAS, 2011). É importante ressaltar que o asiaticosídeo (composto polifenólico) é um dos principais glicosídeos terpenoides da *Centella asiatica* (HOSSAIN et al, 2015). Os compostos fenólicos possuem um anel aromático ligado a uma ou mais hidroxilas, fato que determina sua atividade redutora, permitindo que doem elétrons ou atuem no sequestro de radicais livres (ação antioxidante) (PIRES et al, 2017). Azis et al (2017) mostrou que a fração metanólica do extrato de *Centella* possui propriedades de cicatrização e o extrato de asiaticosídeo 2,4% promove a migração de células com morfologia de fibroblastos e de queratinócitos, além de otimizar o processo de remodelamento e de proliferação envolvidos na cicatrização. Já Yao et al (2017) demonstrou em seu ensaio que membranas eletrofiadas contendo extrato de *Centella asiatica* auxiliaram na cicatrização de feridas em ratos, sendo que os machucados contendo essas membranas apresentaram uma maior deposição de colágeno, um número superior de capilares, além de células basais com formato mais compacto e regular quando comparados àqueles nas quais outros tratamentos foram instituídos. Nesse contexto, os antioxidantes podem ter uma participação significativa no processo de cicatrização (BANDARA; LEE; THOMAS, 2011). Isso está de acordo com o estudo feito por Shukla, Rasik e Dhawan (1999) na qual evidenciou-se que os ferimentos tratados com asiaticosídeo tiveram seus níveis de antioxidantes, os quais encontravam-se diminuídos, não somente restaurados mas também aumentados quando comparados aos níveis do grupo controle. Além disso, os ferimentos tratados com asiaticosídeo também apresentaram um aumento da atividade de antioxidantes como a superóxido dismutase, a catalase e a glutatona peroxidase. Já as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, marcadores de peroxidação lipídica, estavam diminuídas, sugerindo redução dos níveis de radicais livres. Assim, o estudo concluiu que a aceleração da cicatrização promovida pelo asiaticosídeo extraído da *Centella* pode ser devido a sua capacidade de elevar os níveis de antioxidantes no tecido.

Outra aplicação da *Centella asiatica* tem sido no tratamento de doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer. Ambas possuem o estresse oxidativo como suposto fator envolvido em suas fisiopatologias e o impacto da *Centella* em aprimorar o desempenho cognitivo tem sido relacionado às suas propriedades antioxidantes (LOKANATHAN et al, 2016). A doença de Alzheimer é uma patologia neurodegenerativa de caráter progressivo relacionada à perda de memória, da linguagem e a demais prejuízos cognitivos (RATHER et al, 2018). As placas beta-amiloides, os emaranhados neurofibrilares e níveis reduzidos de acetilcolina no cérebro são os fatores substanciais que levam ao desenvolvimento da doença (THU; HAI; TUNG, 2018). As placas beta-amiloides intracelulares são responsáveis por desencadear uma série de condições patológicas (disfunção sináptica, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, perda da regulação de cálcio e inflamação) sendo o envelhecimento o principal fator de risco para o desenvolvimento do Alzheimer, pois está relacionado à disfunção mitocondrial e ao aumento do estresse oxidativo (LEUNER; MÜLLER, REICHERT, 2012). A medicina Ayurvedica atribui à *Centella asiatica* diversos efeitos no sistema nervoso central, entre eles a capacidade de melhorar a memória, o aprendizado e a inteligência (RATHER et al, 2018). Nesse contexto, Gray et al (2015) realizou um estudo com células contendo placas beta-amiloides no qual demonstrou que o extrato aquoso da *Centella* impactou na função mitocondrial e pareceu reduzir os efeitos deletérios dessas placas. Ademais, Rather et al (2018) realizou um ensaio no qual observou que o ácido asiaticosídeo extraído da *Centella* atenuou a doença de Alzheimer induzida por intoxicação de alumínio em ratos, diminuindo a sobrecarga de alumínio, a hiperatividade da acetilcolinesterase, o prejuízo comportamental, o volume de placas beta-amiloides e o processo inflamatório.

Já a doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela diminuição de neurônios dopaminérgicos na Substância Negra Pars Compacta (BHATNAGAR et al, 2017). É a segunda doença neurodegenerativa mais comum após a Doença de Alzheimer e suas manifestações clínicas incluem tremor de repouso, bradicinesia, rigidez, instabilidade postural, ansiedade, depressão, hipotensão, constipação, parestesia, câibras e disfunção olfativa (WIRDEFELDT et al, 2011). A fisiopatologia da Doença de Parkinson ainda é desconhecida, mas uma quantidade significativa de evidências sugerem que disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e inflamação estão envolvidos no seu desenvolvimento (BEAL, 2003). Nesse sentido, um estudo realizado por Xu et al (2012) evidenciou que o

asiaticosídeo extraído da *Centella asiatica* teve uma potente ação neuroprotetora contra o parkinsonismo induzido por MPTP em ratos, provavelmente por manter o equilíbrio de óxido-redução e por aumentar a relação Bcl2/Bax.

Diante disso, é fundamental ressaltar que as formas de cultivo da *Centella asiatica* são de extrema importância, pois a quantidade de asiaticosídeo presente nela depende de sua origem, conforme foi demonstrado pelo estudo de Das e Mallick (1991), no qual amostras dessa planta cultivadas em altas altitudes apresentou uma quantidade significativamente maior de asiaticosídeo que aquelas cultivadas em altitudes menores. Outra forma de cultivo é a aquaponia, a qual consiste na integração entre agricultura e hidroponia em um sistema fechado, onde há uma inter-relação entre o resíduo do peixe e o vegetal (BUSS et al, 2015). É um modelo sustentável de produção de alimentos cujos princípios são: (i) os resíduos de um sistema provém nutrientes para um segundo sistema; (ii) a integração entre peixes e plantas resulta em uma policultura que aumenta a variedade de produtos; (iii) a água é reutilizada devido à filtração e recirculação; (iv) promove produção de alimentos saudáveis e impulsiona a economia local (DIVER; RINEHART, 2000). A contínua disponibilidade de nutrientes gerada pelos resíduos dos peixes e o consumo desses nutrientes pelas plantas geram um balanço que diminui a necessidade de monitoramento da qualidade da água, além do que a amônia excretada pelos peixes é utilizada pelas plantas como fonte de nitrogênio, levando ao balanceamento do pH da água (BANDARA; LEE; THOMAS, 2011). É uma técnica que possui menor necessidade de trocas de água (já que os nutrientes dos resíduos são utilizados pelas plantas), o que também reduz os custos de sua utilização em climas áridos e em estufas (RAKOCY et al, 2016). Além disso, tem se mostrado adequado para o cultivo da *Centella* (BANDARA; LEE; THOMAS, 2011). Por fim, vem sendo reconhecida por diversos motivos, como: (i) é uma fonte de adubo orgânico que permite o bom crescimento das plantas; (ii) é um meio de introduzir produtos orgânicos de hidroponia no mercado, já que o único adubo utilizado é a comida dos peixes e todos os nutrientes são submetidos a processamento biológico; (iii) permite a produção de dois produtos distintos derivados de uma única unidade de produção; (iv) permite a produção de vegetais frescos e de proteína de peixes em regiões áridas e em lugares com limitada disponibilidade de água; (v) é um modelo de produção sustentável (DIVER; RINEHART, 2000).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. COLETA E PREPARO DOS EXTRATOS

As amostras frescas de *Centella asiatica* cultivadas em solo foram coletadas às 9h30 do dia 28/08/2018 na Chácara Delfim em Brasília/DF e transportadas para o laboratório do Centro Universitário de Brasília – Campus Asa Norte. Para a preparação dos extratos as plantas foram lavadas em água corrente e separadas em folhas e caules (APÊNDICE A). Em seguida, as amostras foram maceradas em etanol 70%, utilizando uma proporção 1:5 massa/volume, da seguinte maneira:

10 g de folha – 200 mL de etanol 70%;

10 g de caule – 200 mL de etanol 70%;

5 g de folha + 5 g de caule – 200 mL de etanol 70%.

Por fim, as soluções foram cobertas com papel alumínio e colocadas em agitadores orbitais onde permaneceram por 7 dias em temperatura ambiente. Posteriormente, as soluções foram armazenadas na geladeira e no dia 06/09/2018 foram filtradas utilizando-se papel filtro e funis. Em seguida, o líquido do extrato vegetal foi aquecido em mantas aquecedoras entre 40° e 50°C em monitoramento contínuo, obtendo-se aproximadamente 5 mL de extrato.

No dia 02/07/2019 foram produzidos os extratos da *Centella asiatica* cultivada em aquaponia. As plantas foram lavadas em água corrente e separadas em partes (raiz, caule e folha), as quais foram secas em estufa e posteriormente trituradas (APÊNDICE B). Em seguida, foram maceradas em etanol 70%, na proporção 1:10 massa/volume, da seguinte maneira:

16 g de folha – 160 mL de etanol 70%;

16 g de caule – 160 mL de etanol 70%;

16 g de raiz – 160 mL de etanol 70%.

Por fim, as soluções foram cobertas com papel alumínio e colocadas em agitadores orbitais onde permaneceram por 7 dias em temperatura ambiente. Posteriormente, foram filtradas utilizando-se papel filtro e funis e, logo em seguida, o líquido do extrato vegetal foi aquecido

em mantas aquecedoras entre 40° e 50°C em monitoramento contínuo (APÊNDICE C), obtendo-se aproximadamente 5 mL de extrato.

Para a realização dos ensaios, os extratos foram diluídos da seguinte forma:

1. Amostras de *Centella asiatica* cultivadas no solo:
 - Folha (10x): foram diluídos 100 µL do extrato em 900 µL de água destilada;
 - Caule (10x): foram diluídos 100 µL do extrato em 900 µL de água destilada.
2. Amostras de *Centella asiatica* cultivadas em aquaponia:
 - Folha (10x): foram diluídos 100 µL do extrato em 900 µL de água destilada;
 - Caule (20x): foram diluídos 100 µL do extrato em 900 µL de água destilada. Em seguida, foram pipetados 100 µL dessa solução e adicionados a 900 µL de água destilada;
 - Raiz (10x): foram diluídos 100 µL do extrato em 900 µL de água destilada.

3.2. DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

A determinação dos compostos fenólicos foi realizada segundo o método Folin-Ciocalteu (APÊNDICE E):

1. Preparada a solução de Folin com água destilada na proporção 1:3 volume/volume;
2. Preparada a solução de Carbonato de Sódio 20%;
3. Foram pipetados 200 µL de cada extrato em tubos de ensaio, em triplicata;
4. Foram adicionados ao extrato de cada tubo: 2 mL de água destilada, 1 mL da solução de Folin e 2 mL da solução de Carbonato de Sódio 20%;
5. Realizada leitura a 700 nm, utilizando-se um branco (água destilada pura) para calibrar o espectrofotômetro Visível Digital Microprocessado DPT – QUIMIS – Cód: Q898DPT (número de série: 13120851) (APÊNDICE D).
6. As absorvâncias obtidas foram inseridas na curva de calibração.

Preparação da curva de calibração:

1. Preparada a solução estoque de Ácido Gálico na proporção de 1:20 massa/volume;
2. Preparados 6 tubos de ensaio conforme a tabela a seguir:

Tubo	Concentração (mg/mL)	Solução de Ácido Gálico	Água Destilada	Solução de Folin	Carbonato de Sódio 20%
Branco	0	-----	1.000 µL	1 ml	2 ml
1	0,5	200 µL	800 µL	1 ml	2 ml
2	1,0	400 µL	600 µL	1 ml	2 ml
3	1,5	600 µL	400 µL	1 ml	2 ml
4	2,0	800 µL	200 µL	1 ml	2 ml
5	2,5	1.000 µL	-----	1 ml	2 ml

- Realizada leitura a 700 nm, utilizando-se o branco para calibrar o espectrofotômetro Visível Digital Microprocessado DPT – QUIMIS – Cód: Q898DPT (número de série: 13120851).
- As absorbâncias obtidas foram utilizadas para confecção da curva.

3.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A determinação da atividade antioxidante foi realizada conforme o método de captura do radical 2,2' – AZINO – BIS (3-ethylbenzo – thiazoline – 6 – sulfonic acid) ou ABTS – Sigma, modificado pela EMBRAPA (2007) (APÊNDICE E):

- Preparada a solução estoque de ABTS 7 mM (192 mg ABTS em 50 mL de água destilada);
- Preparada solução de Persulfato de Potássio 140 mM (378,4 mg em 10 mL de água destilada);
- Preparado o radical ABTS a partir da solução estoque de ABTS e da solução de Persulfato de Potássio, o qual foi armazenado em vidro âmbar na geladeira por 16 horas;
- Foram pipetados 30 µL de cada extrato e 3 mL do radical ABTS em tubos de ensaio, em triplicata. Após 6 minutos: realizada leitura a 734 nm no espectrofotômetro Visível

Digital Microprocessado DPT – QUIMIS – Cód: Q898DPT (número de série: 13120851) (APÊNDICE D). Utilizou-se um branco (etanol) para calibração do aparelho.

6. As absorbâncias obtidas foram inseridas na curva padrão.

Preparação da curva padrão de Trolox:

1. Preparada a solução padrão de Trolox 2 mM (25 mg de Trolox em 50 mL de álcool etílico), a qual foi armazenada em vidro âmbar.
2. Preparados 5 tubos de ensaio conforme a tabela a seguir:

Tubos	Solução Padrão de Trolox	Álcool Etílico	Concentração final
1	0,5 mL	9,5 mL	100 μ M
2	2,5 mL	7,5 mL	500 μ M
3	5,0 mL	5,0 mL	1.000 μ M
4	7,5 mL	2,5 mL	1.500 μ M
5	10 mL	-----	2.000 μ M

3. Em ambiente escuro, foram pipetados 30 μ L de cada solução de Trolox (100 μ M, 500 μ M, 1.000 μ M, 1.500 μ M, 2.000 μ M) para novos tubos de ensaio e acrescentados 3 mL da solução de radical ABTS.
4. Após 6 minutos: realizada leitura a 734 nm no espectrofotômetro Visível Digital Microprocessado DPT – QUIMIS – Cód: Q898DPT (número de série: 13120851). Utilizou-se um branco (etanol) para calibração do aparelho.

3.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIÓTICA

Os experimentos para determinação da atividade antimicrobiana não foram realizados nesse estudo, pois em testes preliminares detectou-se resistência aos antibióticos das cepas de bactérias disponíveis no UniCEUB.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. DOSAGEM DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

Neste estudo, a concentração de compostos fenólicos dos extratos das folhas e dos caules de *Centella asiatica* cultivada em solo foi determinada em dois dias distintos, sendo que os resultados obtidos estão demonstrados abaixo nas Tabelas 1 e 2. Os testes mostraram que os extratos das folhas da *Centella* cultivada em solo possuem maior concentração de compostos fenólicos que os extratos dos caules. Já a determinação dos compostos fenólicos dos extratos das folhas, dos caules e das raízes da *Centella* cultivada em aquaponia foi realizada em um único dia e seus resultados estão listados abaixo nas Tabelas 3, 4 e 5. Os resultados obtidos das amostras de aquaponia evidenciaram uma concentração maior de compostos fenólicos no extrato das folhas do que nos extratos de caules e de raízes. Além disso, a concentração de compostos fenólicos foi superior no extrato de folhas das amostras de aquaponia do que nos extratos de folhas das amostras de solo. No entanto, a concentração de compostos fenólicos foi maior nos extratos de caules da *Centella* cultivada em solo do que nos extratos de caules da *Centella* cultivada em aquaponia. Por fim, o extrato de folhas das amostras da aquaponia foi o que apresentou maior concentração de compostos fenólicos dentre todos os extratos avaliados. Esses achados corroboram os dados de Zainol et al (2003), cujo estudo demonstrou que o extrato das folhas de *C. asiatica* continha a maior quantidade de compostos fenólicos quando comparado com os extratos dos caules e das raízes.

Tabela 1. Concentração de compostos fenólicos dos extratos de folhas de *C. asiatica* cultivada em solo.

Compostos fenólicos (02/07/2019)	Absorbância - 700nm	Concentração (mg EAG/mL)	Média
Amostra 1	1,080	19,503	20,065
Amostra 2	1,130	20,410	
Amostra 3	1,123	20,283	
Compostos fenólicos (08/07/2019)	Absorbância – 700 nm	Concentração (mg EAG/mL)	Média
Amostra 1	0,943	17,016	

Amostra 2	0,962	17,361	17,228
Amostra 3	0,959	17,306	

Legenda: **EAG** – equivalentes de ácido gálico

Tabela 2. Concentração de compostos fenólicos dos extratos de caules de *C. asiatica* cultivada em solo.

Compostos fenólicos (02/07/2019)	Absorbância – 700 nm	Concentração (mg EAG/mL)	Média
Amostra 1	0,730	13,150	13,380
Amostra 2	0,758	13,658	
Amostra 3	0,740	13,332	
Compostos fenólicos (02/07/2019)	Absorbância – 700 nm	Concentração (mg EAG/mL)	Média
Amostra 1	0,740	13,332	13,495
Amostra 2	0,757	13,640	
Amostra 3	0,750	13,513	

Legenda: **EAG** – equivalentes de ácido gálico

Tabela 3. Concentração de compostos fenólicos do extrato de folhas de *C. asiatica* cultivada em aquaponia.

Compostos fenólicos (09/07/2019)	Absorbância – 700 nm	Concentração (mg EAG/mL)	Média
Amostra 1	0,771	27,789	27,111
Amostra 2	0,720	25,938	
Amostra 3	0,766	27,607	

Legenda: **EAG** – equivalentes de ácido gálico

Tabela 4. Concentração de compostos fenólicos do extrato de caules de *C. asiatica* cultivada em aquaponia.

Compostos fenólicos (09/07/2019)	Absorbância – 700 nm	Concentração (mg EAG/mL)	Média
---	---------------------------------	-------------------------------------	--------------

Amostra 1	0,224	7,933	7,775
Amostra 2	0,216	7,642	
Amostra 3	0,219	7,751	

Legenda: **EAG** – equivalentes de ácido gálico

Tabela 5. Concentração de compostos fenólicos do extrato de raízes de *C. asiatica* cultivada em aquaponia.

Compostos fenólicos (09/07/2019)	Absorbância – 700 nm	Concentração (mg EAG/mL)	Média
Amostra 1	0,306	5,454	5,539
Amostra 2	0,311	5,545	
Amostra 3	0,315	5,618	

Legenda: **EAG** – equivalentes de ácido gálico

As leituras das amostras utilizadas para a confecção da curva padrão (Figura 1) estão listadas abaixo na Tabela 6.

Tabela 6.

Concentração Ácido Gálico mg/mL	Absorbância - 700 nm (Folin- Ciocalteu)
0	0,032
0	0,026
0	0,041
0,5	0,252
0,5	0,255
0,5	0,261
1,0	0,534
1,0	0,545
1,0	0,566
1,5	0,824
1,5	0,826

1,5	0,834
2,0	1,104
2,0	1,113
2,0	1,101
2,5	1,391
2,5	1,390
2,5	1,395

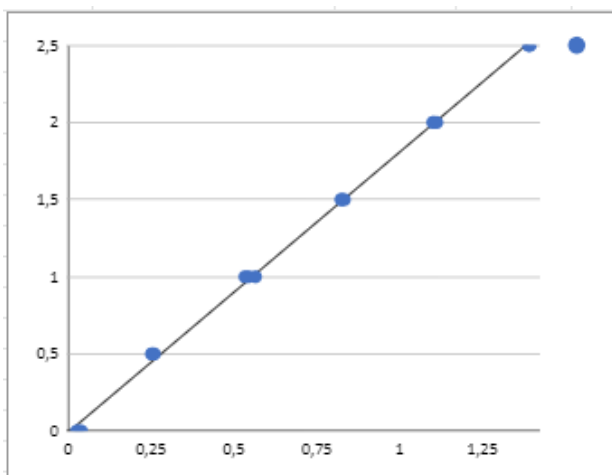


Figura 1. Curva padrão. O eixo x representa a concentração de Ácido Gálico (mg/mL) e o eixo y representa a absorbância da leitura a 700 nm.

4.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A determinação da atividade antioxidante das amostras de *Centella asiatica* cultivadas em solo foram realizadas em dois dias distintos e os seus resultados constam abaixo nas Tabelas 7 e 8. Os ensaios evidenciaram que a atividade antioxidante dos extratos de folhas da *Centella* cultivada em solo foi discretamente superior à atividade dos extratos dos caules. Já a determinação da atividade antioxidante das amostras de aquaponia foi realizada em um único dia e seus resultados estão listados abaixo nas Tabelas 9, 10 e 11. Neste estudo, constatou-se que a atividade antioxidante do extrato de folhas da *Centella* cultivada em aquaponia foi superior a dos extratos de caules e de raízes. Além disso, a atividade antioxidante do extrato de folhas das amostras de aquaponia também foi superior àquela dos extratos de folhas e de caules das amostras cultivadas no solo. Sendo assim, o extrato de folhas das amostras de aquaponia apresentou a maior atividade antioxidante dentre todos os extratos analisados. Esses dados corroboram os achados de Zainol et al (2003), cujo ensaio demonstrou que

extratos de folhas de *Centella asiatica* apresentavam a maior atividade antioxidante quando comparados aos extratos de caules e de raízes. No entanto, diferem dos dados de Hamid et al (2002), os quais obtiveram do extrato etanólico de raízes da *Centella asiatica* uma atividade antioxidante significativamente maior que aquela obtida dos extratos de folhas e de caules.

Pode-se notar também que o extrato de folhas das amostras de cultivo em aquaponia foi o que apresentou maior quantidade de compostos fenólicos, seguido pelos extratos de folhas do solo, de caules do solo, de caules da aquaponia e das raízes da aquaponia, sendo que a atividade antioxidante seguiu ordem semelhante. Isso também corrobora os dados de Zainol et al (2003), pois em seu estudo também foi observado que os extratos com maior atividade antioxidante também continham a maior quantidade de compostos fenólicos. Esses resultados demonstram uma possível associação entre compostos fenólicos e atividade antioxidante. Além disso, também está de acordo com os resultados obtidos por Stafussa et al (2018), cujo ensaio demonstrou uma significativa correlação entre a capacidade antioxidante e a quantidade de compostos fenólicos de frutas brasileiras. Entretanto, esses resultados diferem daqueles coletados por Bajpai et al (2005), já que em seu estudo a *Centella asiatica* apresentou baixa concentração de compostos fenólicos, mas alta atividade antioxidante. É importante lembrar que a concentração de compostos fenólicos varia de acordo com os meses, conforme foi evidenciado por Alqahtani et al (2015) em seu estudo, no qual o conteúdo total de triterpenos de *Centella asiatica* cultivada na Austrália foi significativamente maior no período de dezembro a fevereiro (verão no hemisfério sul). Nesse ensaio, os maiores valores de triterpenos foram obtidos em janeiro, enquanto os menores valores foram observados em junho e outubro (início do inverno e da primavera, respectivamente). Além disso, os maiores níveis de asiaticosídeo, ácido asiático e ácido madecássico foram obtidos em janeiro. Já os maiores níveis de madecassosídeo foram observados em março. Também evidenciou-se nesse estudo uma correlação entre o total de triterpenos e a temperatura, sendo que os níveis desse composto foram correlacionados com a duração da luz do dia. Esse achado está de acordo com a pesquisa de Maulidiani et al (2012), a qual obteve uma maior concentração de triterpenos em *Centella asiatica* exposta à luz solar plena, sugerindo que uma claridade de maior intensidade aumenta esses compostos. Ademais, a avaliação da atividade antioxidante mostrou que os extratos de plantas expostas à luz solar plena continham uma maior atividade antioxidante quando comparados aos

extratos de plantas expostas à meia-luz. Essa diferença foi extremamente significativa. O autor também expõe que a presença desses compostos, os quais podem agir como protetores solares defendendo as células de danos causados pela radiação UV, possivelmente explica o motivo pelo qual há maior concentração desses componentes em plantas expostas à luz solar plena. A concentração de compostos fenólicos também possui relação com o fenótipo da planta, como foi observado por Aziz et al (2007), cujo ensaio evidenciou uma diferença no conteúdo de asiaticosídeo e madecassosídeo entre extratos de plantas cultivadas em estufa com fenótipos F e S. No geral, o fenótipo S apresentou uma maior concentração de ambos os compostos em todas as partes da planta quando comparado ao fenótipo F. A média do teor de ambos os compostos foi máxima nas folhas. No entanto, a menor concentração de asiaticosídeo foi encontrada nas raízes das plantas com fenótipo F, enquanto que nas plantas com fenótipo S a menor concentração de asiaticosídeo e de madecassosídeo foi encontrada nos caules. Por fim, outra variável que influencia nos níveis de compostos fenólicos é altitude, conforme explicitado por Das e Mallick (1991) em um estudo que mostrou uma correlação positiva entre altitude e teor de asiaticosídeo, já que as populações de *Centella asiatica* cultivadas em altas altitudes apresentaram níveis mais elevados de asiaticosídeo que aquelas cultivadas em altitudes menores.

Tabela 7. Atividade antioxidante dos extratos de folhas da *C. asiatica* cultivada em solo.

Atividade Antioxidante (04/07/2019)	Absorbância - 734 nm	Concentração (µM)	Média
Amostra 1	0,021	31268,61	31647,04
Amostra 2	0,010	31788,96	
Amostra 3	0,008	31883,56	
Atividade Antioxidante (09/07/2019)	Absorbância – 734 nm	Concentração (µM)	Média
Amostra 1	0,048	29991,40	29928,33
Amostra 2	0,049	29944,10	
Amostra 3	0,051	29849,49	

Tabela 8. Atividade antioxidante dos extratos de caules da *C. asiatica* cultivada em solo.

Atividade Antioxidante (04/07/2019)	Absorbância – 734 nm	Concentração (µM)	Média
Amostra 1	0,012	31694,35	31710,12
Amostra 2	0,014	31599,74	
Amostra 3	0,009	31836,26	
Atividade Antioxidante (09/07/2019)	Absorbância – 734 nm	Concentração (µM)	Média
Amostra 1	0,049	29944,10	29928,33
Amostra 2	0,045	30133,32	
Amostra 3	0,054	29707,58	

Tabela 9. Atividade antioxidante dos extratos de folhas da *C. asiatica* cultivada em aquaponia.

Atividade Antioxidante (09/07/2019)	Absorbância – 734 nm	Concentração (µM)	Média
Amostra 1	0,239	41912,68	44530,17
Amostra 2	0,219	43804,84	
Amostra 3	0,176	47872,99	

Tabela 10. Atividade antioxidante dos extratos de caules da *C. asiatica* cultivada em aquaponia.

Atividade Antioxidante (09/07/2019)	Absorbância – 734 nm	Concentração (µM)	Média
Amostra 1	0,540	13435,68	16620,81
Amostra 2	0,509	16368,52	
Amostra 3	0,470	1002,91	

Tabela 11. Atividade antioxidante dos extratos de raízes da *C. asiatica* cultivada em aquaponia.

Atividade Antioxidante (09/07/2019)	Absorbância – 734 nm	Concentração (μM)	Média
Amostra 1	0,370	14759,52	13892,28
Amostra 2	0,427	12063,19	
Amostra 3	0,368	14854,12	

As leituras das amostras utilizadas para a confecção da curva padrão (Figura 2) estão listadas na Tabela 12.

Tabela 12.

Concentração Trolox (μM)	Absorbância – 734 nm
100	0,649
500	0,584
1000	0,484
1500	0,356
2000	0,259

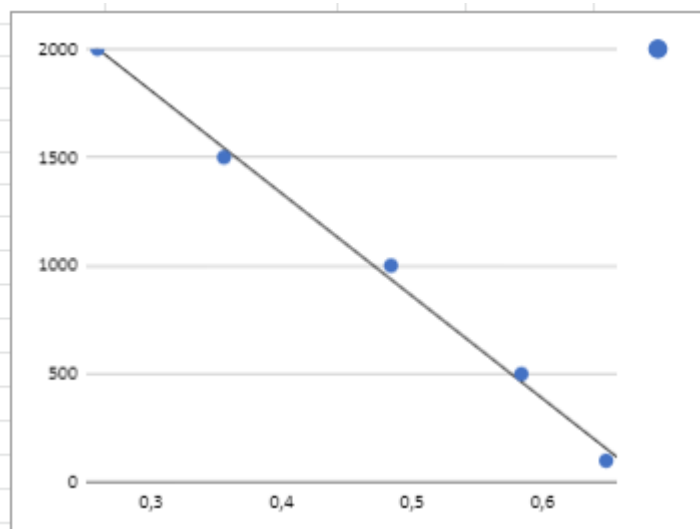


Figura 2. Curva padrão. O eixo x representa a concentração de Trolox (μM) e o eixo y representa a absorbância da leitura a 734 nm.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos nesta pesquisa revelaram que o extrato de folhas das amostras de *Centella asiatica* cultivada em aquaponia apresentou o maior teor de compostos fenólicos e a maior atividade antioxidante dentre todos os extratos analisados. Já o extrato de raízes da *Centella* cultivada em aquaponia possuiu o menor teor de compostos fenólicos e a menor atividade antioxidante dentre todos os extratos avaliados. Os extratos de caules das amostras cultivadas em solo apresentaram maior concentração de compostos fenólicos e maior atividade antioxidante quando comparados ao extrato de caules das amostras de aquaponia. Isso demonstra uma possível correlação entre a concentração de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. Entretanto, é importante enfatizar que a diferença no preparo das amostras do solo e da aquaponia podem resultar em viés de análise. Ainda são necessários mais estudos na área para elucidação dessa questão. Ademais, ainda são poucas as pesquisas acerca da determinação de compostos fenólicos e da dosagem de atividade antioxidante em plantas cultivadas em aquaponia, necessitando de mais incentivos e ensaios sobre o tema.

6. REFERÊNCIAS

- ALQAHTANI, Ali et al. Seasonal variation of triterpenes and phenolic compounds in Australian *Centella asiatica* (L.) Urb. **Phytochemical analysis**, v. 26, n. 6, p. 436-443, 2015.
- AZIS, H. A. et al. In vitro and In vivo wound healing studies of methanolic fraction of *Centella asiatica* extract. **South African Journal of Botany**, v. 108, p. 163-174, 2017.
- AZIZ, Z. A. et al. Production of asiaticoside and madecassoside in *Centella asiatica* in vitro and in vivo. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 1, p. 34-42, 2007.
- BAJPAI, Monika et al. Phenolic contents and antioxidant activity of some food and medicinal plants. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 56, n. 4, p. 287-291, 2005.
- BANDARA, Manjula S.; LEE, Ee L.; THOMAS, James E. Gotu Kola (*Centella asiatica* L.): An Under Utilized Herb. **The American Journal of plant science and Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 20-31, 2011.
- BEAL, M. Flint. Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease. **ANNALS-NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES**, v. 991, p. 120-131, 2003.
- BHAGAWATI, Madhusmita et al. Effect of *Centella asiatica* extracts on shigella dysenteriae and bacillus coagulans compared to commonly used antibiotics. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 5, p. 337-44, 2018.

BHATNAGAR, Maheep et al. Complete Comparison Display (CCD) evaluation of ethanol extracts of *Centella asiatica* and *Withania somnifera* shows that they can non-synergistically ameliorate biochemical and behavioural damages in MPTP induced Parkinson's model of mice. **PloS one**, v. 12, n. 5, p. e0177254, 2017.

BRINKHAUS, B. et al. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. **Phytomedicine**, v. 7, n. 5, p. 427-448, 2000.

BUSS, Alencar Borges et al. Desenvolvimento da aquaponia como alternativa de produção de alimentos saudáveis em perímetro urbano. **SEMINÁRIO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**, v. 4, p. 1127-1132, 2015.

CHOUDHARY, Raghuveer; TANDON, R. V. Consumption of functional food and our health concerns. **Pakistan Journal of Physiology**, v. 5, n. 1, 2009.

COWAN, Marjorie Murphy. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DAI, Jin; MUMPER, Russell J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.

DAS, Anathbandhu; MALLICK, Ranajit. Correlation between genomic diversity and asiaticoside content in. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 32, 1991.

DIVER, Steve; RINEHART, Lee. **Aquaponics-Integration of hydroponics with aquaculture**. Attra, 2000.

EMBRAPA. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS +. Fortaleza, 2007.

GOHIL, Kashmira J.; PATEL, Jagruti A.; GAJJAR, Anuradha K. Pharmacological review on *Centella asiatica*: a potential herbal cure-all. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 72, n. 5, p. 546, 2010.

GRAY, Nora E. et al. *Centella asiatica* attenuates amyloid- β -induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 45, n. 3, p. 933-946, 2015.

HAMID, A. Abdul et al. Characterisation of antioxidative activities of various extracts of *Centella asiatica* (L) Urban. **Food chemistry**, v. 77, n. 4, p. 465-469, 2002.

HARNVORAVONGCHAI, Phurt et al. Antimicrobial Effect of Asiatic Acid Against *Clostridium difficile* Is Associated With Disruption of Membrane Permeability. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2125, 2018.

HISAM, ELLY EZLINDA ABDUL et al. Combined extract of *Moringa oleifera* and *Centella asiatica* modulates oxidative stress and senescence in hydrogen peroxide-induced human dermal fibroblasts. **Turkish Journal of Biology**, v. 42, n. 1, p. 33-44, 2018.

HOSSAIN, Md Shohel et al. Determination of Antiemetic, Antimicrobial, Anti-Radical and Cytotoxic Activity of Methanolic Extracts of *Centella asiatica*. **Plant**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2018.

HOSSAIN, Shahdat et al. Medicinal value of asiaticoside for Alzheimer's disease as assessed using single-molecule-detection fluorescence correlation spectroscopy, laser-scanning

microscopy, transmission electron microscopy, and in silico docking. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 118, 2015.

JAMES, Jacinda; DUBERY, Ian. Pentacyclic triterpenoids from the medicinal herb, *Centella asiatica* (L.) Urban. **Molecules**, v. 14, n. 10, p. 3922-3941, 2009.

KUMARI, Sima et al. In vitro and in vivo antioxidant, anti-hyperlipidemic properties and chemical characterization of *Centella asiatica* (L.) extract. **Frontiers in pharmacology**, v. 7, p. 400, 2016.

LEUNER, Kristina; MÜLLER, Walter E.; REICHERT, Andreas S. From mitochondrial dysfunction to amyloid beta formation: novel insights into the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Molecular neurobiology**, v. 46, n. 1, p. 186-193, 2012.

LI, Robert; JIA, Zhenquan; TRUSH, Michael A. Defining ROS in biology and medicine. **Reactive oxygen species (Apex, NC)**, v. 1, n. 1, p. 9, 2016.

LOKANATHAN, Yogeswaran et al. Recent updates in neuroprotective and neuroregenerative potential of *Centella asiatica*. **The Malaysian journal of medical sciences: MJMS**, v. 23, n. 1, p. 4, 2016.

MAULIDIANI, H. et al. Discrimination of three pegaga (*Centella*) varieties and determination of growth-lighting effects on metabolites content based on the chemometry of ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy. **J. Agric. Food Chem**, v. 60, n. 1, p. 410-417, 2012.

NASCIMENTO, Gislene GF et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian journal of microbiology**, v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.

OTHMAN, Leen; SLEIMAN, Ahmad; ABDEL-MASSIH, Roula M. Antimicrobial Activity of Polyphenols and Alkaloids in Middle Eastern Plants. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 911, 2019.

PIRES, J. et al. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. **Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**, 2017.

RAKOCY, James et al. Recirculating aquaculture tank production systems: aquaponics-integrating fish and plant culture. 2016.

RATHER, M. Ahmad et al. Neuroprotective role of Asiatic acid in aluminium chloride induced rat model of Alzheimer's disease. **Front Biosci (Schol Ed)**, v. 10, p. 262-275, 2018.

SALEHI, Bahare et al. Antioxidants: Positive or negative actors?. **Biomolecules**, v. 8, n. 4, p. 124, 2018.

Senthilkumar, Mariappan. In vitro antifungal activity of bioactive compound of *Centella asiatica* (L.) urban. **International Journal of Botany Studies**, v. 3, n. 1, p. 74-79, 2018.

SHUKLA, Arti; RASIK, Anamika M.; DHAWAN, Bholu N. Asiaticoside-induced elevation of antioxidant levels in healing wounds. **Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives**, v. 13, n. 1, p. 50-54, 1999.

- STAFUSSA, Ana Paula et al. Bioactive compounds of 44 traditional and exotic Brazilian fruit pulps: phenolic compounds and antioxidant activity. **International journal of food properties**, v. 21, n. 1, p. 106-118, 2018.
- SURVESWARAN, Siddharthan et al. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food chemistry**, v. 102, n. 3, p. 938-953, 2007.
- THU, Nguyen TK; HAI, Nguyen T.; TUNG, Bui T. In Vitro Antioxidant and Acetylcholinesterase Inhibitory Activities of Fractions from *Centella asiatica* (Linn.) Extract. **Current Bioactive Compounds**, v. 14, n. 1, p. 86-91, 2018.
- WIRDEFELDT, Karin et al. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **European journal of epidemiology**, v. 26, n. 1, p. 1, 2011.
- XU, Chang-Liang et al. Asiaticoside: attenuation of neurotoxicity induced by MPTP in a rat model of Parkinsonism via maintaining redox balance and up-regulating the ratio of Bcl-2/Bax. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 3, p. 413-418, 2012.
- YADANG, Fanta et al. Quantification of Bioactive Compounds and Evaluation of the Antioxidant Activity of *Carissa edulis* Valh (Apocynaceae) Leaves. **The Scientific World Journal**, v. 2019, 2019.
- YAO, Chun-Hsu et al. Wound-healing effect of electrospun gelatin nanofibres containing *Centella asiatica* extract in a rat model. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 11, n. 3, p. 905-915, 2017.
- 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.

7. APÊNDICE

7.1. APÊNDICE A – FOTOS DAS AMOSTRAS DE SOLO



7.2. APÊNDICE B – FOTOS DAS AMOSTRAS DE AQUAPONIA

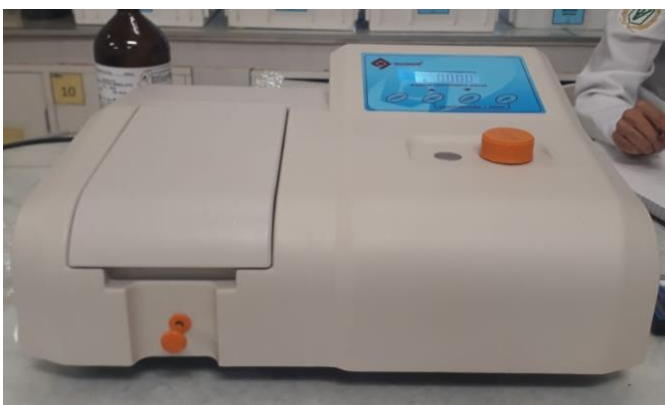


APONIA





APÊNDICE D – FOTOS DO ESPECTROFOTÔMETRO





APÊNDICE E – FOTOS DOS EXPERIMENTOS

