
Avaliação da atividade antibacteriana da *Cyperus rotundus* Linn. (Cyperaceae) por meio de um sistema de análise por injeção em fluxo

Bianca de Souza Campos, Geovanna Kelly Chagas, Maria Karollyne Ferreira de Oliveira, Júlio Cezar de Jesus Silva, Viviane Gomes Bonifacio, Giuliana Muniz Vila Verde, Jonas Alves Vieira

<https://doi.org/10.4322/mp.978-65-84548-08-4.c4>

Resumo

A *Cyperus rotundus*, conhecida popularmente no Brasil como Tiririca ou Junça aromática é uma planta daninha, com cerca de 20-40 cm de altura, composta por inflorescências, folhas basais e rizomas que terminam em tubérculos ovalados e negros. Com grande potencial medicinal, apresenta diversas atividades farmacológicas como: adstringente, diaforética, diurética, emenagoga, sedativa, vermífuga, tônica e antibacteriana. O objetivo deste trabalho foi utilizar um sistema de análise por injeção em fluxo contínuo com detecção espectrofotométrica, para avaliação antibacteriana das soluções dos extratos brutos etanólicos e das frações semi purificadas das folhas e dos rizomas da *Cyperus rotundus*, frente a bactéria *Escherichia coli*. A planta passou por uma fase de tratamento, onde obteve-se amostras em pó da droga vegetal das folhas e dos rizomas. Estas foram submetidas à técnica de maceração com o etanol, e posteriormente a pressão reduzida, conduzindo ao extrato bruto etanólico (E.B.E), uma parte do mesmo foi fracionada e semi-purificadas em AcOEt, Hexânica, Diclorometânica e Aquosa. Os testes foram realizados usando 5 soluções de leitura: branco em relação a microrganismos, referência de comparação, dimetilsulfóxido (DMSO) 0,88 % e de amostras do fracionamento. As leituras foram realizadas em intervalos de 30 minutos durante 270 minutos. As amostras dos rizomas da planta, apresentaram uma leve ação antimicrobiana sobre o inóculo, sendo a fração de AcOEt 144 mgL⁻¹ a que mais inibiu a bactéria. Nas amostras das folhas foi observado fornecimento de nutrientes, proporcionando maior proliferação populacional da bactéria. A atividade antibacteriana da *C. rotundus*, se deve principalmente à produção de metabólitos secundários.

Palavras-Chaves: Avaliação antibacteriana, *Escherichia coli*, Sistema de análise por injeção em fluxo, Tiririca.

1. Introdução

As plantas para garantir sua sobrevivência no meio ambiente produzem metabólitos secundários que apresentam diversas funções, dentre elas proteção

contra herbívoros, fungos e bactérias, alelopatia, atração de polinizadores etc. Muitos desses metabólitos podem ser utilizados na produção de cosméticos e medicamentos, devido as suas propriedades farmacológicas como por exemplo, antioxidante, anti-inflamatória, analgésico, estimulante do Sistema Nervoso Central, antitumoral, antisséptica e dentre outras propriedades (VIZZOTO *et al.*, 2010).

O Cerrado apresenta uma grande biodiversidade taxonômica e produção de compostos bioativos, que vem despertando interesse na investigação científica de plantas medicinais (LIMA NETO *et al.*, 2015), dentre elas destaca-se a planta *Cyperus rotundus*, conhecida popularmente como tiririca ou Junça-aromática. *Cyperus rotundus* é originária da Índia, sendo considerada uma das espécies vegetais com maior amplitude de distribuição no mundo, devido a sua capacidade de adaptar-se a diferentes tipos de solo, altitudes, temperaturas e pH do solo (SIVAPALAN, 2013). No Brasil, ocorre em quase toda extensão territorial e é vista como uma planta daninha, por possuir efeito alelopático e apresentar tubérculos que permanecem dormentes por longo período, contribuindo para a persistência dessa espécie no solo (SILVEIRA *et al.*, 2010).

A tiririca é uma planta pequena e herbácea que produz poucas sementes viáveis, apresentando rizomas que podem se diferenciar em tubérculos ou bulbos basais. Os metabólitos que foram detectados na *Cyperus rotundus* são alcaloides, antraquinonas, cumarinas, esteroides e triterpenos, flavonoides, saponinas, taninos, resinas, amido, glicosídeos, monoterpenos, sesquiterpenos, sitosterol, terpenóides, óleos essenciais etc. (AL-SNAFI, 2016; SIVAPALAN, 2013).

Deste modo, a tiririca pode ser utilizada no combate a pragas em sistemas agroecológicos, indução de enraizamento e como uso medicinal (BARBOSA *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2012; SARNO *et al.*, 2014). Alguns efeitos farmacológicos da *C. rotundus* são anti-inflamatório, sedativo, anti-histamínico, antimalárica, antiparasitária, antipirético, antioxidante, efeito gastrointestinal, antidiabético, antimicrobiano, anticonvulsivante, hipolipemiante, entre outros efeitos (AL-SNAFI, 2016; SINGH *et al.*, 2012; SIVAPALAN, 2013).

Logo, como a tiririca produz uma variedade de metabólitos que apresentam toxicidade para patógenos microbianos, essa pode influenciar no crescimento da bactéria *Escherichia coli*. A análise da toxicidade pode ser

detectada por sistema de análise por injeção de fluxo em que avalia a turbidez da bactéria através do espectrofotômetro.

Portanto, como a planta tiririca encontra-se em diferentes locais, principalmente no Cerrado, e é utilizada na medicina popular por apresentar uma variedade de compostos químicos que podem influenciar no crescimento da *Escherichia coli*, e como vem ocorrendo um decréscimo na produção de antimicrobianos e um aumento na resistência dos microrganismos aos mesmos, acarretando sérios problemas na saúde pública, são necessários desenvolvimentos de pesquisas para que se possa isolar o(s) composto(s) químico(s) que trazem os benefícios antimicrobianos.

Dessa maneira o objetivo deste trabalho é o emprego do sistema de análise por injeção em fluxo, proposto para avaliação antibacteriana em amostra das folhas e dos rizomas da *Cyperus rotundus*, usando a bactéria *Escherichia coli* como teste, inoculada em meio de cultura e dopada com os extratos da referida amostra.

Referencial teórico

2.1. Família Cyperaceae

A família Cyperaceae é uma família cosmopolita, herbácea com grande diversidade principalmente em trópicos úmidos e semiúmidos, mas também frequente dominante em temperaturas frias. Compreende 104 gêneros e aproximadamente 5000 espécies. Apresenta características bem definidas, a maioria são perenes, relvadas, semelhantes a gramas. Estão associadas à formação em ambientes mal drenados como brejos, pântanos e em margens de rios e corpos d'água (GOETGHEBEUR, 1998).

Suas folhas são geralmente lineares e plana, as hastes não costumam apresentar ramificações, sendo que normalmente crescem em um colmo com uma inflorescência terminal central. Podem desenvolver curtos ou alongados rizomas (bulbos espessados), subterrâneos que terminam em tubérculos. Uma ocorrência quase universal é a presença de corpos de sílica, nas paredes internas das células da epiderme (GOETGHEBEUR, 1998).

2.2. Gênero *Cyperus*

Dentre o gênero *Cyperus* destacam diversas espécies, que possuem interesse economicamente, na alimentação, nos cosméticos e na medicina. Uma das espécies mais antigas historicamente é a *Cyperus papyrus* L, ou comumente papiro, conhecido pela sua cultivação pelos antigos egípcios, gregos e romanos na produção de papiros; um tipo de papel feito de tiras da medula do colmo colocadas e pressionadas juntas. Estudos apontam a utilização do papiro para a produção de biomassa sólida, para o cozimento de alimentos, na África Subsaariana. Na Figura 1, é possível visualizar a amplitude da distribuição mundial do gênero (JONES, 2018).

No Brasil, o gênero *Cyperus* abrange principalmente as ervas daninhas nas culturas de arroz, ocasionando aspectos negativos diretos na competição por recursos ambientais, dificultando a colheita, e por consequência acaba afetando a rentabilidade (ULGUIM *et al.*, 2019). O manejo é realizado principalmente por meio do controle com o uso de herbicidas, porém segundo Chapinotto *et al.* (2017), o uso excessivo selecionou plantas daninhas resistentes à acetolactato sintase (ALS) que inibe herbicidas em áreas de arroz irrigado.

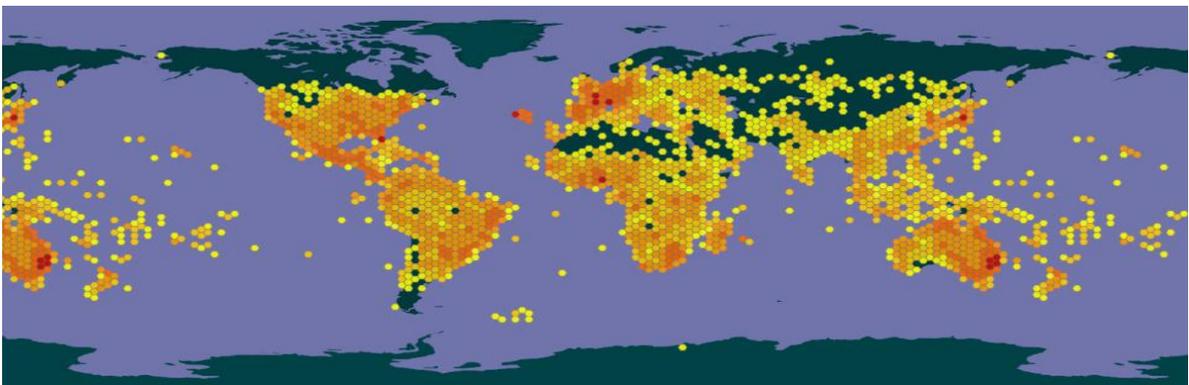


Figura 1. Distribuição mundial do gênero *Cyperus*. Fonte : GBIF, 2022. Disponível em:<https://www.gbif.org/species/2713455>.

Uma espécie de grande caráter econômico é a *Cyperus articulatus* L, conhecida vulgarmente como priprioca que apresenta distribuição nas Américas tropical e subtropical, sendo muito encontrada na Amazônia. Devido os seus óleos essenciais aromáticos é bem vista na confecção de perfumes (FERREIRA, 2018).

2.3. Espécie *Cyperus rotundus* L.

De origem indiana, a *Cyperus rotundus* Linn., uma planta conhecida popularmente como Tiririca, é amplamente distribuída pelo mundo, acredita-se que sua chegada no Brasil foi durante os tempos coloniais, pelos navios mercantes portugueses (SANTOS, 2014). Pertencente à família Cyperaceae, com cerca de 20-40 cm de altura é composta por inflorescências, folhas basais de coloração verde-brilhante e inervação paralelinérvea, caule de haste triangular e caule subterrâneo (rizoma) com raízes que terminam em tubérculos ovalados e negros, conforme representada na Figura 2 (ARANTES, 2005).



Figura 2. *Cyperus rotundus* L. (a) inflorescências e folhas (b) rizomas com os tubérculos. Fonte : <https://www.gbif.org/occurrence/gallery>, taxon_key=2714818. 2022 Décio Karam Embrapa.

Conhecida pela sua sobrevivência e persistência nas lavouras de cana-de-açúcar e algodão, é uma planta daninha de ciclo fotossintético C₄, que possui uma maior eficiência na absorção de CO₂ atmosférico (AZANIA *et al.*, 2006). Sendo assim, acaba adaptando-se melhor em locais com climas quentes e secos. Detêm de uma diversidade química de espécies, notável pelas diferenças na composição química dos seus óleos essenciais (SANTOS, 2014).

É utilizada na alimentação animais suínos, na confecção de utensílios, na indústria têxtil e de uso medicinal (SANTOS, 2014). Estudos estão sendo feitos para mostrar suas potenciais atividades farmacológicas como: anti-inflamatória, antidiabética, antipirética, analgésica, anti-dismenorréia, repelente, entre outros

(SINGH *et al.*, 2012). Os rizomas são considerados adstringentes, diaforéticos, diuréticos, aromáticos, emenagogos, sedativos, vermífugos, tônicos e antibacterianos (AL-SNAFI, 2016).

Em um estudo os rizomas de *Cyperus rotundus* foi submetido a análise por GC-MS mostrando um perfil altamente complexo; contendo cerca de dez componentes de alcalóide e aproximadamente vinte e cinco componentes pertencem ao de fenóis (ABO-ALTEMEN *et al.*, 2019). Kamala *et al.* (2018), fizeram uma revisão sistemática na qual encontraram mais de 30 estruturas nos rizomas da espécie (Figura 3).

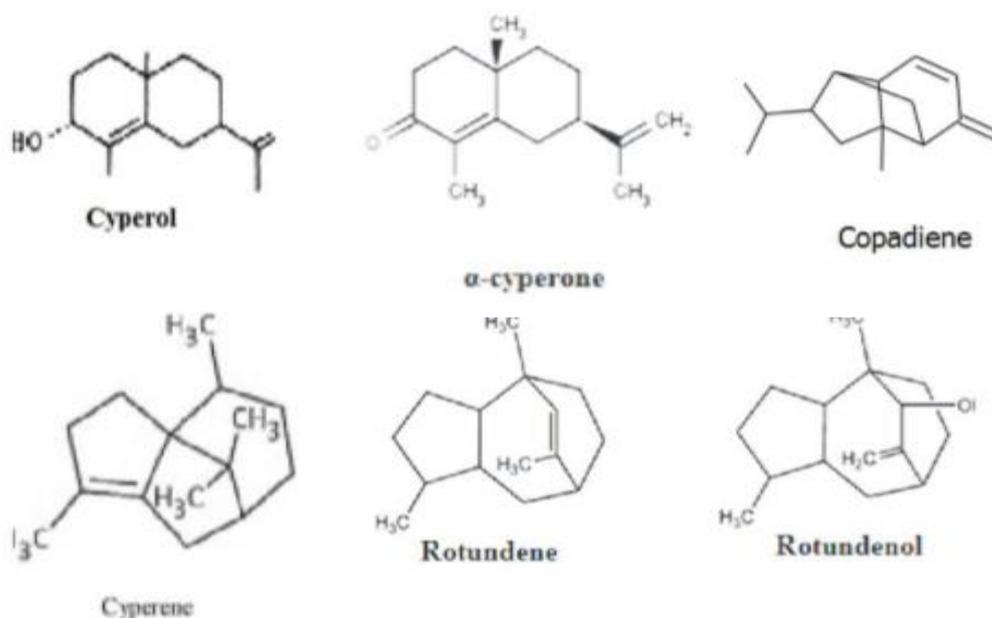


Figura 3. Estruturas encontradas nos rizomas da *C. rotundus*. Fonte: Adaptado de Kamala (2018).

2.4 *Escherichia coli*

Com cerca de 1 micrômetro de comprimento, a *Escherichia coli* é uma bactéria gram-negativa, anaeróbica facultativa, cuja morfologia é de bastonetes. Descoberta em 1962 pelo cientista Escherich, pertence à família *Enterobacteriaceae*, faz parte da microbiota do trato intestinal de humanos e de outros mamíferos, pois contribui para a produção de certas vitaminas e participa da digestão de alimentos. Sendo assim, sua presença na água e nos alimentos é indicativo de contaminação fecal (KAPER *et al.*, 2004; TORTORA *et al.*, 2010; ROSA *et al.*, 2016).

Por fissão binária, em condições favoráveis, se divide a cada 20 minutos, assim após 20 gerações, uma única célula inicial poderá gerar mais de um milhão de células. Desta forma, apresenta como vantagem o fato de ser facilmente cultivada, além de características bioquímicas e genéticas bem conhecidas. Entretanto, esta bactéria, possui algumas linhagens patogênicas que causam infecções urinárias e gastroenterite, mais comumente conhecida como diarreia dos viajantes. Isto se deve ao fato de transportar plasmídeos codificadores de toxinas e de fímbrias que permitem a maior fixação bacteriana às células intestinais. (KAPER *et al.*, 2004; TORTORA *et al.*, 2010; ROSA *et al.*, 2016).

A linhagem chamada de *Escherichia coli* O157:H7, tem sido tratada como problema de saúde pública. Atualmente, é uma das principais causas de diarreia no mundo. Em 1996, cerca de 9 mil pessoas no Japão ficaram doentes e sete morreram como resultado de uma infecção por *Escherichia coli* O157:H7. Na maioria dos surtos estão associados com carne malpassada e bebidas não pasteurizadas, por essa incidência os órgãos de saúde dos Estados Unidos incentivaram a pesquisa científica para o desenvolvimento de novos métodos de detecção da bactéria nos alimentos (KAPER *et al.*, 2004; TORTORA *et al.*, 2010; ROSA *et al.*, 2016).

2.5. Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

O sistema de análise por injeção em fluxo é uma técnica alternativa, na qual consiste em procedimentos analíticos automatizados. Tem como princípio a injeção de uma solução de amostra no seu percurso analítico, que se dispersa e entra em contato com uma solução transportadora podendo estar apta a sofrer reações químicas, e se separar ou se concentrar, resultando em um produto a ser detectado (REIS *et al.*, 1989; MOREIRA, 2014).

Apresenta como vantagens o baixo custo, a rapidez (tempo de 20 a 50 s) a praticidade e versatilidade, alta frequência de amostragem, já que permite maior reprodutibilidade, menor risco de exposição do analista a substâncias tóxicas, e pouco consumo de reagentes, contribuindo para a redução na geração de resíduos no meio ambiente. Além de ser munida a adaptações, em suas estruturas, para controlar o volume, a vazão de amostragem ou para adquirir

diferentes tipos de detecção como condutométrica, espectrofotométrica, potenciométrica, amperométrica, entre outras. (REIS *et al.*, 1989; SANTOS, A. C. V.; MASINI, J. C., 2010; DOS SANTOS *et al.*, 2011; MOREIRA, 2014; TOLEDO, MA *et al.*, 2018; TOLEDO, Mônica A, *et al.*, 2019).

2.6. Atividade antibacteriana

O crescimento bacteriano apresenta resposta constante na Figura 4, conforme retratado por *Farah* (2001):

- Fase lag: corresponde ao período inicial. Não há aumento no número de bactérias viáveis, mas uma adaptação ao meio. Neste período as células aumentam de tamanho e ficam prontas para a divisão.
- Fase Logarítmica ou Exponencial: corresponde ao período de crescimento rápido e máximo no número de bactérias viáveis.
- Fase Estacionária: corresponde ao período onde o número de bactérias viáveis permanece constante. Há um equilíbrio entre o ritmo de reprodução e o ritmo de morte por razões como esgotamento de nutrientes essenciais e acúmulo de produtos metabólicos tóxicos.

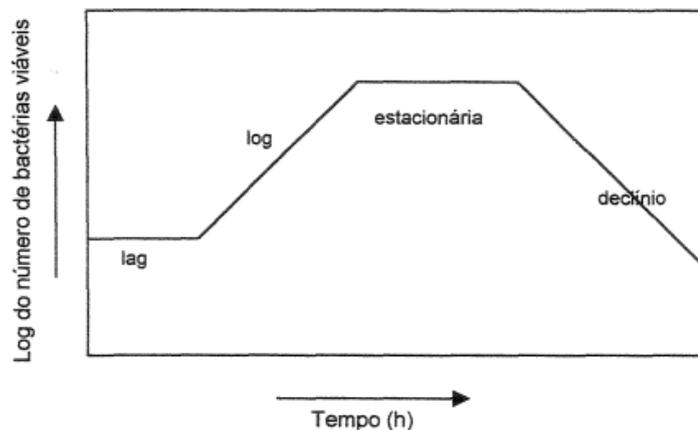


Figura 4. Curva do crescimento bacteriano. Fonte: FARAH (2001).

- Fase de declínio ou desativação da bactéria: corresponde ao período em que o número de bactérias viáveis decresce, onde ocorre mais mortes do que produção (FARAH, 2001).

3. Metodologia

3.1. Material botânico

Realizou-se a coleta da *Cyperus rotundus* no início do mês de novembro de 2016, área situada às margens da Rua Getúlio Dédio de Brito Qd. 23, Lt.19, Residencial Vale dos Sonhos, Goiânia - GO, com as coordenadas geográficas correspondentes a latitude 6°35'54.1"S e longitude 49°12'15.1"W. A excisata foi armazenada no herbário do Campus Central - SEDE-CET, Anápolis da Universidade Estadual de Goiás (UEG).

Posteriormente, a planta passou pela fase de tratamento, na qual constituiu-se na obtenção da droga vegetal. Primeiramente lavou-se com sanitizante para retirada da sujidade e de possíveis contaminantes. Realizou-se a secagem sob condições normais, a temperatura ambiente, para que não houvesse a eliminação de substâncias voláteis, que durou 8 dias ao ar livre na sombra. Após a secagem, separou-se as folhas juntamente com as inflorescências dos rizomas e tubérculos e procedeu-se a moagem das amostras separadamente. A moagem foi realizada em um moinho de facas *MARCONI* (modelo 680) com granulação de 40 meshes.

3.2. Preparação dos extratos vegetais

Exatamente 300 g da droga vegetal pulverizada das folhas e dos rizomas foram submetidos ao processo de extração por maceração com etanol 70 °GL, sob agitação manual com renovação do solvente de 2 a 4 dias. Durante o preparo, armazenou-se o extrato ao abrigo da luz e perante refrigeração, para evitar a degradação por oxidação/hidrólise e contaminação microbiana. Realizou-se cerca de 15 extrações, para extrair o máximo de substâncias possíveis.

O filtrado obtido das extrações passou-se pelo método de rotoevaporação no evaporador rotativo *QUIMIS*, modelos 34482 e Q344M2, temperatura de 40 °C, com objetivo de eliminar o etanol e para subsequente obtenção do extrato bruto etanólico (E.B.E.).

3.3. Fracionamento das extrações

Para a extração de variáveis metabólitos secundários, optou-se pela realização do fracionamento do E.B.E.. Submeteu-se à partição líquido-líquido com solventes orgânicos, 34,20 g de E.B.E das folhas e 35,46 g dos rizomas, no qual a princípio foi solubilizado em uma mistura de 7:3 metanol água com o auxílio de um banho ultra-sônico *Unique Clean*, modelo *Maxi Clean 750*, para a retirada de clorofilas. Em seguida, o extrato foi submetido ao fracionamento com os solventes descritos na Figura 5, separando-se a fase orgânica da fase aquosa. Obtendo-se três frações semi purificadas e uma residual (aquosa).

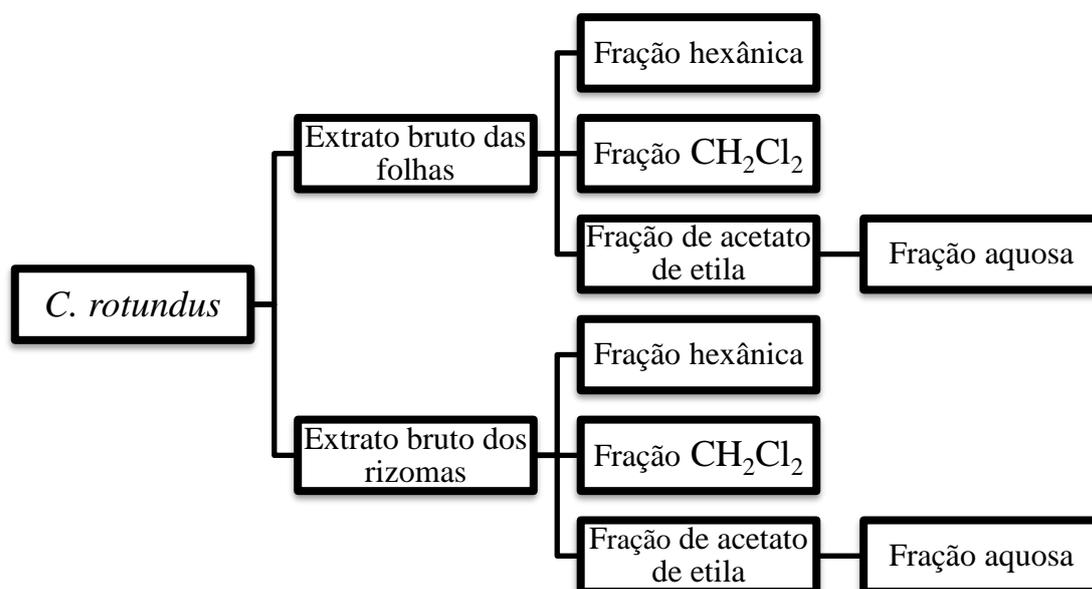


Figura 5. Esquema da etapa de Fracionamento de partição líquido- líquido do extrato bruto etanólico de *C. rotundus*.

Em cada fração foi adicionado o sulfato de sódio anidro para absorver o restante de água presente nas mesmas, e em seguida concentrou-se as frações no evaporador rotativo na temperatura de 40 °C.

3.4. Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

O Sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA), trata-se de um sistema fechado que oferece condições adequadas para análises envolvendo microorganismos, com o desígnio de evitar ou minimizar a contaminação do laboratório com os mesmos.

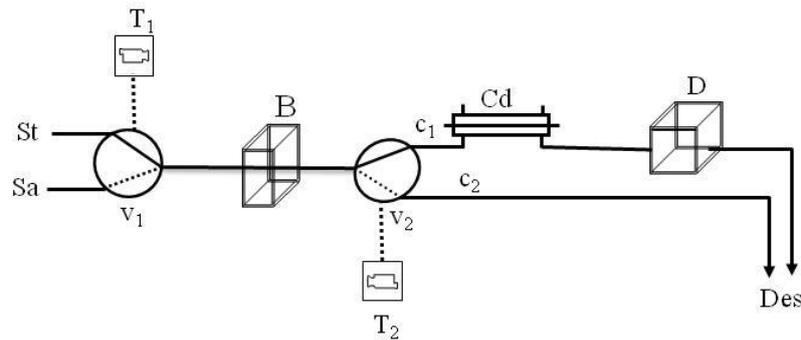


Figura 6. Módulo de análise do sistema em fluxo contínuo. St = Reagente e solução transportadora (H_2SO_4 0,2 mol/L⁻¹); Sa = solução de amostra; v_1 e v_2 = válvulas solenóides de três vias; B = bomba peristáltica; c_1 = caminho 1; c_2 = caminho 2; Cd = câmara de separação por difusão gasosa; T1 e T2 = Temporizadores semi-automáticos; D = Espectrofotômetro; Des = descarte.

Conforme o módulo de análise do sistema em fluxo representado na Figura 6, mantendo-se as válvulas v_1 e v_2 desligadas, a solução transportadora flui pelo caminho c_1 , passando pela câmara de separação Cd, detector (D), indo para o descarte (Des). Para inserir a solução de amostra liga-se a válvula (v_1), por um intervalo de tempo previamente definido e, em uma dada vazão para delimitar o volume da solução de amostra (sa) a ser inserido no percurso analítico do sistema em fluxo. Após a amostragem, desliga-se v_1 , voltando fluir a solução transportadora que transporta a solução da amostra pelo canal c_1 , passando pela cubeta no detector, onde é gerado um sinal de absorvância em função da turbidez propiciada pela proliferação dos microrganismos nas soluções, em seguida chega ao descarte. Na câmara de difusão ocorre a separação e descarte do gás CO_2 . O descarte do CO_2 faz-se necessário, uma vez que ao passar pela cubeta no espectrofotômetro, gera instabilidade nas leituras, devido alteração no meio reacional, propiciada pelo mesmo.

A válvula (v_2), só é ligada durante a troca de solução de amostra, essa é usada para desviar os resíduos de soluções de amostras, pelo caminho c_2 indo direto para o descarte, sem passar pelo detector. Assim, v_2 é ligada juntamente com v_1 por certo intervalo de tempo apropriado, para efetuar a troca de solução de amostra corroborando para aumentar a frequência analítica. Em seguida,

desliga-se v_1 e na sequência v_2 , voltando a fluir a solução transportadora por c_1 . Nessa condição pode-se iniciar um novo ciclo de amostragem.

Quanto aos temporizadores semiautomáticos, são dispositivos construídos no laboratório, com escala de tempo variável de 0,5 segundos a 5 minutos. Estes acessórios permitem ligar e desligar componentes eletrônicos, em intervalo de tempo definido pelo analista. É constituído de uma chave que uma vez acionada, liga o aparelho, que permanece ligado durante o intervalo de tempo definido previamente, ao final deste período desliga-o automaticamente. Para esse sistema em fluxo, os temporizadores foram construídos com o objetivo de ligar e desligar as válvulas solenoides de três vias v_1 e v_2 , requeridas para realização da análise química. Para efetuar a amostragem, usa-se o temporizador t_1 para ligar v_1 . Usando um intervalo de tempo constante, para reproduzir com precisão os volumes de soluções serem inseridos no percurso analítico do referido sistema.

A válvula v_2 é ligada pelo temporizador t_2 , de forma semelhante a v_1 . Entretanto o intervalo de tempo que v_2 permanece ligada, deve ser maior que o de v_1 , para garantir a troca de solução de amostra e a limpeza do percurso analítico de forma adequada. Assim ao desligar v_1 e mantendo v_2 ligada por maior intervalo de tempo, a solução transportadora continuará fluindo por c_2 , descartando todo o resíduo gerado durante a troca de solução de amostra. Todas as condições de otimizações das análises foram definidas experimentalmente.

Os estudos foram realizados inserindo-se 200 μL de solução de amostra, que correspondia 5 s de amostragem, cuja vazão foi mantida em 2,4 mLmin^{-1} . No espectrofotômetro UV-Vis, as leituras em absorbância foram efetuadas usando o comprimento de onda em 440 nm.

3.5. Meio de cultura

Utilizou-se o meio de cultura denominado de mínimo para o crescimento da bactéria *Escherichia coli* (ATCC 25922). Pesou-se 7 g de K_2HPO_4 ; 3 g de KH_2PO_4 ; 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,5 g de citrato de sódio. Solubilizou-se e diluiu-se cerca de 800 mL de água destilada, ajustou-se o pH

para 7,2 com solução de KOH. Autoclavou-se (121°C por 15 minutos) e em seguida resfriou-se a aproximadamente 70°C, quando então adicionou-se cerca de 200 mL de solução previamente fervida contendo 20 g de glicose. Em resumo esta composição foi para preparar 1 litro de meio de cultura. Armazenou-se em frasco estéril.

3.6. Preparação das soluções das amostras das folhas, rizomas e de DMSO

Para a realização de teste biológico nas amostras do E.B.E e das frações (amostras das folhas e dos rizomas), todas as soluções das amostras foram preparadas conforme descrito a seguir:

- a) Solução das amostras dos E.B.E., pesou-se 103 mg das amostras, que se solubilizou em 4 mL de Dimetilsufóxido (DMSO), que foi aferida em um balão volumétrico de 50 mL, com água deionizada, resultando na concentração em amostra de 2000 mgL⁻¹. Esse mesmo procedimento foi usado na preparação das soluções das amostras das frações.
- b) Solução da fração hexânica, 2080 mgL⁻¹ em amostras;
- c) Solução da fração de diclorometano, 2080 mgL⁻¹ em amostras;
- d) Solução da fração de acetato de etila (AcOEt), 2000 mgL⁻¹ em amostras;
- e) Uma solução de DMSO 8%, foi preparada transferindo-se 4 mL de DMSO (PA) para um balão volumétrico de 50 mL e completando o volume com água deionizada.

A solução de DMSO 8% foi utilizada com o objetivo de avaliar se esse solvente usado na solubilização das amostras, na referida concentração, poderia interferir no desenvolvimento da bactéria *Escherichia coli*, usada na avaliação antibacteriana nas soluções em análise.

3.7. Preparação das soluções de leitura para avaliação biológica

Todas as soluções de leitura foram preparadas usando alíquotas das soluções, conforme descrito no Tabela 1.

Tabela 1. Procedimento usado na preparação das soluções de leituras. Avaliação das soluções em branco, referência, DMSO e das amostras das folhas e dos rizomas da planta *Cyperus rotundus*.

Soluções	Alíquotas em (mL)						
	Meio de Cultura	Suspensão de <i>E.coli</i>	Água	E.B.E. 2000 mg L ⁻¹	Fração hexânica 2080 mg.L ⁻¹	Solução DMSO 8%	Volume Final
Branco	26,2	-	3,8	-	-	-	30
Referência	26,2	0,5	3,3	-	-	-	30
DMSO 0,88%	26,2	0,5	0,38	-	-	3,3	30
E.B.E. 104 mgL ⁻¹	26,2	0,5	1,74	1,56	-	-	30
Fração hexânica 102,67 mg.L ⁻¹	26,2	0,5	1,82	-	1,48	-	30

As soluções de leituras das demais amostras foram preparadas seguindo o mesmo procedimento descrito na tabela 1.

Descrições das soluções da Tabela 1:

- Solução em branco, constituída somente do meio de cultura, foi utilizada para certificar que o meio de cultura usado nas análises, encontrava-se isento de contaminação por possíveis microrganismos;
- Solução de DMSO 0,88 %, teve como objetivo verificar suas possíveis interferências no desenvolvimento da bactéria *Escherichia coli*. A utilização dessas soluções fez-se necessário, uma vez que as amostras foram

solubilizadas com este solvente, resultando essa concentração nas soluções de leitura.

- Solução de referência, foi usada como meio de comparação referente ao desenvolvimento da bactéria nas soluções das amostras em análise, para verificar a presença de substâncias prejudiciais ou benéficas à mesma. Sendo que, as prejudiciais poderiam inibir o crescimento populacional da *Escherichia coli*, enquanto as benéficas poderiam favorecer a sua proliferação, podendo apresentar um desenvolvimento semelhante ou até mesmo maior do que na solução de referência.

- Quanto às soluções de leituras das amostras da planta, teve como objetivo a avaliação antibacteriana nas mesmas, fundamentado na inibição ou na proliferação da bactéria, usada como teste.

Todas as soluções foram preparadas em frascos estéreis distintos. Após a preparação, estas soluções foram submetidas a uma leitura inicial e em seguida foram mantidas no banho termostático a 37 °C durante toda a duração das análises, as leituras foram realizadas no espectrofotômetro UV/VIS BIOSPECTRO ® modelo Sp 220, comprimento de 440 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extratos e frações de *Cyperus rotundus*

A droga vegetal obtida das folhas apresentou-se uma coloração esverdeada, já a dos rizomas apresentou-se uma coloração acastanhada; ambas com um odor aromático característico adocicado. Em seguida, esta passou-se pelo processo de extração, no qual, consiste na retirada de um ou mais constituintes de uma matéria prima natural, com o auxílio de solventes líquidos (SIMÕES, 2017).

Considerando os tipos de extrações existentes, optou-se por uma variação da operação de maceração, a remaceração; na qual a matéria-prima é extraída por um líquido extrator em um recipiente fechado, com a renovação do solvente. O líquido extrator escolhido foi o álcool 70 °GL, para a maior extração de componentes, já que apresenta afinidade com muitos compostos, além de evitar o crescimento microbiano por ser um excelente conservante (SIMÕES, 2017).

O extrato foi mantido sob refrigeração e ao abrigo de luz, para evitar danos por reações de oxidação e hidrólise; ocasionalmente, agitou-se o extrato manualmente para o maior contato com a matriz vegetal. Para não haver a saturação do solvente, houve sua renovação de 3 a 4 dias, sendo este filtrado e posteriormente armazenado sob refrigeração (SIMÕES, 2017). Apesar da massa seca inicial ter sido alta cerca de 300 g, o rendimento foi consideravelmente baixo, mas isso pode ser justificado pela perda durante o processo. O rendimento do extrato e de cada uma das frações encontra-se descrito na tabela 2.

Tabela 2. Quantidade e rendimento dos extratos e frações da *Cyperus rotundus*

	Peso (g)	Rendimento (%)
Folhas		
Extrato bruto etanólico	42,02	14,74
.....		
Fração hexânica	0,243	
Fração diclorometano	1,09	12,20
Fração Acetato de etila	2,84	
Total	4,173	
Rizomas		
Extrato bruto etanólico	49,493	16,49
.....		
Fração hexânica	0,956	
Fração diclorometano	2,96	18,68
Fração Acetato de etila	2,71	
Total	6,626	

Concentrou-se o filtrado por evaporação sob vácuo e a temperatura mais baixa, já que os extratos mostraram-se sensíveis. Obteve-se um extrato bruto etanólico (E.B.E.) semi-sólido espesso. Para conseguir mais seletividade dos compostos químicos no ensaio biológico, realizou-se a etapa de fracionamento com a etapa de partição com os solventes de polaridade crescente (SIMÕES, 2017). As amostras obtidas do fracionamento estão representadas na Figura 7.



Figura 7. Amostras obtidas na etapa de fracionamento. Da esquerda para direita: 1º Fração residual das folhas, 2º Fração de AcOEt das folhas 3º Fração diclorometano das folhas 4º Fração hexânica das folhas 5º Fração hexânica dos rizomas, 6º Fração de diclorometano dos rizomas 7º Fração de AcOEt dos rizomas 8º Fração residual dos rizomas.

4.2. Ensaio antibacteriano

Por apresentar características conhecidas, de fácil cultivo e de baixa patogenicidade quando usada de forma segura, a bactéria *Escherichia coli*, foi escolhida para ser inoculada juntamente com os extratos e frações da planta. Pela recomendação da ATCC, a bactéria foi mantida em banho maria, em torno de 37 ° C, que é a temperatura ideal para sua proliferação.

Tanto o meio de cultura mínimo e as concentrações foram escolhidas com base nos resultados eficazes de trabalhos publicados. De acordo com CAMPOS (2008), o pH do meio mínimo deve ser ajustado para 7,2, pois corre o risco de

interferir no crescimento da bactéria; além disso é estudado o fato do meio mínimo apresenta uma resposta de crescimento microbiano lento, o que justifica o fato da *Escherichia coli* ter apresentado pico maior cerca de 24 horas após a inoculação.

4.3. Sistema FIA

O monitoramento do crescimento bacteriano utilizando sistema de análise em fluxo com detecção espectrofotométrica é baseada na turbidez do meio. Esta técnica estima de maneira indireta a concentração das células, monitorando a dispersão da luz, assim, quanto maior a concentração de bactérias no meio, maior a quantidade de radiação eletromagnética (luz) desviada.

4.4. Testes de toxicidade

4.4.1. Ensaio com o Extrato Bruto das Folhas (EBEF) e dos rizomas (EBER)

No gráfico da Figura 8, pode-se observar que nas primeiras horas houve um crescimento lento na solução de referência em comparação com as soluções das amostras do EBEF, acredita-se que seja em função de uma possível adaptação das bactérias em relação ao meio de cultura, sendo que os compostos químicos do extrato bruto não interferiram no crescimento microbiano em ambas concentrações. Já nos gráficos da Figura 9 dos rizomas, a solução do EBER, quando comparado com a referência, acompanhou o crescimento durante a primeira hora, porém a concentração de 48 mgL⁻¹, inibiu o microrganismo a partir das 2 horas.

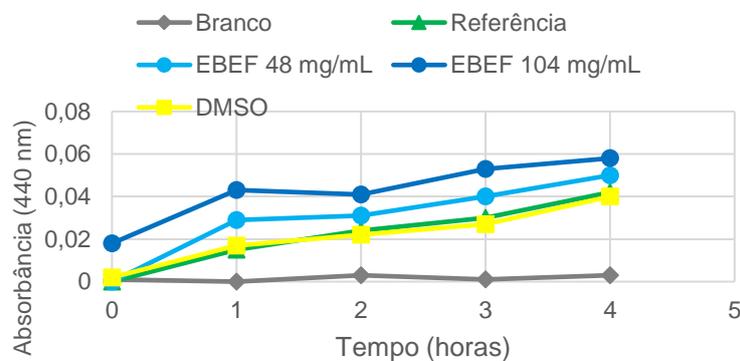


Figura 8. Teste antibacteriano espectrofotométrico com o EBEF das folhas.

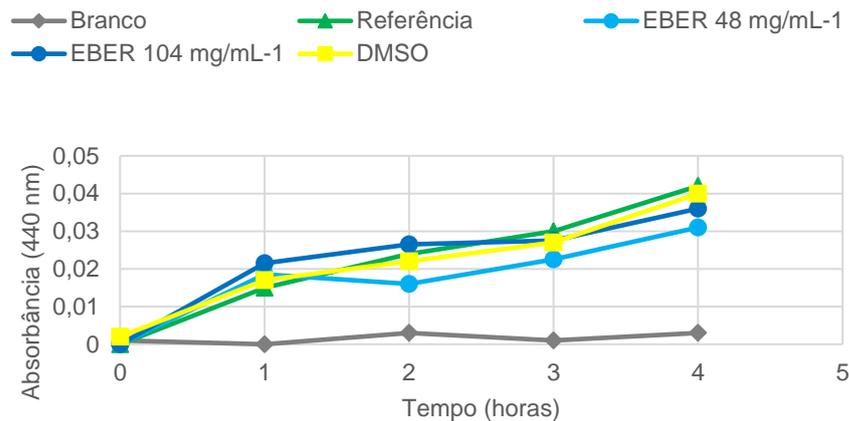


Figura 9. Teste antibacteriano espectrofotométrico com o EBERF dos rizomas.

4.4.2. Ensaio antibacteriano com as frações hexânica e diclorometano dos rizomas

As frações das folhas não inibiram a proliferação do microrganismo, conforme representado na Figura 10, a fração hexânica acompanhou o crescimento da referência, já a fração de diclorometano, apresentou maior absorbância, pode ter tido a interferência da coloração ser maior, pelos resquícios de clorofila. Outro fator provável é a presença de nutrientes da planta para a bactéria.

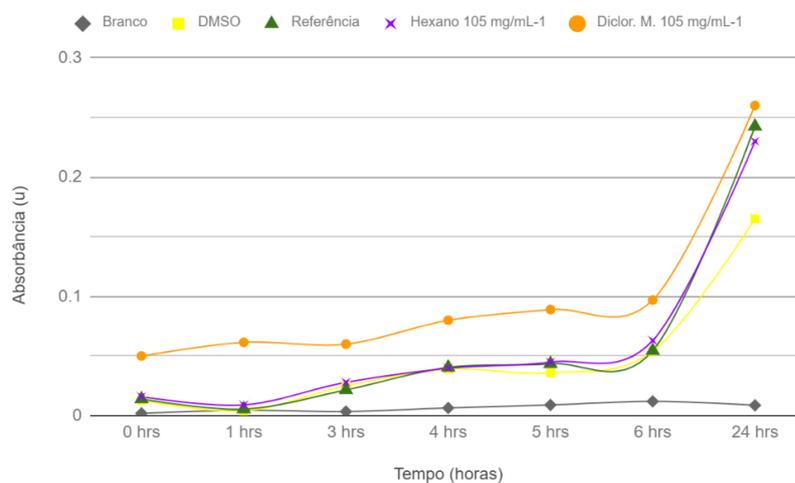


Figura 10. Teste antibacteriano espectrofotométrico com as frações hexânica e de diclorometano das folhas.

Na Figura 11, as frações dos rizomas apresentaram atividade semelhantes até as 6 horas após a inoculação, entre 6 e 24 horas, houve um leve decréscimo na absorbância, porém não se pode confirmar se houve a inibição.

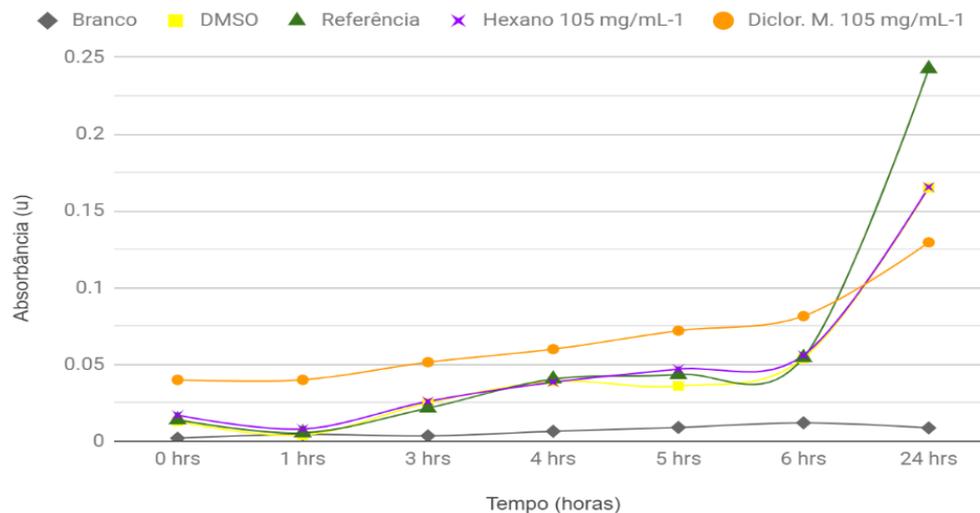


Figura 11. Teste biológico espectrofotométrico com as frações hexânica e de diclorometano dos rizomas.

4.4.3. Ensaio antibacteriano com a fração de acetato de etila das folhas e rizomas

A fração de acetato de etila dos rizomas foi a que mais apresentou atividade antimicrobiana na concentração de 144 mg/mL^{-1} . Percebe-se, na Figura 12, que a partir das 5 horas, a bactéria começa a crescer (Fase log), cerca de 18 horas inicia-se o declínio, indicando que a *Escherichia coli* está desativando. Levanta-se a hipótese novamente, que as folhas fornecem nutrientes para as bactérias pelo fato de nas 24 horas ainda está proliferando.

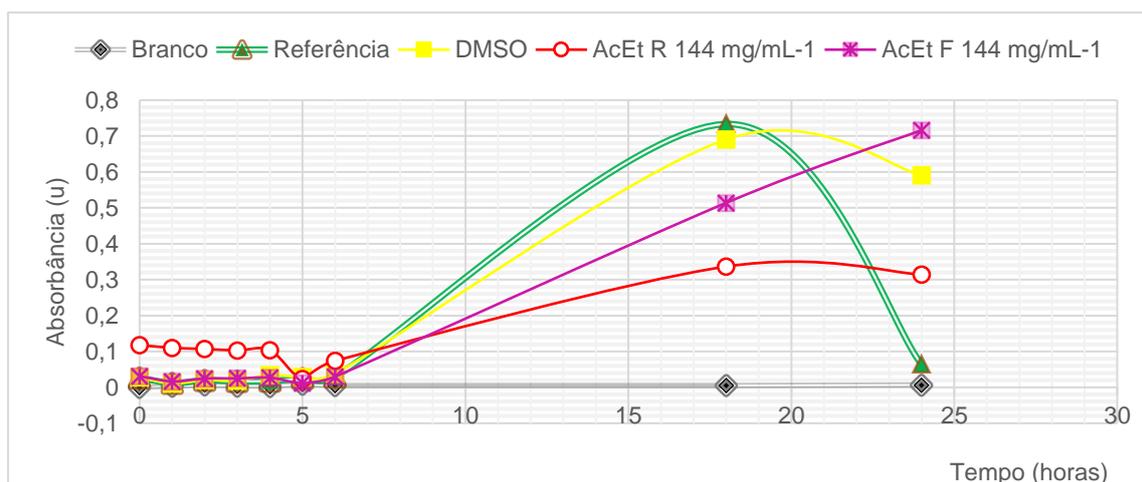


Figura 12. Teste antibacteriano espectrofotométrico com as frações de acetato de etila das folhas (AcOEt F) e dos rizomas (AcOEt R).

5. Considerações finais

No início deste trabalho de pesquisa, evidenciou-se a necessidade do estudo de novos fármacos com potencial atividade antimicrobiana, devido ao aumento da resistência bacteriana aos medicamentos de amplo espectro. Desta forma, partiu-se do fato de que a *Cyperus rotundus*, possui grande capacidade alelopática e diversas atividades farmacológicas, como antioxidante e principalmente antibacteriana. Assim, optou-se por analisá-la frente a *Escherichia coli* utilizando o sistema de injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica.

O sistema de análise por injeção em fluxo mostrou-se uma alternativa prática e eficaz para avaliação antibacteriana, oferecendo dados qualitativos e quantitativos de forma simples, rápida, menos onerosa e eficaz. Tanto, o extrato bruto e as frações dos rizomas da *Cyperus rotundus* apresentou-se potencial em atividade antimicrobiana contra a *E.coli*, sendo que, a fração de acetato de etila na concentração de 144 mg/mL^{-1} inibiu mais a bactéria. Quanto as folhas, quando comparado com os rizomas não apresentou atividade antibacteriana, o que levanta a hipótese de haver, nutrientes que proporcionam a proliferação da bactéria.

Por conseguinte, historicamente a planta analisada tem um vasto potencial farmacológico, que merece ser alvo de novas pesquisas científicas, seja para a aplicação como matéria-prima no desenvolvimento de fitoterápicos,

ou no auxílio na síntese de fármacos. Portanto, a pesquisa deve ser continuada na busca de elucidação de compostos químicos, e na determinação de proteínas e vitaminas.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte dos colaboradores do Centro de Pesquisa e Educação Científica (CEPEC), aos Cursos de Química Industrial e Farmácia, ao Instituto Acadêmico de Ciências Tecnológicas (IACT) da Universidade Estadual de Goiás (UEG), e o apoio financeiro da Coordenadoria Central de Bolsas (CCB) na modalidade de Bolsas de Iniciação Científica (BIC/UEG).

7. Referências bibliográficas

ABO-ALTEMEN, Russell A.; AL-SHAMMARI, Ahmed Majeed; SHAWKAT, Muayed S. GC-MS. Analysis and Chemical Composition identification of *Cyperus rotundus* L. from Iraq. **Energy Procedia**, v. 157, p. 1462-1474, 2019.

AL-SNAFI, Ali Esmail. A review on *Cyperus rotundus*: A potential medicinal plant. **IOSR Journal of Pharmacy**, v. 6, n. 7, p. 32-48, 2016.

ARANTES, Maria do Carmo Batista, et al. Estudo farmacognóstico do *Cyperus rotundus*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, p. 17-20, 2005.

AZANIA, C. A. M. et al. Desenvolvimento da tiririca (*Cyperus rotundus*) influenciado pela presença e ausência de palha de cana-de-açúcar e herbicidas. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 24, n. 1, p. 29- 35, 2006.

BARBOSA, Flávia Silva, et al. Utilização de extratos de tiririca no controle de *Diabrotica speciosa*. **Rev. Bras. de Agroecologia**, v.2, n.2, p.764-767, 2007.

Reis, M.F. Giné, E.A.M. Kronka, A análise química por injeção em fluxo contínuo, **Química Nova**, v. 12, n. 1, p. 82, 1989.

CAMPOS, Natalia Martins. Avaliação da atividade antibacteriana de *Cayaponia Espelina* (Cucurbitaceae), utilizando-se um sistema de análise por injeção em fluxo, 2008.

CHAPINOTTO D.M, et al. Cross-resistance of rice flatsedge to als-inhibiting herbicides. **Planta Daninha**. 2017;35:1-12.

DOS SANTOS, Wallans Torres Pio, et al. Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: Potencialidades e aplicações. **Química nova**, v. 34, n. 10, p. 1753-1761, 2011.

FARAH, Carolina Rittes Turato, *et al.* Teste de toxicidade aguda: monitoração da respiração da bactéria *Klebsiella oxytoca* usando um sistema FIA/Conducométrico. 2001.

FERREIRA, JordanaCatrine Corrêa. Avaliação *in vitro* da atividade anti-inflamatória do óleo essencial de *Cyperus*. Dissertação. Universidade Federal Do Oeste Do Pará. Pró-reitora De Pesquisa, Pós-Graduação E Inovação Tecnológica Programa De Pós-Graduação Em Biociências, 2018.

GOETGHEBEUR, Paul. Cyperaceae. In: **Flowering Plants- Monocotyledons**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 141-190, 1998

JONES, Michael B.; KANSIIME, Frank; SAUNDERS, Matthew J. The potential use of papyrus (*Cyperus papyrus* L.) wetlands as a source of biomass energy for sub-Saharan Africa. **GCB Bioenergy**, v. 10, n. 1, p. 4-11, 2018.

KAMALA, Arunagiri; MIDDHA, Sushil Kumar; KARIGAR, Chandrakant S. Plants in traditional medicine with special reference to *Cyperus rotundus* L.: a review. **3 Biotech**, v. 8, n. 7, p. 309, 2018.

KAPER, James B.; NATARO, James P.; MOBLEY, Harry LT. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature reviews microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123, 2004.

LIMA NETO, G. A *et al.* Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.4, supl. III, p.1069-1077, 2015.

MOREIRA, Bruna CS *et al.* Desenvolvimento de um sistema de análise por injeção em fluxo utilizando materiais alternativos de baixo custo para fins didáticos. **Química Nova**, v. 37, n. 9, p. 1566-1572., 2014.

ROSA, Joice Lara Rosa Lara, *et al.* Características da *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). **Saúde & Ciência em Ação**, v. 2, n. 1, p. 66-78, 2016.

SANTOS, Ana Lúcia Mendes dos. Estudo químico e biológico de *Cyperus rotundus* L. aclimatada no Amazonas. 157 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

SANTOS, A. C. V.; MASINI, J. C. A análise por injeção sequencial (sia): vinte anos em uma perspectiva brasileira. **Quim. Nova**, v. 33, 9, p. 1949, 2010.

SARNO, Ana Rita Ribeiro *et al.* Atividade Hormonal do Extrato de Tiririca na Rizogênese De Ora Pro Nobis. In: **XI Congresso Nacional de Meio Ambiente de Poços de Caldas, 2014 Poços De Caldas (MG)**.

SILVEIRA, H.R.O. *et al.* Alelopatia e Homeopatia no Manejo da Tiririca (*Cyperus Rotundus*). **Planta Daninha, Viçosa-Mg**, v. 28, n. 3, p. 499-506, 2010.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G. *et al.* (Org.) **Farmacognosia: da produto natural ao medicamento**. 7 ed. Porto Alegre: Artemed, 2017.

SINGH, N. *et al.* Phyto-pharmacotherapeutics of *Cyperus rotundus* Linn. (Motha): an overview. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v.3, p. 467-476, 2012.

SIVAPALAN, Sri Ranjani. Medicinal uses and Pharmacological activities of *Cyperus rotundus* Linn—A Review. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v.3, n.5, p. 711-716, 2013.

TOLEDO MA, *et al.* Utilization of a continuous flow system to evaluate the parameters of the baru pulp fermentation process for the production of alcoholic beverage. **International Journal of Development Research**, v. 8, n. 1, p. 18534 – 539, 2018.

TOLEDO, Mônica A, *et al.* “Reuse of sanitizing solution in tomato hygienization (*Lycopersicon esculentum* mill) in industrial kitchens”, **International Journal of Development Research**, v. 9, n. 5, p. 27423-27427, 2019.

TORTORA, Gerard J.; CASE, Christine L.; FUNKE, Berdell R. **Microbiologia-12ª Edição**. Artmed Editora, 2016.

ULGUIM, A.R. *et al.* Resistance Mapping of the Genus *Cyperus* in Rio Grande do Sul and Selection Pressure Analysis. **Planta daninha**, Viçosa, v. 37, p.1-8, 2019.

VIZZOTO, Marcia *et al.* **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. Embrapa Clima Temperado, Pelotas (RS): 2010.

Autores

Bianca de Souza Campos, Geovanna Kelly Chagas, Maria Karollyne Ferreira de Oliveira, Júlio Cezar de Jesus Silva, Viviane Gomes Bonifacio, Giuliana Muniz Vila Verde, Jonas Alves Vieira*

Universidade Estadual de Goiás – Câmpus Central – SEDE-CET Anápolis. Br 153 nº 3.105 - Fazenda Barreiro do Meio - Caixa Postal: 459. CEP: 75.132-903, Anápolis-GO, Brasil. E-mail:jonas@ueg.br.

* Autor para correspondência: jonas@ueg.br.