

Análise da atividade biológica do extrato bruto etanólico dos rizomas da *Cyperus rotundus* , utilizando um sistema por injeção em fluxo contínuo.

Bianca de Souza Campos¹ (IC)*, Geovanna Kelly Chagas¹ (IC), Mateus Lima Ramos¹ (IC) Jonas Alves Vieira¹ (PQ) *bianca7scampos@gmail.com

¹ Universidade Estadual de Goiás – Câmpus de Ciências Exatas e Tecnológicas. Br 153 nº 3.105 - Fazenda Barreiro do Meio - Caixa Postal: 459. CEP: 75.132-903

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, seus rizomas vêm apresentando diversas atividades farmacológicas como: adstringente, diaforético, diurético, aromático, emenagogo, sedativo, vermífugo, tônico e antibacteriano. O objetivo deste trabalho é empregar o sistema de injeção em fluxo contínuo, para analisar o extrato bruto etanólico dos rizomas da planta, inoculado com a *Escherichia coli*, através da detecção espectrofotométrica e condutométrica. Para isso, a amostra dos rizomas da planta passou por uma fase de tratamento, sendo esta submetida à maceração com o etanol, e posteriormente a pressão reduzida, conduzindo ao extrato bruto etanólico (E.B.E). Os testes biológicos foram realizados no sistema em fluxo, com 4 amostras em duplicata, sendo elas : o branco, a referência, o E.B.E com o inóculo na concentração de 48 mg/mL⁻¹ e de 104 mg/mL⁻¹ . As leituras foram feitas em intervalo de 60 minutos durante 5 horas. Os resultados demonstraram que o extrato da planta possui uma leve ação antimicrobiana sobre o inóculo, sendo a produção de metabólitos secundários como os taninos, flavonóides, terpenos e antraquinonas, os principais responsáveis por conferir-lhe propriedades alelopáticas, garantindo assim, sua sobrevivência.

Palavras-chave: Tiririca. *Escherichia coli*. Espectrofotometria. Condutometria. Antimicrobiano.

Introdução

O Brasil é um dos países com maior diversidade genética vegetal do mundo, constituindo-se uma grande base de importação de matérias-primas vegetais, estimando-se cerca de 55.000 espécies catalogadas, que podem apresentar potenciais para a área medicinal, na formulação de um fitoterápico (SIMOES, C. M. O., et al, 2002). A família Cyperaceae Juss. é composta por mais de 5.000 espécies



distribuídas em 104 gêneros. No Brasil ocorrem entre 600 e 700 espécies da família, distribuídas em aproximadamente 44 gêneros. Entre elas encontra-se a espécie *Cyperus rotundus* L. (TREVISAN, Rafael, 2008).

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). 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 (ARANTES, 2005).

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, C.A.M 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. Microscopicamente, observou-se a presença de idioblastos de óleo- resinosos e de amido nos tubérculos (SANTOS, 2014).

É utilizada na alimentação animal, na confecção de utensílios, na indústria têxtil e de uso medicinal (SANTOS, 2014). Os estudos fitoquímicos da *C. rotundus* revelou a presença de flavonóides, taninos, glicosídeos, furocromonas, monoterpenos, sitosterol, alcalóides, saponinas, terpenóides, amido, óleos essenciais, carboidratos, proteínas, aminoácidos separados e outros metabólitos secundários (AL-SNAFI, 2016).

Estes metabólitos presentes na planta podem influenciar nas suas atividades farmacológicas conhecidas popularmente como: anti-inflamatória, antidiabética, antipirética, analgésica, anti-dismenorréia, repelente, entre outros (SINGH, N. et al., 2012). Os rizomas são considerados adstringentes, diaforéticos, diuréticos, aromáticos, emenagogos, sedativos, vermífugos, tônicos e antibacterianos (AL-SNAFI, 2016).



Hodiernamente, o uso indiscriminado de antimicrobianos sofre acréscimos, segundo WANNMACHER L., 2004 calcula-se que 2/3 dos antimicrobianos, são utilizados sem prescrição médica e que de 25 mil toneladas, 50% é usado em animais e na agricultura, e o restante destina-se a antibioticoterapia. Devido ao aumento da resistência dos microrganismos aos fármacos, vem se desenvolvendo novos métodos para analisar a toxicidade de compostos químicos, entre eles encontra-se o sistema por injeção em fluxo.

O sistema de injeção em fluxo é uma técnica analítica na qual uma amostra é introduzida em uma solução transportadora que a leva em direção a um detector, sendo que durante o percurso pode passar por etapas de separação, concentração ou estar apta a reações químicas (B.F. Reis, et al , 1989). É uma técnica inovadora, menos onerosa, rápida e prática para análise de constituintes químicos, sendo munido à adaptações, em suas estruturas, para deixá-lo automatizado ou para adquirir outros tipos de detecção.

Estudos realizados por meio da técnica de disco difusão demonstraram que, os óleos essenciais da planta apresentam, atividade contra a *Escherichia coli*, e contra bactérias gram-positivas (AL-SNAFI, 2016). A *Escherichia coli*, uma bactéria gram-negativa, com morfologia de bastonetes e anaeróbica facultativa, utilizada em experimentos em laboratórios, faz parte da microbiota do trato intestinal, contribuindo para a produção de certas vitaminas e participando da digestão de alimentos. Sendo assim, sua presença na água e nos alimentos é indicativo de contaminação fecal. Entretanto, esta bactéria, possui algumas linhagens patogênicas que causam infecções urinárias (cistite), e produzem toxinas que podem causar gastroenterite, mais comumente conhecida como diarreia dos viajantes (TORTORA G.J et al, 2010).

Torna-se então imprescindível a análise das propriedades biológicas da *C. rotundus* contra estes microrganismos, para isso, foi empregado os testes de toxicidade em um sistema em fluxo contínuo, onde serão usados dois métodos de detecção: o condutométrico e o espectrofotométrico.



Material e Métodos

Na primeira parte do projeto, realizou-se a coleta da *Cyperus rotundus* na Rua Getúlio Dédio de Brito Qd. 23, Lt.19. Residencial Vale dos Sonhos, Goiânia - GO. , em seguida esta passou-se pela fase de pré-tratamento que consistiu na : lavagem, secagem, separação dos constituintes da planta e moagem, obtendo-se assim, a droga vegetal. Com a amostra da planta medicinal fez-se testes qualitativos fitoquímicos de modo a identificar as seguintes classes de metabólitos secundários: antraquinonas, alcaloides, compostos fenólicos, cumarinas, flavonóides, esteroides, saponinas, taninos, e glicosídeos cardioativos.

Posteriormente, a fim de se obter o extrato bruto etanólico, realizou-se a extração pelo método de maceração com o solvente etanol, o extrato foi refrigerado e ao abrigo da luz, onde houve a renovação do solvente de 2 a 5 dias. Em seguida, concentrou-se o extrato, utilizando-se um rotaevaporador, numa faixa de temperatura de 35 °C à 40 °C. A filtração e evaporação do solvente à pressão reduzida, conduziu ao extrato bruto etanólico (E.B.E.).

O sistema de injeção em fluxo empregado no monitoramento de toxicidade, usando a bactéria *E.coli*, foi implementado com detecção condutométrica e espectrofotométrica. Com a aplicação da condutimetria direta, tornou-se possível avaliar a possível toxicidade dos compostos químicos naturais frente o microrganismo. Utilizou-se a água deionizada como solução transportadora das substâncias pelo o percurso analítico do sistema até a sua chegada nos detectores. Usou-se o espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 440 nm, para identificar a turbidez propiciada pela proliferação das bactérias em condições favoráveis.

Para o teste biológico com o E.B.E, preparou-se quatro amostras, a branca, a referência, o E.B.E com o inóculo na concentração de 48 mg/mL e de 104 mg/mL. Primeiramente, dos 49,493 g obtidos do E.B.E, pesou-se 103 mg e diluiu-se em 4 mL de dimetilsufóxido (DMSO), em seguida preparou-se uma solução de 50 mL, com concentração de 2 g.L⁻¹. Para preparar a alíquota E.B.E. 48 mg/mL⁻¹, adicionou-se em um frasco de vidro esterilizado 0,6 mL da referida solução recém-preparada,

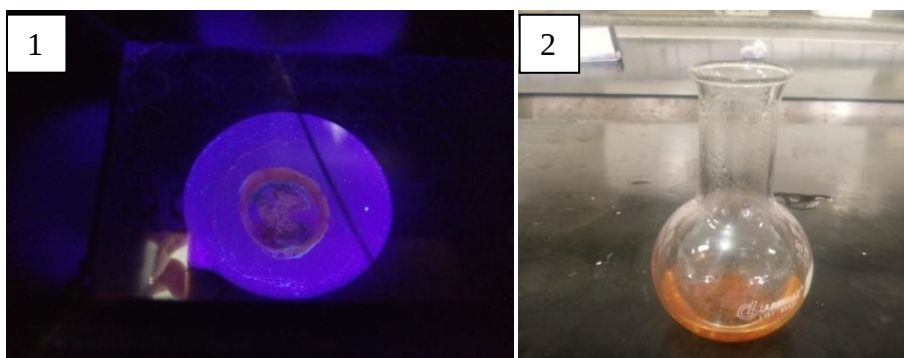
REALIZAÇÃO

24 mL do meio de cultura mínimo e inoculou-se com 0,5 mL de suspensão da bactéria *Escherichia coli*. Para a concentração de 10^4 mg/mL⁻¹ utilizou-se 1,3 mL da solução do E.B.E, 23 mL do meio de cultura e 0,5 mL da suspensão da bactéria. Na preparação do branco da amostra, adicionou-se 25 mL do meio de cultura e a solução a ser usada como referência, foi preparada misturando-se 24,5 mL do meio de cultura com 0,5 mL de suspensão da bactéria *E. coli* sendo essa o controle positivo.

Colocou-se as alíquotas em banho-maria a 37° C para favorecer o desenvolvimento da bactéria. Em seguida leu-se as amostras no sistema de injeção em fluxo, usando-se um espectrofotômetro UV/VIS no comprimento de onda de 440 nm e um condutivímetro. As leituras foram realizadas em intervalos de 60 minutos durante 5 horas, a partir do momento que fora feita a inoculação.

Resultados e Discussão

Com os testes fitoquímicos, foram confirmados a presença de diversos metabólitos secundários de interesse tais como: taninos, flavonóides, alcalóides, saponinas, terpenos, e antraquinonas. Estes compostos contribuem diretamente para a sobrevivência da *Cyperus rotundus*, auxiliando-a no processo de defesa contra outros organismos, na alelopatia, usada na proteção contra raios ultravioletas, na atração de polinizadores ou até mesmo na capacidade de seus tubérculos de ficarem dormentes por longos períodos, e ainda serem os maiores responsáveis pela dispersão da planta (JAKELAITIS A. et al, 2003).



Figuras 1- Reação com cloreto de alumínio sob luz ultravioleta, confirmando a presença de flavonóides pelo aparecimento de fluorescência. Figura 2 - Reação de Stiasny positiva, demonstrando a formação de taninos condensados- flobafenos (precipitado vermelho) após 30 minutos de refluxo com formol e HCl concentrado. Fonte : foto tirada pelo próprio autor, 2018.

Pela análises dos gráficos das Figuras 3 e 4, é perceptível comparando-se a referência com o extrato dos rizomas, que houve uma leve inibição no crescimento do inóculo, principalmente na concentração de 48 mgmL⁻¹. Assim, por conseguinte o equipamento mostrou-se uma alternativa eficaz para a detecção da bactéria. Com o crescimento do microrganismo, ele fermenta-se a glicose presente no meio de cultura, produzindo CO₂, este gás em contato com a água deionizada produziu-se o ácido carbônico:



No sistema, devido a presença de uma membrana de Teflon, a qual o ácido carbônico ao alcançá-la, se dissocia, deste modo os íons H⁺ são detectados pelo condutímetro. Já o espectrofotômetro mediu-se a turbidez propiciada pelo microrganismo, ou seja, quanto mais bactérias presentes no meio mais turva fica a solução e portanto, maior a absorbância.

Figura 3 - Gráfico do teste biológico com o detector espectrofotométrico realizado com o extrato bruto, na concentração de 104 mg/mL⁻¹

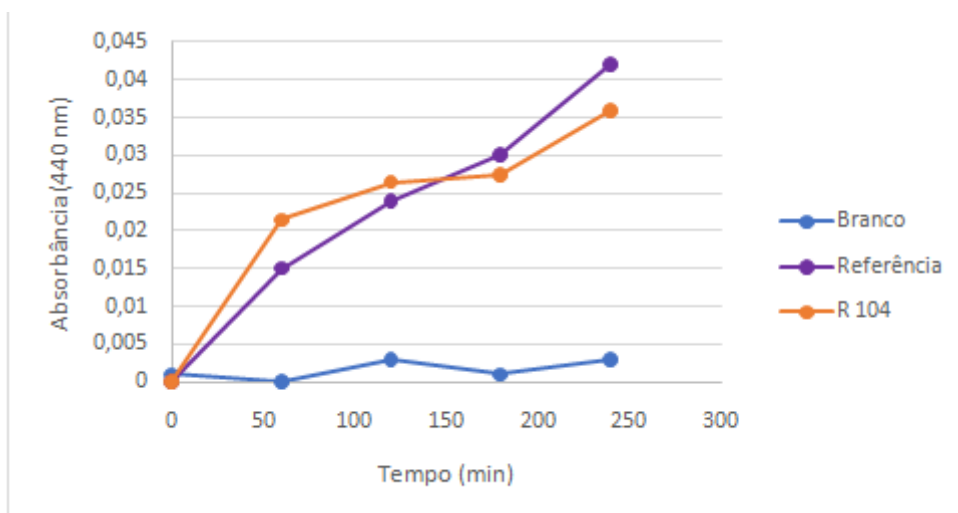
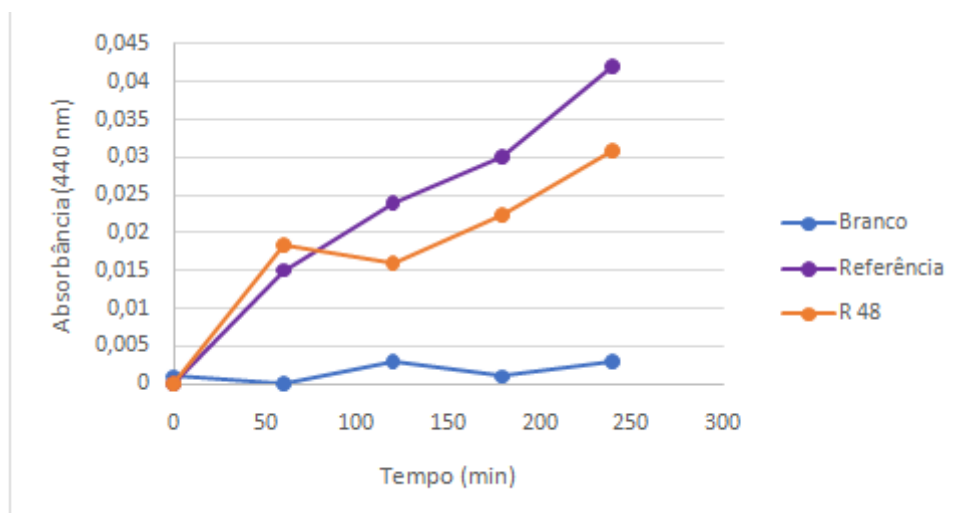
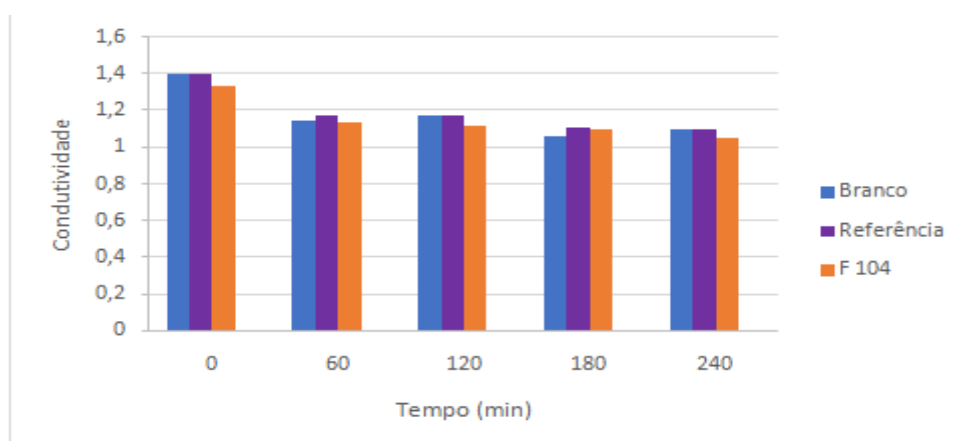


Figura 4 - Gráfico do teste biológico com detector espectrofotométrico realizado com o extrato bruto, na concentração de 48 mg/mL⁻¹.



Conforme a figura 5, a proliferação dos microrganismos não foi o suficiente para gerar um sinal considerável no condutivímetro, a pequena variação ocorrida, é provavelmente causada pela troca da água deionizada ou pela mudança da temperatura ambiente, sendo que alto valor inicial pode corresponder ao tempo de estabilização do aparelho.

Figura 5 - Gráfico do teste biológico com o condutivímetro realizado com o extrato bruto, na concentração de 104 mg/mL⁻¹.





Considerações Finais

O sistema de injeção em fluxo contínuo, foi eficiente na monitoração da proliferação da bactéria e na leve inibição destas pelo o extrato bruto etanólico dos rizomas da *Cyperus rotundus*. Dando seguimento ao projeto, pretende-se realizar os testes biológicos nas frações semi-purificadas de hexano, diclorometano e de acetato de etila inoculada com a *E. coli*. Com a confirmação da presença de metabólitos secundários, como os taninos, os flavonóides, alcalóides, antraquinonas, e terpenos é possível atribuir aos rizomas da *Cyperus rotundus*, uma iminente atividade antimicrobiana e que, a planta tem um vasto potencial farmacológico, que merece ser alvo de novas pesquisas científicas, seja para a aplicação como matéria-prima, no desenvolvimento de um fitoterápico, ou no auxílio para a síntese de novos fármacos.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por me dar forças a medida que os obstáculos surgem. Em segundo a minha família pelo apoio. Agradeço também ao meu orientador pela extrema paciência e comprometimento, aos meus colegas de pesquisa pela companhia e auxílio, à UEG que nestes anos é praticamente a minha segunda casa, e a todos que ajudaram de alguma forma no trabalho. Á todos, meus sinceros agradecimentos.

Referências

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. Estudo farmacognóstico do *Cyperus rotundus*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 2, 2007.

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.



B.F. Reis, M.F. Giné, E.A.M. Kronka, A análise química por injeção em fluxo contínuo, *Química Nova* 1989, 12 (1), 82.

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

SAFADI, Giuliana Muniz Vila Verde; PAULA, Joelma Abadia Marciano de; MORAES, Weuller Filho de. Aulas e Procedimentos de Farmacognosia I e II do curso de farmácia da Universidade Estadual de Goiás. Anápolis, 2016.

SIMOES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Rev. bras. farmacogn.**, Maringá , v. 12, n. 1, p. 35-40, 2002 .

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G. et al. (Org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS Editora., 2007.

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

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

TREVISAN, Rafael; DE ABREU FERREIRA, Pedro Maria; BOLDRINI, Ilsi Iob. A família Cyperaceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 3, 2008.

WANNMACHER L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? **Uso Racional de Medicamentos** 2004; 1(4):1-6.