

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**  
**REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA-RENORBIO**

**Renata Correia Assunção Spósito**

***Cyperus esculentus* L. para obtenção de bioprodutos com aplicação  
biotecnológica**

**SALVADOR-BA**  
**2018**

**Renata Correia Assunção Spósito**

***Cyperus esculentus* L. para obtenção de bioprodutos com aplicação  
biotecnológica**

Tese apresentada à Rede Nordeste de Biotecnologia, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia de Recursos Naturais

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Cristina Pungartnik

**SALVADOR-BA  
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Correia, RENATA CORREIA ASSUNCAO SPOSITO  
Cyperus esculentus L. para obtenção de bioprodutos  
com aplicação biotecnológica / RENATA CORREIA ASSUNCAO  
SPOSITO Correia, Renata Correia, Renata Correia. --  
Salvador, 2018.  
104 f. : il

Orientador: Cristina Pungartnik.  
Tese (Doutorado - Programa de pós-graduação em  
Biotecnologia- RENORBIO) -- Universidade Federal da  
Bahia, , 2018.

1. Cyperus esculentus. 2. antibacteriano. 3.  
antibiofilme. 4. antifúngico. 5. flavonoide. I.  
Correia, Renata. II. Correia, Renata. I. Pungartnik,  
Cristina. II. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

A TESE:

“*Cyperus esculentus* para obtenção de bioprodutos com aplicação biotecnológica”

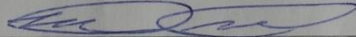
ELABORADA POR:

**RENATA CORREIA ASSUNÇÃO SPÓSITO**

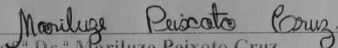
Foi aprovada por todos os membros da banca examinadora e aceita pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Renorbio como requisito parcial à obtenção do título de DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA

Ilhéus, Bahia, 30 de maio de 2018

BANCA EXAMINADORA:



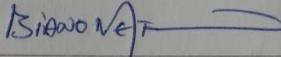
Prof. Dr. Marcelo Franco  
(Presidente da Banca)  
Universidade Estadual de Santa Cruz



Prof.ª Dr.ª Mariluze Peixoto Cruz  
Universidade Federal da Bahia



Prof.ª Dr.ª Sônia Cristina Oliveira Melo  
Universidade Estadual de Santa Cruz



Prof. Dr. Biano Alves de Melo Neto  
Instituto Federal Baiano



Prof.ª Dr.ª Simone Andrade Gualberto  
Universidade Estadual do Sudoeste Baiano

*Dedico à minha família, pilar da minha existência,  
e em especial aos meus filhos, Davi e Antonella,  
fonte de amor e esperança.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço á minha mãe, Ana Maria e meus irmãos, Iara e Júnior, pela confiança, palavras de incentivo e apoio e pelo auxilio incondicional nas atribuições cotidianas, fato que contribuiu significativamente para eu me dedicar ao trabalho.

À Rômulo, companheiro leal, pela confiança, paciência e amor prestado, além do auxilio e incentivo em etapas importantes do doutorado.

Aos meus filhos, Davi e Antonella, que preencheram a minha vida de ternura e amor, me fortalecendo e fazendo olhar para a vida com esperança.

Aos amigos e familiares pela lealdade, confiança e apoio, aguardando com paciência e amor a finalização dessa jornada.

Aos colegas de trabalho da Universidade Estadual do sudoeste da Bahia-UESB, Anderson, Dirceu e Roberta, pelo companheirismo e amizade, e em especial às amigas Gabriele e Regineide, que reconheço com muita gratidão o apoio, incentivo e auxílio na execução das atividades que permitiram a finalização deste trabalho.

À UESB pela concessão do afastamento para a realização do doutorado, bem como a disponibilização da infraestrutura necessária para execução deste trabalho.

Ao Laboratório de Produtos Naturais-LAPRON/UESB e ao Laboratório de Fungos-LBF/UESC pela disponibilização de material e infraestrutura que auxiliaram na realização de etapas importantes.

Ao Instituto Federal Baiano/Campus Itapetinga-Ba por permitir o acesso ao campus e auxílio na coleta do material botânico.

À orientadora, Cristina, pela credibilidade e apoio, tornando possível a finalização deste trabalho.

A Deus pelas oportunidades de aprendizado e crescimento moral e intelectual, reconhecendo com gratidão as tristezas e alegrias vividas neste período, com a certeza de que a vida nos oferece o que é necessário para nos tornarmos pessoas melhores.

*“Hoje eu vou falar com alma  
Hoje eu vou calar uma canção  
Onde há pressa eu peço calma  
Onde há dor meu choro é de emoção  
Aprendi que amar a vida  
É o amor dos pais, amor de irmão  
É o remédio pra qualquer ferida  
É alegria em qualquer situação  
Raiou o Sol de Hiroshima de uma vez  
E despertou também meu coração  
Da pra entender quem perde tudo de uma vez  
Acha que o mundo não tem solução  
Mas olha o sol de Hiroshima o que ele fez  
Brilhou mais forte que a escuridão  
Se agora eu caio me levanto de uma vez  
Eu não desisto não”*

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi identificar as propriedades antimicrobianas de *Cyperus esculentus* e determinar seu perfil fitoquímico. O capítulo 1 traz um estudo prospectivo sobre potencial biológico da espécie realizado através da busca de anterioridade de patentes. O capítulo 2 refere-se à atividade biológica de *C. esculentus* e seu perfil fitoquímico. Os ensaios biológicos revelaram que o extrato bruto e as frações possuem ação antimicrobiana, sendo a fração acetato de etila (CEL4) a que apresentou melhores resultados frente à atividade antibacteriana e antibiofilme, especialmente contra *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os testes fitoquímicos do extrato bruto apresentaram resultados positivos para compostos fenólicos, esteroides e triterpenos, e avaliação da fração CEL4 evidenciou a presença flavonoides. Os dados apontam a espécie como fonte de bioativos antibacteriano, sugerindo que atividade antimicrobiana está associada à classe dos flavonoides. O capítulo 3 apresenta o potencial antifúngico da espécie e mostra que a CEL4 também exibiu efeito contra fungos fitopatogênicos com inibição do crescimento de *Moniliophthora perniciosa* e *Aspergillus niger*. O capítulo 4 apresenta pedido de patente relacionado a produto antimicrobiano intitulado “Composição oriunda de *Cyperus esculentus* L. com atividade antibacteriana e antibiofilme” e o capítulo 4 pedido de patente intitulado “Composição herbácea oriunda de *Cyperus esculentus* L. com atividade antifúngica contra fitopatógenos”. Sendo assim, este trabalho mostrou que *C. esculentus* possui potencial para o desenvolvimento de produtos antibacteriano e fungicida, e sugere a necessidade de aprofundar estudos sobre mecanismos de ação e caracterização química da fração ativa.

Palavras-Chave: *Cyperus esculentus*, antibacteriano, antibiofilme, antifúngico, patente, flavonoides



## ABSTRACT

This study aimed to identify the antimicrobial properties of *Cyperus esculentus* and to determine its phytochemical profile. Chapter 1 presents a prospective study on the biological potential of the species carried out through the search of priority patents. Chapter 2 refers to the biological activity of *Cyperus esculentus* and its phytochemical profile. Biological assays showed that, both crude extract and fractions have antimicrobial activity, and ethyl acetate fraction (CEL4) was the one that presented the best results against antibacterial activity and antibiofilm, mainly against *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*. Phytochemical tests of the crude extract showed positive results for phenolic compounds, steroids and triterpenes, and evaluation of the CEL4 fraction evidenced the presence of flavonoids. Data indicate the species as a source of antibacterial bioactives, suggesting that antimicrobial activity is associated with the class of flavonoids. Chapter 3 shows the antifungal potential of the species and shows that CEL4 also exhibited an effect against phytopathogenic fungi with inhibition of growth of *Moniliophthora perniciosa* and *Aspergillus niger*. Chapter 4 presents patent application concerned to antimicrobial product entitled "Composition from *Cyperus esculentus* L. with antibacterial activity and antibiofilm" and Chapter 5 patent application entitled "Herbaceous composition derived from *Cyperus esculentus* L. with antifungal activity against phytopathogens". Thus, this work showed that *C. esculentus* has potential for the development of antibacterial and fungicide products, and suggests the need to undertake more research on mechanisms of action and the chemical characterization of the active fraction.

Key words: *Cyperus esculentus*, antibacterial, antibiofilm, antifungal, patent, flavonoids.

## SUMÁRIO

1. Introdução-----	11
2. Objetivos-----	13
2.1. Objetivo geral -----	13
3.2. Objetivos específicos -----	13
3. Revisão de Literatura-----	14
3.1. Características gerais de <i>Cyperus esculentus</i> L.-----	14
3.2. Plantas: fonte promissora de bioprodutos-----	15
3.3. Bactérias patogênicas e a saúde humana: preocupações advindas da resistência bacteriana-----	17
3.4. Fungos fitopatogênicos-----	22
4. Referências -----	25
Capítulo 1-----	33
Prospecção tecnológica da espécie <i>Cyperus esculentus</i> L.: um panorama sobre a produção científica e tecnológica-----	34
Capítulo 2-----	46
Atividade antimicrobiana e o potencial antibiofilme de <i>Cyperus esculentus</i> L.-----	47
Capítulo 3-----	67
Potencial antifúngico de <i>Cyperus esculentus</i> L. contra fitopatógeno---	68
Capítulo 4-----	82
Composição oriunda de <i>Cyperus esculentus</i> L. com atividade antibacteriana e antibiofilme-----	83
Capítulo 5-----	92
Composição herbácea oriunda de <i>Cyperus esculentus</i> l. com atividade antifúngica contra fitopatógeno-----	93
Anexo-----	101
Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT-----	102
Esquema sobre o fracionamento do extrato-----	104

## 1. INTRODUÇÃO

*Cyperus esculentus* L. trata-se de uma planta invasora com grande importância econômica, em consequência do impacto negativo em culturas agrícolas. Apesar de ser considerado como planta infestante, o *C. esculentus* pode ser empregado como produto alimentício devido ao seu valor nutricional e energético e também tem sido utilizada pela medicina popular (Matos et al., 2008; Arafat et al., 2009)

De acordo com Castro *et al.* (2005), os vegetais são capazes de produzir uma enorme variedade de metabolitos secundários, muitos dos quais possuem importantes atividades biológicas. Estes compostos fazem parte de grupo diversificado de moléculas que possuem atividades biológicas envolvidas nos mecanismos de adaptação da planta a seu meio e não apresentam funções diretamente relacionadas ao crescimento e desenvolvimento da planta, como é visto nos metabolitos primários. Contudo, na maioria das vezes, apresentam muitas propriedades atividade farmacológica de interesse ao ser humano (Dash et al., 2011).

Sendo assim, compostos advindos das plantas podem ser aplicados no controle de microrganismos patogênicos, uma vez que são capazes de inibir o seu crescimento ou matá-los, além de apresentar toxicidade mínima para as células hospedeiras e são considerados importantes para o desenvolvimento de novos antimicrobianos (Askari et al., 2012).

A resistência bacteriana é uma das principais causas de emergência das doenças infecciosas e do aumento da morbidade, mortalidade e custos em saúde, decorrentes da redução das opções terapêuticas eficazes contra os microrganismos resistentes (Silva, 2009). O controle das doenças provocadas por fitopatógenos também tem enfrentado desafios, pois o combate é realizado basicamente através do emprego de produtos sintéticos (Venturoso et al., 2010) e que provocam diversos problemas ao ambiente, como a contaminação de águas, solos, animais, alimentos e à saúde humana, além de favorecer a resistências desses microrganismos (Bigaton et al., 2013)

Pesquisas envolvendo compostos de origem vegetal com potencial contra microrganismos tem grande abrangência para a descoberta de novos agentes antimicrobianos (Barbosa-Filho et al., 2007; Miranda, et al. 2015). Estudos que visam à descoberta de novas drogas com potencial antibacteriano são necessário devido ao

surgimento de microrganismos resistentes e de infecções oportunistas fatais (Elisha et al., 2017). A exploração da atividade biológica de compostos secundários de plantas pode se constituir uma alternativa para reduzir com segurança o uso de defensivos no controle de fitopatógenos (Bigaton et al., 2013)

Nesse sentido, considerando o potencial de espécies vegetais para a descoberta de novos agentes antimicrobianos, a investigação da atividade biológica de *Cyperus eculentus* traz possibilidades de encontrar uma nova fonte de bioprodutos, uma vez que o uso de produtos naturais vem contribuindo para resultados relevantes em tratamentos terapêuticos (Figueredo et al., 2013) e no controle de fitopatógenos (Boutefas et al., 2016). Além disso, a utilização de bioativos oriundo desta espécie pode ser uma alternativa promissora no combate a microrganismos patogênicos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- Avaliar o perfil fitoquímico e o potencial antibacteriano, antibiofilme e antifúngico do extrato bruto e frações do *Cyperus esculentus*.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Realizar análise fitoquímica do extrato bruto e frações do *Cyperus esculentus*;
- Verificar o efeito do extrato bruto e frações do *Cyperus esculentus* sobre o crescimento de bactérias patogênicas e a formação de biofilme;
- Avaliar o potencial da fração ativa sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Características botânicas de *Cyperus esculentus* L.

A espécie *Cyperus esculentus* L. está entre os representantes da família Cyperaceae e é conhecida pelos nomes vulgares de tiririca, tiririca-amarela, tiririca-mansa, junça, chufa, amendoim, amêndoa da terra, castanhas (Lorenzi, 2008; Ayeh-Kumi et al., 2014). Caracteriza-se como uma pequena erva graminóide perene, ereta, com caule de seção triangular, sem ramificação ou nós, glabro, com 20 a 90 cm de altura (Lorenzi, 2008). Possui inflorescência com espigas que apresentam cor amareladas antes da maturação. O sistema subterrâneo caracteriza pela formação de um bulbo na base da planta, do qual se projeta rizomas, cujos comprimentos podem ser curtos ou atingir 60 cm. Alguns rizomas podem formar um novo bulbo basal na sua extremidade e outros podem originar um tubérculo terminal cessando o crescimento do rizoma (Figura 01) (Kissmann, 1997).

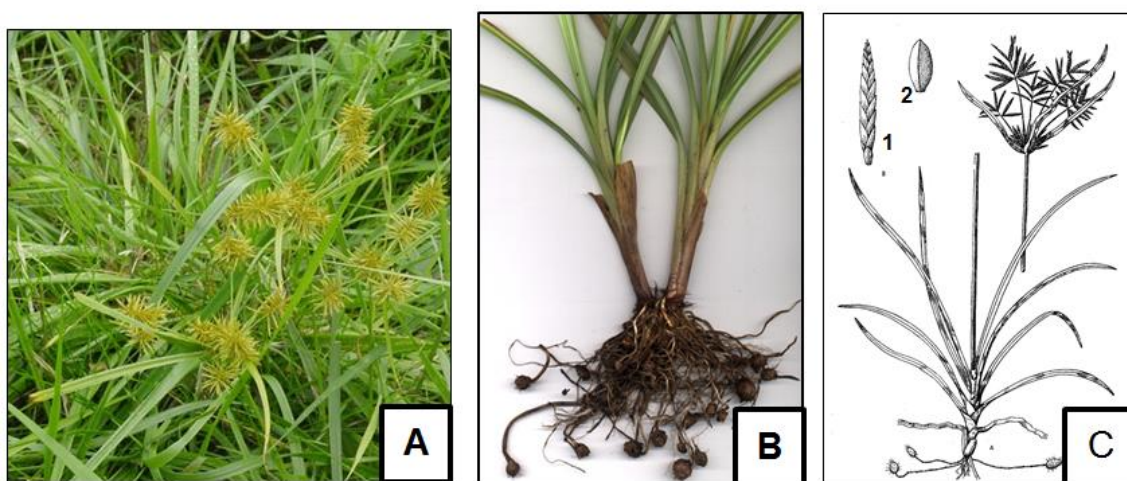


Figura 01: Inflorescência (A), sistema subterrâneo (B), espigueta (C1), e núculas (C2) de *Cyperus esculentus* L. (Foto adaptado de Kissmann (1997)).

*C. esculentus* trata-se de uma espécie exótica oriunda do Mediterrâneo e sudoeste da Ásia, com ampla distribuição (Holm et al.; 1991; Follak et al.; 2016), e se enquadra como uma das piores plantas invasoras no cenário mundial (Mello, 2003). Devido a sua reprodução quase exclusivamente vegetativa e a liberação de compostos fenólicos com efeitos alelopático, apresenta capacidade competitiva que torna difícil o controle da espécie, acarretando impactos negativos a culturas agrícolas (Oliveira Jr et al. 2011).

Follak et al. (2016) relatam o impacto que *C. esculentus* provoca em áreas cultivadas em regiões da Europa e Estados Unidos, com perdas na produtividade, entretanto, revela que essa espécie é cultivada, devido aos seus tubérculos em áreas tropicais e subtropicais em todo o mundo. O cultivo é extensivo na África, Ásia e alguns países europeus devido ao sabor adocicado dos tubérculos (Bado et al., 2015).

Os tubérculos são ricos em amido (42%), óleo (30%), açúcar (20%) e proteína (9%) (Jing et al., 2016) e tradicionalmente tem inserção na cultura popular (Kissmann, 1997). Na África são consumidos in natura (Bado et al., 2015), no continente americano é utilizados como ração animal, inclusive no Brasil, (Sánchez-Zapata et al., 2012). Já na Europa é culturalmente utilizado para preparar uma bebida com características refrescante e nutritiva chamada “horchata de chufa” (Hernández-Martínez et al., 2017).

### **3.2. Plantas: fonte promissora de bioprodutos**

As plantas produzem uma larga e diversa quantidade de constituintes químicos, divididos em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários possuem função estrutural, plástica e de armazenamento de energia, como aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos. Os metabólitos secundários, produtos secundários ou produtos naturais, aparentemente não possuem relação com o crescimento e desenvolvimento da planta e têm a função de proteger as plantas contra herbívoros e patógenos, servem como atrativos (aroma, cor, sabor) para polinizadores e, ainda, funcionam como agentes de competição entre plantas e de simbiose entre plantas e microrganismos (Taiz; Zeiger, 2009).

A prospecção de metabólitos secundários que, no ambiente natural, atuam na defesa de vegetais, tem sido um método bastante explorado, pois constituem uma rica fonte de princípios bioativos. Estas substâncias podem exercer efeitos biológicos diversos (Sato; Kumagai, 2013). Estes estudos podem fornecer subsídios para a descoberta de bioprodutos, que preenchem os requisitos de eficácia, segurança e seletividade (Viegas Jr. 2003).

O fato de várias substâncias extraídas dos vegetais apresentarem aplicabilidade na saúde humana tem estimulado o desenvolvimento do estudo químico de muitas plantas com potencial medicinal (Niero, 2010). O estudo dos constituintes químicos bioproduzidos pelo metabolismo secundário dos organismos vivos proporciona a

descoberta de diversas substâncias orgânicas, com atividades biológicas, que dependem da investigação farmacológica (Yunes; Cechinel Filho, 2010).

Neste sentido, a biotecnologia e a fitoquímica, podem ser implementadas de modo sinérgico para obter resultados que favoreçam a utilização de bioativos de origem vegetal. Desoti et al. (2011) sugerem que novos estudos devem ser realizados, a fim de isolar os constituintes fitoquímicos responsáveis por tal atividade, por meio do fracionamento biomonitorado destes extratos, visando melhorar a seletividade destes produtos e, conseqüentemente, o uso racional como recurso terapêutico.

Várias propriedades terapêuticas já foram atribuídas aos metabólitos secundários, dentre elas, antipiréticos, anti-inflamatórios, hematológicos, antifúngicos, antivirais, antitumorais, antifertilidade, agente hipoglicemiante. Essas propriedades estão relacionadas a alguns compostos como ácidos fenólicos, taninos, flavonóides,  $\beta$ -sitosterol, alcanos, carboidratos, esteroides, álcoois graxos e ácidos (Kumar et al., 2010; Ashok et al. 2011).

Os flavonoides têm sido muito estudados devido às suas inúmeras atividade biológicas, (atividade antioxidante, anticarcinogênica, antimicrobiana, ação antiinflamatória e antialérgica) (Zuanazzi, 2000), que lhes permitem atuar em sistemas biológicos e assim favorecer a saúde humana (Peterson et al., 1998). Pesquisas apontam que muitos flavonóides isolados de diferentes plantas apresentam atividade antimicrobiana *in vitro* (Kotkar, et al., 2002; Panizzi et al., 2002; ). Essa atividade deve-se, provavelmente, à sua capacidade em formar complexos com proteínas solúveis e com a parede celular das bactérias e fungos (Orhan et al., 2010; Arif et al., 2011).. Os flavonóides lipofílicos também podem romper a membrana microbiana (Arif et al., 2011; Salas et al., 2011).

Os flavonóides são compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário e compreendem uma das maiores classes de produtos naturais, juntamente com isoprenóides e alcaloides. São encontrados em diferentes órgãos das plantas como nos frutos, onde são particularmente abundantes (Zuanazzi; Montanha, 2007). Pode ser encontrado em diversas formas estruturais, entretanto a maioria tem esqueleto de carbono contendo 15 carbonos organizados em dois anéis aromáticos ligados por uma cadeia de três carbonos, estrutura resultante de duas rotas biossintéticas, a rota do ácido chiquímico e a do ácido malônico (Taiz; Zeiger, 2004). Os compostos tricíclicos são



constituídos por três anéis e as unidades são chamadas núcleos A, B, C. O primeiro anel benzeno (Anel A) é condensado com o sexto carbono do terceiro anel (Anel C), que na posição 2 carrega um grupo fenil como substituinte (Anel B). Devido ao fato deste terceiro anel apresentar-se na forma de um anel pirona é responsável pela formação da maioria das diferentes classes destes compostos (Sandhar et al. 2011). As suas principais classes são: flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanas, isoflavonoides e antocianinas (Bhagwat, 2011).

O esqueleto de carbono dos flavonoides pode ter vários substituintes. Os grupos hidroxilas estão normalmente presentes nas posições 4, 5 e 7, mas podem ser encontrados em outras posições. Os açúcares são também muito comuns, a maioria dos flavonoides ocorre naturalmente como glicosídeos. Os grupos hidroxila e açúcares aumentam a solubilidade em água, e outros grupos como éteres metílicos ou unidades de isopentil modificadas, tornam os flavonoides lipofílicos (Taiz; Zeiger, 2004).

Os flavonoides constituem um grupo de pigmentos vegetais de ampla distribuição na natureza e conferem às plantas proteção contra raios ultravioletas, fungos, bactérias e ainda tem efeito na atração de polinizadores (Zuanazzi; Montanha, 2007). Apresenta alto potencial com antioxidante devido sua capacidade de estabilizar radicais livres e espécies reativas de oxigênio (Mamat et al., 2013). A diversidade funcional dos flavonoides tem influenciado diversas pesquisas que visam à utilização terapêutica deste composto.

### **3.3. Bactérias patogênicas e a saúde humana: preocupações advindas da resistência bacteriana**

As infecções bacterianas têm tido um papel marcante na história da humanidade, diversos agentes bacterianos têm sido responsáveis por doenças endêmicas e epidêmicas e têm provocado efeitos devastadores sobre a população. Intervenções antrópicas associadas ao potencial de mudanças na estrutura genética das bactérias têm atuado de forma sinérgica, favorecendo o surgimento de bactérias de maior patogenicidade ou dotadas de resistência aos recursos tecnológicos disponíveis (Trabulsi, 2008).

A descoberta de antibióticos eficientes no tratamento de infecções bacterianas proporcionou um grande avanço na medicina reduzindo consideravelmente o número de mortes causadas por doenças infecciosas. Entretanto, o aumento crescente do uso de

antibióticos tem potencializado a seleção de cepas de bactérias resistentes a esses medicamentos (Silveira et al., 2006).

As bactérias apresentam uma enorme capacidade de adaptação ao meio ambiente, podendo se tornar resistentes a determinada droga. De modo geral, as bactérias são classificadas como resistente quando são capazes de multiplicarem-se, *in vitro*, na presença de concentrações de antimicrobianos mais altas que as administradas em uso clínico. Trata-se de um processo biológico natural que surgiu com a utilização desses fármacos no tratamento de infecções (Wannacher, 2004; Trabulsi, 2008). Os mecanismos de resistência bacteriana estão relacionados à produção de enzimas que modificam a molécula do antibacteriano tornando-o inativo; diminuição da entrada do antibacteriano; alteração do alvo; síntese de novas enzimas que não sofrem ação do antibacteriano e sua expulsão da célula (Kumar e Varela, 2013).

A utilização clínica de antimicrobianos melhorou o prognóstico das doenças infecciosas, porém, o uso crescente e indiscriminado é considerado o principal fator relacionado com a emergência de cepas microbianas resistentes. Fatores relacionados à utilização desses fármacos, de forma profilática quanto empírica, doses subterapêuticas e duração prolongada, são equívocos comuns que resultam em seleção bacteriana e aumento da resistência (Carneiro et al., 2011). A resistência bacteriana a antibióticos tornou-se um grande problema de saúde pública em escala mundial. Neste contexto, destaca-se as infecções hospitalares que estão associadas à falhas nos procedimentos de biossegurança, ineficiência dos controles microbiológicos e de vigilância de pacientes sob suspeita ou risco de infecção (Ferracini et al., 2014). Este cenário contribui para o aumento da morbidade, mortalidade, prolongamento do tempo de internação e elevação dos custos do tratamento. Nas UTI, o consumo excessivo de antibióticos favorece a seleção de muitos patógenos multirresistentes (Paim; Lorenzeni, 2014).

Aproximadamente 60 a 70% das infecções nasocomiais estão associadas ao uso de vários tipos de dispositivos médicos com superfícies contaminadas por bactérias patogênicas (Bryers, 2008). Microrganismos que formam biofilme podem estar relacionada a mais de 65% de todas as infecções médicas (endocardite, otite, prostatite, periodontite, conjuntivite, vaginite e infecções relacionadas à fibrose cística), pois são

importantes colonizadores de uma ampla variedade de dispositivos, como cateteres e próteses (Wojtyczka et al., 2014)

Biofilmes podem ser definidos como comunidades multicelulares, imobilizadas por uma matriz polimérica extracelular produzida pela bactéria, que pode se aderir a várias superfícies bióticas e abióticas. A estrutura é tridimensional e composta de 85% de matriz extracelular (polissacarídeos, proteínas, enzimas, DNA, glicolipídios bacterianos, água) e 15% de agregados de células (Isano et al., 2008; Otto et al., 2009). A formação de biofilme, um dos fatores de virulência bacteriana, geralmente está diretamente relacionado com mecanismos de resistência (Chessa et al., 2015) e a uma variedade de infecções crônicas (Otto, 2011). O mecanismo de formação envolve adesão na superfície, produção da matriz extracelular, formação de colônias e dispersão do biofilme (Abdalla et al., 2014).

O estabelecimento do biofilme favorece os mecanismos de defesa bacteriana dificultando a difusão de antibióticos, com diminuição da taxa metabólica e alterações fisiológicas relacionadas ao crescimento microbiano (Oliveira et al., 2006). A dificuldade de erradicação de biofilmes aumenta à medida que as bactérias são incorporadas em uma substância polimérica autoproduzida, fornecendo baixa suscetibilidade a agentes antimicrobianos convencionais e hospedando células de defesa do sistema imunológico, resultando em infecções crônicas (Kumar et al., 2013; Papa et al., 2015).

Para combater infecções mediadas por biofilmes são necessárias novas estratégias. Uma alternativa promissora é a busca por compostos de origem vegetal capazes de bloquear a sua formação (Sanchez et al., 2016). Várias pesquisas apontam resultados promissores de metabolitos secundários com ação antimicrobiana (Dakook et al., 2016; Muthu et al., 2014) e antibiofilme (Trentin et al., 2011; Al-Dhabi et al., 2015).

Dentre os microrganismos que podem participar de processos de adesão, com formação de biofilme e podem gerar problemas de saúde pública ou de ordem econômica, destaca-se *Pseudomonas aeruginosa* (Artini et al., 2018), *Staphylococcus epidermidis* (Helmark et al., 2013), *Staphylococcus aureus* (Kipre et al., 2017).

*P. aeruginosa* é uma das principais bactérias causadoras de infecções adquiridas em ambientes hospitalares, sendo responsável por aproximadamente 10% de todas as

infecções nasocomiais em todo o mundo (Chatterjee et al., 2016). Esta bactéria apresenta isolados clínicos multirresistentes que estão ligados a elevados índices de morbidade/mortalidade. A disseminação clonal tem sido responsável pelo surto de infecção desta bactéria no Brasil (Neves, 2011)

*P. aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa, móvel, em forma de bastonete, medindo cerca de 0,6 x 2,0mm. Possui ampla dispersão na natureza, particularmente em ambientes úmidos, e se adapta facilmente ao solo, pântanos, plantas e tecidos animais (Magigan et al., 2012). Tem capacidade de sobreviver em materiais inertes formando biofilmes, sendo capaz de se aderir a diversos tipos de superfícies contaminando equipamentos, utensílios hospitalares e dispositivos médicos internos (cateteres, sondas).

Devido a sua diversidade metabólica e a capacidade de formar biofilme, a *P. aeruginosa* se caracteriza como um patógeno oportunista causador de infecções principalmente em pacientes com sistema imunológico comprometido e também pelo desequilíbrio da flora devido ao uso de antibióticos de amplo espectro (Zhao et al., 2010; Abdelghany, 2012).

Além da resistência a antibióticos, outro aspecto que torna difícil o controle das infecções causados pela *P. aeruginosa*, são os seus inúmeros fatores de virulência. Dessa forma, pesquisas que visam à descoberta de novos agentes antimicrobianos são necessárias a fim de combater microrganismos resistentes, e conseqüentemente, infecções oportunitas. Neste sentido, estudos têm sido direcionados para a descoberta de produtos com efeito antimicrobiano, com menor toxicidade e que seja mais eficaz contra a capacidade de resistência e com menor impacto ambiental (De Bona et al. , 2014).

O gênero *Staphylococcus* é também é responsável por um grande número de infecções bacterianas que afeta a saúde humana e é dividido em dois grandes grupos, classificados de acordo com a produção da enzima coagulase. São conhecidos como estafilococos coagulase-positiva, sendo representado, principalmente, pelo *Staphylococcus aureus*, e o grupo estafilococos coagulase-negativa, que é compreendido por várias espécies, dentre elas *S. epidermidis* (Martins; Cunha, 2007). Os fungos desse gênero fazem parte da microbiota normal do corpo humano, e pode ser encontrado em várias partes do corpo (fossas nasais, mãos, garganta, intestinos, sendo

as fossas nasais o principal reservatório da bactéria). As infecções podem ser causadas por bactérias do próprio indivíduo (infecções endógenas) ou por amostras adquiridas de outros doentes ou portadores sadios (infecções exógenas) (Pereira et al., 2009)

*S. aureus* é uma das bactérias patogênicas mais importantes e atua numa gama de infecções que varia no índice de gravidade (Magigan et al., 2016). É responsável por vários tipos de infecções, tais como endocardites, pneumonias e septicemias. É uma das espécies bacterianas mais comuns e a mais virulenta do gênero. A disseminação endógena desta bactéria é a mais comum, sendo responsável por muitas das infecções nasocomiais, resultado da presença de estafilococos na pele e na nasofaringe de 15% dos indivíduos saudáveis (Murray, 2009). Trata-se de uma bactéria Gram-negativa e tem aproximadamente 0,5 a 1,5µm de diâmetro, imóveis, não esporulados. Podem apresentar diversos arranjos, que vão desde isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados irregularmente (com aspecto semelhante a um cacho de uvas) (Magigan et al., 2016).

Atualmente mais de 90% das cepas de *Staphylococcus aureus* são resistentes à meticilina, penicilina, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosaminas e até outros beta-lactâmicos (Boscariol et al., 2018). Cepas com resistência múltipla são mais comuns em ambiente hospitalar e provocam problemas clínicos e epidemiológicos, limitando as opções terapêuticas e prolongando o tempo de tratamento (Arantes et al., 2013). As implicações médicas desse patógeno também estão relacionadas às infecções causadas por biofilmes associadas a dispositivos médicos (McCarthy et al., 2015).

Lima et al. (2015) destaca que o surgimento de microrganismos cada vez mais resistentes, principalmente os encontrados na microbiota hospitalar; como é o caso do *S. aureus*, é motivo de preocupação, e ressalta a importância do investimento nas pesquisas tanto sobre a prevalência das infecções nosocomiais por este agente, quanto para a descoberta de novas estratégias terapêuticas e novos antibióticos.

Além do *S. aureus*, *S. epidermidis* também gera impactos negativos na saúde pública. É caracterizado como uma bactéria Gram-positiva arranjada em cachos e tétrades (Magigan et al., 2012). Essa espécie trata-se de um importante patógeno oportunista e tem atraído grande interesse nos últimos anos, pois se tornou a causa mais importante de infecções nosocomiais (Otto, 2011). Apesar de ser uma espécie muito comum da microflora cutânea, de natureza geralmente inócua, está sendo

frequentemente associado a infecções hospitalares (Cogen et al., 2008). As principais doenças causadas por *S. epidermidis* estão associadas ao uso de dispositivos médicos implantados (cateteres e próteses), como endocardites, meningites, infecções do trato urinário, dentre outras (Trabulsi, 2008).

O sucesso desse patógeno em processos infecciosos está relacionado à sua capacidade de aderir a superfícies, sendo a formação de biofilme o seu principal fator de virulência (Otto, 2013). Outro fator importante no estabelecimento de infecções causadas por *S. epidermidis* é a resistência à metilina. Este perfil de resistência, junto com a capacidade de formar biofilme dificulta o tratamento de infecções causadas por esse patógeno (Shore et al., 2013). Embora as infecções raramente se desenvolvam em doenças potencialmente fatais, sua frequência e o fato de serem extremamente difíceis de tratar representam um sério ônus para o sistema público de saúde (Otto, 2009).

De acordo com Trentim et al. (2013) a inibição de alvos de virulência poderia trazer novas moléculas antibacterianas com mecanismo de ação radicalmente novo contra *S. epidermidis*. Para Escaich (2008) a compreensão da fisiologia de *S. epidermidis*, no seu estado comensal e infeccioso, é necessário para avaliar estratégias terapêuticas contra esse patógeno e representam conceito terapêutico inovador.

### **3.4. Fungos fitopatogênicos**

Aproximadamente 10% de todas as espécies conhecidas de fungos podem causar doenças em plantas, trazendo perdas significativas na produtividade agrícola e gerando impactos econômicos negativos (Krugner; Bacchi, 2011). Neste sentido, o gênero *Aspergillus* tem relevante importância econômica, pois além de ser utilizado na produção de diversos produtos, algumas espécies são responsáveis por diversas doenças em plantas, se caracterizando com um patógeno oportunista (Varga et al., 2004).

As espécies do gênero *Aspergillus* são fungos saprófitos presentes no solo e por isso estão associados a doenças principalmente em espécies de pequeno porte (alho, cebola, amendoim) (Marsola et al., 2005). Trata-se de um fungo filamentoso hialino de hifas septadas e ramificadas dicotomicamente (ângulo de 45°). Os conidióforos (corpos de frutificação) partem de uma célula base em haste simples, com formação vesicular na extremidade, de onde emergem os conídios (esporos) (Blum et al., 2012).

As doenças ocasionadas por esses fungos são descritas como podridão do *Aspergillus* e mofo preto, que acometem algumas frutas e legumes, sendo *A. niger* o principal responsável pela disseminação dessas doenças. (Amorim et al., 2011). A podridão do *Aspergillus* manifesta-se como podridão das sementes, e murcha de plantas novas, geralmente até 30 dias após a semeadura. Os tecidos afetados são cobertos por micélio, conidióforos e conídios. Em alguns casos pode ocorrer seca das hastes principal ou até morte da planta. (Barreto et al, 2005). Essa doença acomete cultivos de amendoim (Barreto et al, 2005) e também pode ser observado em culturas de sisal causando podridão do tronco (Santos et al. 2010). Sendo assim, este fungo provoca prejuízos a inúmeras culturas na região nordeste, entre elas amendoim, mamão, sisal, abóbora, cebola, cenoura, tomate, entre outros, demonstrando assim, a importância do desenvolvimento de produtos que favoreçam a inibição do crescimento para este patógeno (Alves et al., 2004).

Outro fitopatógeno que tem gerado prejuízos economicos é o *Moniliophthora perniciosa* (Stahel). Essa espécie era conhecida anteriormente como *Crinipellis perniciosa* (Singer), e trata-se de fungo basiomiófito hemibiotrófico que causa a doença da vassoura-de-bruxa no cacauero (*Theobroma cacao L.*) (Griffith, et al., 2003), podendo causar perdas de até 90 % (Resende et al., 2007), sendo responsável pela diminuição da produção de cacau no Brasil (Meinhardt et al., 2008).

*M. perniciosa* ataca tecidos meristemáticos em crescimento, provocando sintomas característicos de desequilíbrio hormonal na interação patógeno-hospedeiro (Resende et al., 2007). A doença se manifesta quando os esporos fúngicos germinam e infectam os tecidos meristemáticos, desenvolvendo-se em hifas biotróficas monocariônicas, sem conexões de braçadeira que ocupam lentamente o espaço intercelular. Em consequência surgem ramos anômalos hipertrásicos e hiperplásicos e a formação de frutos partenocárpico. Ocorre o crescimento, sem dominância apical, de ramos infectados, conhecidos como "vassouras verdes. Após dois a três meses o tecido infectado se torna necrótico (vassoura seca) e as hifas se tornam saprotróficas, invadindo os espaços inter e intracelulares do tecido infectado. Como estratégia reprodutiva essa espécie fúngica exibe homotalismo e a mudança do micélio monocariótico para o dicariótico ocorre sem o pré-requisito de acasalar entre indivíduos compatíveis. Após períodos alternados de umidade e de seca, os basidiomas produzidos

pelas hifas saprotróficas liberam basidiósporos que são espalhados pelo vento ou pela chuva, completando assim o ciclo de vida de *M. perniciosa* (Mondego et al., 2008)

A produção de cacau no sudeste da Bahia, a principal área de produção no Brasil, foi severamente afetada pela introdução da vassoura-de-bruxa. Essa doença trouxe enormes prejuízos econômicos e ambientais para região (Pereira et al., 1989; 1996).

As medidas recomendadas para o controle da vassoura-de-bruxa refere-se ao manejo integrado da doença, com métodos de controle genético, cultural, químico e biológico (Costa et al., 2006), sendo a poda fitossanitária o principal meio de combate da doença (Carvalho et al., 2012). Portanto, técnicas que envolvam produtos naturais são alternativas importantes para o controle dessa doença (Resende et al. 2007) . Alternativas mais recentes incluem a busca de fungicidas naturais, principalmente à base de extratos vegetais (Boutefas et al., 2016) e a resistência induzida (Resende et al., 2000; 2002).



#### 4. REFERÊNCIAS

Abdalla, M.; Benoliel, C.; Drider, D.; Dhulster, P. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. **Archives of Clinical Microbiology**, v. 196, p. 453-472, 2014.

Abdelghany, S.M.; Quinn, D.J.; Ingram, R.J. Gilmore, B.F., Donnelly, R.F.; Taggart, C.C.; Scott, C.J. Gentamicin-loaded nanoparticles show improved antimicrobial effects towards *Pseudomonas aeruginosa* infection. **International Journal of Nanomedicine**, v7, p. 4053-4063, 2012.

Alves, M.O.; Santiago, E.S.; Lima, A.R.M. **Diagnóstico socioeconômico da região nordestina produtora de sisal (versão preliminar)**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2004. 75p.

Amorim, L.; Rezende, J.A.M. Bergamin Filho, A. eds. Manual de Fitopatologia. Volume 2 - Princípios e Conceitos. 4ª Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo. 2011.

Arafat, S.M; Gaafar, A.; Basuny. A.M.; Shereen, L.N. Chufa Tubers (*Cyperus esculentus* L.): As a New Source of Food. **World Applied Sciences Journal**, v.7, p. 151-156, 2009.

Arantes, T.; Paixão, G.O.D.; Silva, M.D.; Castro, C.S.A. Avaliação da colonização e perfil de resistência de *Staphylo coccus aureus* em amostras de secreção nasal de profissionais de enfermagem. *Revistas Brasileira de Farmacologia*, v 94, n 1, p. 30-34, 2013.

Arif, T.; Mandal, T.K.; Dabur, R. Natural products: Anti – fungal agents derived from plants. *Opportunity Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*, v 81, p. 283 – 311, 2001.

Artini, M.; Patsilnakos, A.; Papa, R.; Bozovi, M. Antimicrobial and Antibiofilm Activity and Machine Learning Classification Analysis of Essential Oils from Different Mediterranean Plants against *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecules**, v, 23, 482, 2018.

Askaris, G.A. et al. Evaluation of Antimicrobial Activity of Aqueous and Ethanolic Extracts of Leaves of *Vitis vinifera* Collected from Different Regions in Morocco. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**. v.12, p.85-90, 2012.

Ashok, K.K.; Ramachandra, S.S.; Narsu, L. GC-MS analysis of n-hexane extracts of *Hibiscus micranthus* Linn. *Asian J Chem*, v 23, n 2, p. 561–5, 2011.

Ayeh-Kumi, P.F.; Tetteh-Quarcoo, P.B.; Duedu, K.O. A survey of pathogens associated with *Cyperus esculentus* L (tiger nuts) tubers sold in a Ghanaian city. **BMC Research Notes**, v 7, p. 343, 2014.

Bado, S.; Bazongo, P.; Son, G.; Kyaw, M.; Forster, B. Physicochemical Characteristics and Composition of Three Morphotypes of *Cyperus esculentus* Tubers and Tuber Oils. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v 2015, 2015.

- Barbosa-Filho, J.M.; Nascimento-Júnior, F.A.; Tomaz, A.C.A.; Athayde-Filho, P.F.; Silva, M.S.; Cunha, E.V.L.; Souza, M.F.V.; Batista, L.M., Diniz, M.F.F.M. Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.141-148, 2007.
- Barreto. M. Doenças do amendoim. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamni Filho, A.; Camargo, L. E. A.; Rezende, (Ed.). **Manual de fitopatologia**. Via: volume 2: Doenças das plantas cultivadas. Cap:10. São Paulo: CERES, 2005.
- Bhagwat, S.; Hayytowitz, D.B.; Holden, J.M. USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. U.S. Department of Agriculture: Agricultural Research Center, Release 3, p. 10-12, 2011.
- Blum, L.E.B.; Uesugi, C. H.; Cares, J.E.; Vale, H.M.M. eds. **Fitopatologia e microrganismos fitopatogênicos**. 1ª Edição. Gráfica e Editora Positiva Ltda. Brasília, DF. 2012
- Boscariol, R.; Ouchi, J.D.; Pereira, G.C. Produção de biofilme por *Staphylococcus aureus*. *Revista Saúde em Foco*, 10, 2018.
- Bouterfas, K.; Mehdadi, Z.; Aouad, L.; Elaoufi, M.M.; Khaled, M.B.; Latreche, A.; Benchiha, W. La localité d'échantillonnage influence-t-elle l'activité antifongique des flavonoïdes de *Marrubium vulgare* vis-à-vis de *Aspergillus niger* et *Candida albicans*? **Journal de Mycologie Médicale**. 607, 2016.
- Bryers, J.D. Medical biofilms. **Biotechnology and Bioengineering**, v 100, p. 1–18, 2008.
- Carneiro, M.; Ferraz, T.; Bueno, M.; Koch, B.E.; Foresti, C.; Lena, V.F. Antibiotic prescription in a teaching hospital: a brief assessment. **Revista da Associação Médica Brasileira**; v 57, n 4, p. 421-4, 2011.
- Carvalho, L.E.; Lima, M.P.; Máximo, A.C.; Pereira, E.C.S; Moreira, W.A.S. Estudo em raiz e ráquis foliar de *Spathelia excelsa*: fitoquímica e atividade frente ao fungo. **Química Nova**. 35 (11): 2237-2240, 2012.
- Castro, H.G.; Ferreira, F. A.; Silva, D. J. H.; Mosquim, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais: Metabólitos Secundários**. 2. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2005.
- Chatterjee, M; Anju, C.P.; Biswas, L.; Kumar, V.A.; Mohan, C.G. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. **International Journal of Medical Microbiology**, v.306, p. 48-58, 2016.
- Chessa, L, Pusino, A, Garau, G, Mangia, NP, Pinna, MV. Soil microbial response to tetracycline in two different soils amended with cow manure. **Environmental Science and Pollution Research**, v23, p. 5807–5817, 2016.
- Cogen, A.L.; Nizet, V.; Gallo, R.L. Skin microbiota: A source of disease or defence? *The British Journal of Dermatolog.* v 158, p. 442–455, 2008.

Costa, J.C.B., Bezerra, J.L., Veloso, J.L.M., Niella, G.R. Bastos, C.N. Controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro. In: Verson, M., Paula JR., T.J. & Pallini, A. (Eds.) **Tecnologias alternativas para o controle de pragas e doenças**. Viçosa MG. EPAMIG. 2006.

Dadook M, Mehrabian S, Irian S. Antimicrobial Effect of *Cyperus rotundus* on multiple drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Journal of Medical Bacteriology**, v 5, n1, 2, p. 15-20, 2016.

Dash, B.K. et al. Antibacterial Activities of Methanol and Acetone Extracts of Fenugreek (*Trigonella foenum*) and Coriander (*Coriandrum sativum*). **Life Sciences and Medicine Research**, v.2011, n.27, p.1-8, 2011.

De Bona, E.M.; Pinto, F.G.S; Fruet, T.K.; Jorge, T.C.M.; Moura, A.C. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos aquosos e etanólico. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.81, p. 218-225, 2014.

Desoti, V.C.; Maldaner, C.L.; Carletto, M.S.; Heinz, A.A.; Coelho, M.S.; PIATI, D.; Tiuman, T.S. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 15, p. 3-13, 2011.

Elisha, L.I., Botha, F.S., McGaw, L.J., Eloff, J.N. Teh antibacterial activity of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v17. 2017.

Escaich, S. Antivirulence as a new antibacterial approach for chemotherapy. **Current Opinion in Chemical Biology**, v 12, n 4, p.400-8, 2008.

Ferracini, F.T.; Filho, W.M.B.; Almeida, S.M. **Atenção à Prescrição Médica**, 1.ed. São Paulo, Atheneu, 2014.

Follak, S.; Belz, R.; Boheren, C.; Castro, O.; Essl, F. Biological flora of Central Europe: *Cyperus esculentus* L. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v23, p. 33-5, 2016.

Griffith, G.W.; Nicholson, J.; Nenninger, A.; Birch, R.N.; Hedger, J.N. Witches' brooms and frosty pods: two major pathogens of cacao. **New Zealand Journal of Botany**, v 41, p. 423–435, 2003.

Hernández-Martínez, F.; Hernández-Martínez, J.; Jiménez-Rodríguez, C.; Jiménez-Díaz, J.; Vera, C. La “horchata” de Chufa de Valencia (*Cyperus esculentus* L): bebida refrescante y nutritiva **Revista Española de Nutrición Comunitaria**, v23, p. 1-56, 2017.

Hellmark, B.; Söderquista, B.; Unemo, M.; Nilsson-Augustinsson, A. Comparison of *Staphylococcus epidermidis* isolated from prosthetic joint infections and commensal isolates in regard to antibiotic susceptibility, agr type, biofilm production, and epidemiology. **International Journal of Medical Microbiology**, v 303, p. 32– 39, 2013.

Holm, L.G.; Plucknett, D.L.; Pancho, J.V.; Herberger, J.P. *The World's Worst Weeds*. Krieger Publishing Company, Florida. Holt, J.S., Orcutt, D.R., 1991

Izano, E.; Amarante, M.; Kher, W.; Kaplan, J. Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v 74, p. 470–476.

Kissman, K.G. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF, 1997.

Kotkar, H.M.; Mendki, P.S.; Sadan, S.V.; Jha, S.R.; Upasani, S.M.; Maheshwari, V.L. - Antimicrobial and pesticidal activity of partially purified flavonoids of *Annona squamosa*. **Pest Management Science**, v 1, p. 33-7, 2002.

Kipre, B.G.; Guessennd, N.K.; Koné1, M.W.; Gbonon, V.; Coulibaly, J.K.; Dosso, M. Antibacterial activity of the stem bark of *Tieghemella Heckelii* Pierre ex. A Chev against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v17, 170, 2017.

Krugner;T.L.; Bacchi,L.M.A. Fungos. In: Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A. (eds). **Manual de Fitopatologia**. Volume 1 - Princípios e Conceitos. 4ª Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo, 2011.

Kumar A. K.; Ramachandra S. S.; Narsu L. Pharmacognostic and phytochemical investigations of roots of *Hibiscus micranthus* Linn. Research **Journal of pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences (RJPBCS)**, v 1, n 4, p. 324–337 2010.

Kumar, S., Varela, M. F. Molecular Mechanisms of bacterial Resistance to antimicrobial Agents. *Microbial Pathogens and strategies for Combating Them: Science, technology and education*, Formatex, p. 522- 534, 2013.

Kumar, S.S.; Easwer, H.V.; Maya Nandkumar, A. Multiple drug resistant bacterial biofilms on implanted catheters—A reservoir of infection. *J. Indian Physics Association*, v 61, p. 702–707, 2013.

Lima, A.; Borges, M.; Parente, R.; Oliveira, M. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares – revisão de literatura. **Revista UNINGÁ Review**, v.21, n.1, p.32-39, 2015.

Lorenzi, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas, Nova Odessa, SP, Inst. Plantarum, 2008.

Magigan, M.T.; Martinko, J.M. Stahl. D.A.; Clark, D.P. *Brock biology os microorganisms*. International Microbiology, 13 th ed, 2012.

Magigan, M. T.; Martinko, J.; Bender, K.; Buckley, D. **Microbiologia de Brock**. 14 ed. Porto Alegre: Artmed. 2016.

Mamat,S.; Kamarolzaman, M.; Yahya, F.; Mahmood, N.; Shahril, M. Methanol extract of *Melastoma malabathricum* leaves exerted antioxidant and liver protective activity in rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v 13, n 326, 2013.

Marsola, N. S. Jr.; Jesus, W. C. Jr.; Kimati, H., Doenças da cebola e do alho. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamni Filho, A.; Camargo, L. E. A.; Rezende, (Ed.). **Manual de fitopatologia**. Via: volume 2: Doenças das plantas cultivadas. Cap:9. São Paulo: CERES, 2005.

Martins, A.; Cunha, M. L. R. S. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococci*: epidemiological e molecular aspects. **Microbiology and Immunology Journal**, v. 51, n. 9, p. 787-95, 2007.

Matos, F.J.A.; Cavalcanti, F.S.; Parente, J.P. Estudo agrônômico qualitativo e quantitativo de *Cyperus esculentus* L. (junça) - Uma fonte inexplorada de alimento energético. **Revista de Ciências Agrônômica**, Fortaleza, v. 39, p. 124-129, 2008.

Meinhardt, L.W.; Rincones, J.; Bailey, B.A.; Aime, M.C.; Griffith, G.W.; Zhang, D., Pereira, G.A.G. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease of cacao : what's new from this old foe ? **Molecular Plant Pathology**, v.9, p. 577-588, 2008.

Mello, S.C.M. **Fungos e seus metabólitos no controle de tiririca**. Emprapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003.

Mc Carthy, H.; Rudkin, J.K.; Black, N.S.; Gallagher, L. **Methicillin resistance and the biofilm phenotype**. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 5:1-9, 2015.

Miranda, J.A.L.; Rocha, J.A.; Araujo, K.M.; Quelemes, P.V.; Mayo, S.J.; Andrade, I.M. Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, p.1142-1149, 2015.

Mondego, J. M., Carazzolle, M. F., Costa, G. G., Formighieri, E. F., Parizzi, L. P., Rincones, J., Pereira, G. A. A genome survey of *Moniliophthora perniciosa* gives new insights into Witches' Broom Disease of cacao. *BMC Genomics*, v 9, 548, 2008.

Murray, .PR. **Microbiologia Médica**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

Muthu K, Hema M, Nagaraj S, Rengasamy R. *In-vitro* antibacterial potential, Phytochemical characterization of *Cyperus rotundus* flower extract. **International Journal of Natural Products Research**, v 4, n 1, p. 6-8, 2014.

Neves, P.R.; Mamizuka, E.M.; Levy, C.E. Liconpan, N. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa*: an endemic problem in Brazil. **Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 47, p.409-420, 2011.

Niero, R.; Malheiros, A. Principais aspectos químicos e biológicos dos terpenos. In:Yunes, R.A.; Cechinel Filho, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: UNIVALI Editora, 2010.

Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, Carneiro C, Cavaco LM, Bernardo F. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v 118,133-40, 2006.

Oliveira Jr., R.S; Constantin, J.; Inoue, M.H. **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. Omnipax Editora, 2011.

Orhan, D.D.; Zc-Elik, B.; Zgen, S.;Ergun, F. Antibacterial,antifungal,and antiviral activities of some flavonoids. **Microbiological Research**, v 165, p. 496—504, 2010.

Otto, M. *Staphylococcus epidermidis*—the “accidental” pathogen. *Nature Reviews Microbiology*,7, p.555–567, 2009.

Otto, M. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Seminars in Immunopathology*,v 34,p. 201–214, 2011.

Otto, M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. **Annual Review of Medicine**, v. 64, p. 175-188, 2013.

Papa, R.; Selan, L.; Parrilli, E.; Tilotta, M.; Sannino, F.; Feller, G.; Tutino, M.L.; Artini, M. Anti-Biofilm Activities from Marine Cold Adapted Bacteria Against *Staphylococci* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*, v 6, 1333, 2015.

Panizzi, L.; Caponi, C.; Catalano, S.; Cioni P.L.; Morelli, I. In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. **Journal of Ethnopharmacology**, v 79, p. 165-8, 2002.

Pereira JL, Ram A, Figueredo JM, de Almeida LC. La primera aparición de la "escoba de bruja" en la principal área productora de cacao del Brasil. *Turrialba*, v 39, p.459–461, 1989.

Pereira JL, deAlmeida LCC, Santos SM. Witches' broom disease of cocoa in Bahia: Attempts at eradication and containment. *Crop Protection*, v 15, p.743–752, 1996.

Pereira, E.P.; Cunha, M.L.R.S. Avaliação da colonização nasal por *Staphylococcus* spp. resistente a oxacilina em alunos de enfermagem. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica**, v. 45, n. 5, p. 361-369, 2009.

Peterson, J.; Dwyer, J.; Dsc, RD. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, 18: 1995-2018, 1998.

Resende, M.L.V., Nojosa, G.B.A., Aguilar, M.A.G., Silva, L.H.C.P., Niella, G.R., Carvalho, G.A., Giovanini,G.R., Castro, R.M. Perspectivas da indução de resistência em cacauero contra *Crinipellis pernicioso* através do benzoatiazole (BTH). **Fitopatologia Brasileira**, v 25, p.149-156, 2000.

Resende, M.L.V., Nojosa, G.B.A., Cavalcanti, L.S., Aguilar, M.A.G., Silva, L.H.C.P., Perez, J.O., Andrade, G.C.G., Carvalho, G.A., Castro, R.M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, v 51, p.621- 628. 2002.

Resende, M.L.V., Costa, J.C.B., Cavalcanti, F.R., Ribeiro Júnior, P.M.; Camilo, F.R. Seleção de extratos vegetais para indução de resistência e ativação de respostas de defesa em cacauero contra a vassoura-de-bruxa. **Fitopatologia Brasileira**, v 32, p.213-221, 2007.

Salas, P.M.; Céliz, G.; Geronazzo, H.; Daz, M.; Resnik, S.L. Antifungal activity and enzymatically – modified flavonoids isolated from citrus species. **Food Chemistry**, v 124, p. 411 – 1415. 2011.

Sato, B.F., Kumagai, H. Review Microbial production of isoquinoline alkaloids as plant secondary metabolites based on metabolic engineering research. **Proceedings of the Japan Academy**, Series B, v. 89, p. 165–182. 2013.

Sanchez-Zapata, E.; Fernandez-Lopez, J.; Perez-Alvarez, J. “Tiger Nut (*Cyperus esculentus*) commercialization: health aspects, composition, properties, and food applications.” **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v 11, n 4, p. 366–377, 2012.

Sánchez, E, Morales, CR, Castillo, S, Leos-Rivas, C, García-Becerra, L, Martínez, DMO. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Methanolic Plant Extracts against Nosocomial Microorganisms. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2016.

Sandhar, H.K.; Kumar, B.; Prasher, S.; Tiwari, P.; Salhan, M.; Sharma, P. . A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, v 1, n 1, p. 25 – 41, 2011.

Shore, A.C.; Coleman, D.C. Staphylococcal cassette chromosome mec: Recent advances and new insights. *International Journal of Medical Microbiology*, v3; n 303, p. 350–9, 2013.

Simões, E. R. B.; Marques, L. G. A.; Pinheiro, B. M.; Santos, M. R. C.; Pessoa, C. Technological Forecasting on Phytotherapies Development in Brazil. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v.67, p.132-136, 2012.

Silveira, G.P.; Nome, F; Gesser, J.C.; SÁ, M.M. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova** [online]. v 29, n 4, p. 844-855.

Taiz, L.; Zeiger, E. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artemed: 2009.

Trabulsi, L. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

Trentin, D.S.; Giordani, R.B.; Macedo, A.J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

Venturoso, L.R.; Bacchi, L.M.A.; Gavassoni, W.L.; Pontim, B.C.A.; Conus, L.A. Influência de diferentes metodologias de esterilização sobre a atividade antifúngica de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.4, p.499-505, 2010.

Viegas Jr., C. Terpenes with insecticidal activity: an alternative to chemical control of insects. **Quím. Nova**, v 26, p. 390-400, 2003.

Yunes, R.A.; Cechinel Filho, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: UNIVALI Editora, 2010.

Wojtyczka, RD, Orlewska, K, Kępa, M, Idzik, D, Dziedzic, A, Mularz, T, Krawczyk, M, Mikłasińska, M, Wąsik, TJ. Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* Strains from a Hospital Environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v 11, p. 4619-4633, 2014.

Zhao, W.H.; Hu, Z.Q. Beta-lactamase indentified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Critical Reviews in Microbiology**, v36, p. 245-258, 2010.

Zuannazzi, J.S.S. Flavonoids. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A., Petrovick PR. *Pharmacognosy: the plant to the drug*. 2 ed. See. Porto Alegre / Florianópolis. Ed. University / UFRGS / Ed. UFSC, 2000

Zuannazzi, J.S.S.; Montanha, J.A. Flavonoids. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A., Petrovick PR. *Pharmacognosy: the plant to the drug*. 2 ed. See. Porto Alegre / Florianópolis. Ed. University / UFRGS / Ed. UFSC, 2007.



## **CAPITULO 1**

---

*Manuscrito formatado de acordo as normas da Revista Cardenos de Propecção-UFBA*

## CAPITULO1. PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DA ESPÉCIE *Cyperus esculentus* L.: UM PANORAMA SOBRE A PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA

### RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo mapear as produções científicas e tecnológicas relacionadas ao *C. esculentus*, avaliando as potencialidades desta espécie no cenário mundial. Foi realizado uma busca nas bases de dados de patentes do European Patent Office (EPO), e na base de dados de periódicos, *Web of Science*, *Science Direct*, *Scielo*. A pesquisa resultou em 698 patentes e 118 artigos. O ano de 2011 apresentou o maior número de patentes depositadas e a China aparece como o maior depositante. Os resultados da Classificação Internacional de Patentes estão restritos a Seção A, atribuída a necessidades humanas, em destaque para a Subseção A23L associada a produtos alimentícios. Em relação às áreas de pesquisa, houve destaque para a área de Agricultura. Os resultados também evidenciaram a potencialidade tecnológica e científica da espécie para a indústria farmacêutica, pois as publicações e patentes analisadas relatam atividade terapêutica, bem como a presença de compostos bioativos.

Palavras-chave: *Cyperus esculentus* L. Prospecção Tecnológica. Patentes.

### TECHNOLOGICAL PROSPECTION OF THE SPECIES *Cyperus esculentus* L.: A PANORAMA ABOUT THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL PRODUCTION

### ABSTRACT

The present work had as objective to map the scientific and technological productions related to *C. esculentus*, evaluating the potential of this species in the world scenario. A search was conducted in the patent databases of the European Patent Office (EPO), and in the periodical database, *Web of Science*, *Science Direct*, *Scielo*. The search resulted in 698 patents and 118 articles. The year of 2011 presented the biggest number of deposited patents. The China appears as the biggest depositor. The results of the International Patent Classification are restricted to Section A, attributed to human needs, in particular the subsection A23L associated with food products. In relation to the research areas, the area of Agriculture was highlighted. The results also showed the technological and scientific potential of the species for the pharmaceutical industry, since the publications and patents analyzed report therapeutic activity, as well as the presence of bioactive compounds.

Keywords: *Cyperus esculentus* L. Technological Prospection. Patents.

Área tecnológica: Alimentos. Produtos naturais. Alimentos. Saúde.

## INTRODUÇÃO

A espécie *Cyperus esculentus* L. está entre os representantes da família Cyperaceae que possui cerca de 3000 espécies, dentre as quais 2020 foram identificadas como plantas infestantes (MELLO, 2003). É conhecida pelos nomes vulgares de tiririca, tiririca-amarela, tiririca-mansa, Juncinho, Junça e Chufa. Provavelmente, é originário do Mediterrâneo e sudoeste da Ásia e, atualmente, é amplamente distribuído em regiões tropicais, subtropicais e temperadas em todo o mundo (HOLM et al., 1991; FOLLAK, et al., 2016), sendo descrito como uma pequena erva graminóide perene, ereta, com caule de seção triangular, sem ramificação ou nós, glabro, com 20 a 90 cm de altura (LORENZI, 2008).

*Cyperus esculentus* trata-se de uma planta invasora e é considerada uma das ervas daninhas mais agressivas em todo mundo, devido a sua ampla distribuição e métodos reprodutivos (ARIAS-PEREZ et al., 2017; GUSMAN-KANTUN et al., 2017). Sua reprodução quase exclusivamente vegetativa e a liberação de compostos fenólicos com efeitos alelopático, confere a espécie capacidade competitiva que torna difícil o controle da espécie, acarretando impactos negativos a culturas agrícolas (OLIVEIRA Jr et al., 2011).

O sistema subterrâneo da planta é caracterizado pela presença de tubérculos nas extremidades dos rizomas (KISSMANN, 1997). Esses tubérculos são ricos em amido (ADEBOWALE et al., 2017), proteínas, gorduras (ADEGUNWA et al., 2017) e popularmente tem sido utilizado para preparação de uma bebida refrescante chamada "Horchata De Chufas" (OLADELE; AINA, 2007). Além disso, o *C. esculentus* tem sido utilizado pela medicina popular (MATOS et al., 2008; ARAFAT et al., 2009) para tratamento de flatulência, indigestão, diarreia e sede excessiva (ADEJUYITAN, 2011).

Neste sentido, o mapeamento de informações sobre o potencial biológico dessa espécie pode auxiliar na determinação de estratégias de pesquisas e identificação de novas propriedades e aplicação tecnológica. De acordo com Simões et al., (2012) trabalhos de prospecção são relevantes pois permitem conhecer tendências de crescimento de uma determinada área de conhecimento ou produto de interesse. Para Lima et al. (2015) o levantamento de informações sobre publicações e patentes prevê possibilidade de avanços científicos e podem influenciar na determinação de trajetórias tecnológicas, que garantem a competitividade e sobrevivência das instituições de pesquisa. Sendo assim, podem direcionar o desenvolvimento de novas tecnologias e contribuir para o desenvolvimento científico-tecnológico e econômico.

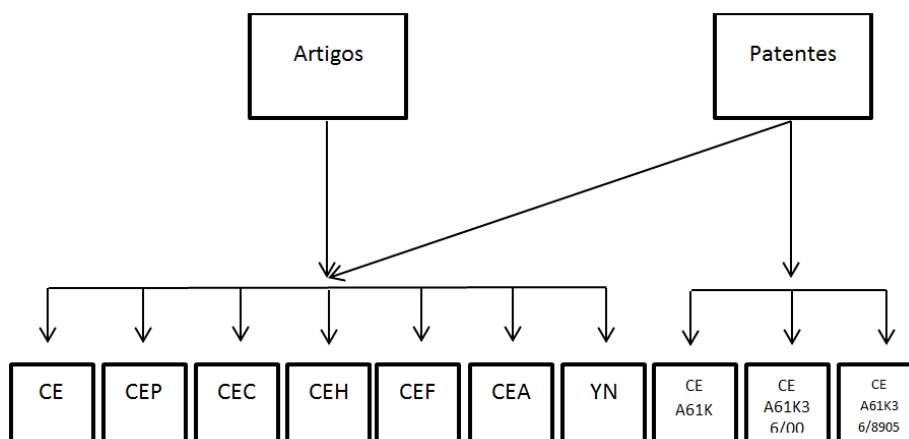
Portanto, este trabalho tem o objetivo de analisar publicações e registros de depósitos de patentes relacionados à espécie *C. esculentus* a fim de traçar o perfil das produções científicas e avaliar a geração de produtos e processos desenvolvidos a partir dessa planta.

## METODOLOGIA

Para a realização da prospecção tecnológica, foi feita uma busca de patentes na base de dados europeia Espacenet (*European Patent Office* (EPO)). Este banco de dados refere-se a coleção completa de pedidos de patentes em mais de 80 países, incluindo, por exemplo, os pedidos de patentes nacionais, Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), norte americanos, United States Patent and Trademark Office (USPTO) e via Patent Cooperation Treaty (PCT). Já o levantamento das publicações científicas utilizou as bases de dados *Web of Science*, *Science Direct*, *Scielo*.

Para estabelecer a estratégia de busca de documentos referentes ao *C. esculentus* determinou áreas de interesse relacionadas com possíveis aplicações tecnológicas da espécie. Também foi selecionado códigos do IPC (Classificação Internacional de Patentes) sendo eles A61K (Preparações para uso médico, dentário), A61K36/00 (Preparações medicinais de constituição indeterminada contendo material de algas, líquenes, fungos ou plantas, ou seus derivados) e A61K36/8905 (Preparações medicinais relacionadas ao gênero *Cyperus*) (Fluxograma 1).

**Fluxograma 1-** Estratégia utilizada para pesquisa de documentos relacionados à espécie *Cyperus esculentus*. CE (*Cyperus esculentus*), CEP (*Cyperus esculentus* and pharmacology) CEC (*Cyperus esculentus* and chemistry), CEH (*Cyperus esculentus* and health), CEF (*Cyperus esculentus* and food), CEA (*Cyperus esculentus* and agriculture), YN (Yellow nutsedge).

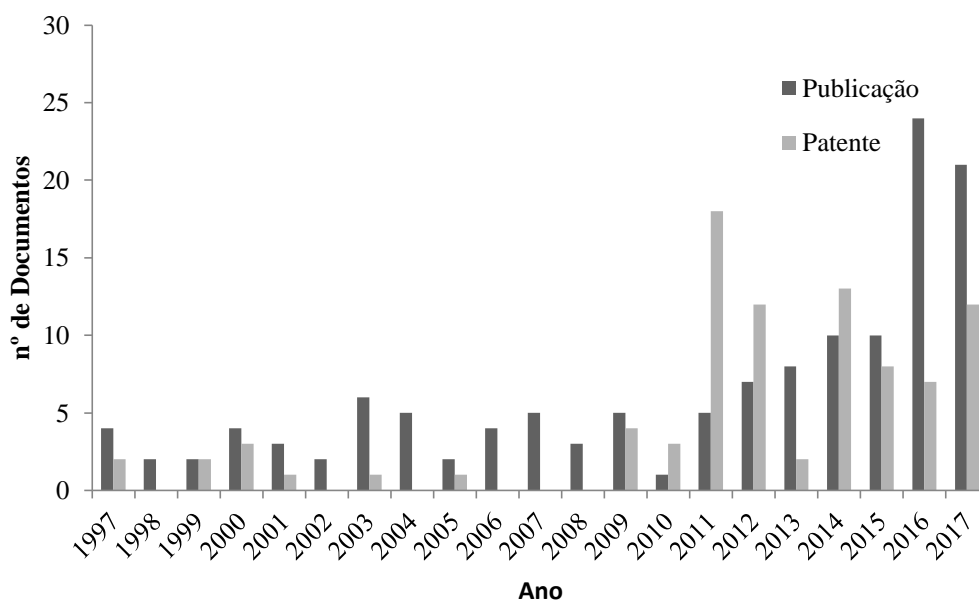


Foram selecionados apenas os documentos que se referiam à espécie em estudo, e as informações foram organizadas considerando ano de publicação, número de documentos, países e as principais áreas de estudo e aplicação tecnológica referente a *C. esculentus*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os documentos relacionados à espécie *C. esculentus*, nos últimos 20 anos, totalizaram uma produção de 698 artigos e 118 patentes (Gráfico 1), sendo 2011 o ano com maior número de patentes e 2016 com mais publicações. Os resultados evidenciaram um aumento gradual de documentos, demonstrando a possibilidade de utilização da planta em diferentes áreas, bem como seu potencial para geração de tecnologias.

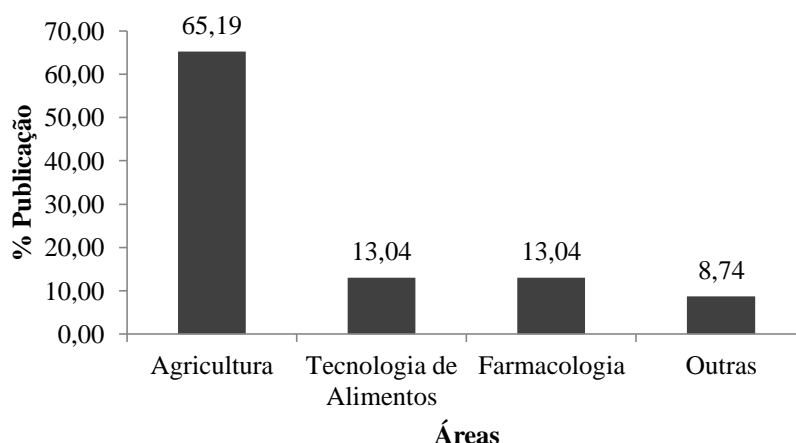
**Gráfico 1-** Números de documentos relacionados à espécie *Cyperus esculentus* no período entre 1997 a 2017.



Fonte: Autorial própria, 2018.

Em relação áreas de pesquisas científicas para o termo *Cyperus esculentus* L. (Figura 2), foi observado maior percentual de publicações para a de área de Agricultura (65,19 %), que está associada, de modo geral, a estratégias de manejo e controle da planta (JOHNSON et al., 2015; MHLANGA et al. 2016) e a avaliação do impacto da espécie sobre outras culturas (MEYERS; SHANKLE, 2017). Por se tratar de uma espécie invasora de grande impacto econômico (FOLLAK et al., 2016), justifica-se a expressiva quantidade de publicações com ênfase agrônômica.

**Gráfico 2-** Percentual de publicações por área de pesquisa com o *Cyperus esculentus* L.



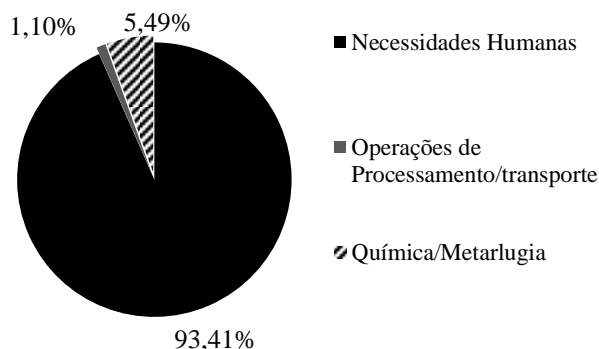
Fonte: Autoria própria, 2018.

As pesquisas na área Tecnologias de Alimentos (13,04 %) englobam estudos sobre o potencial nutricional dos tubérculos, evidenciando a alta concentração de lipídios e carboidratos (CODINA-TORRELLA et al., 2017; BADO et al. 2015) e sua utilização para a produção de leite, farinha e bebidas (OKYERE; ODAMTTEN, 2014; AGUILAR et al., 2015; RUBERT et al., 2017), bem como suplemento nutricional ( ADEBOWALE et al., 2017; ADEGUNWA et al., 2017; RUBERT et al., 2017). Os resultados revelam que os tubérculos possuem composição química e propriedades funcionais que atribuem alto valor nutritivo a planta sendo de grande interesse para a qualidade nutricional e processamento de alimentos. Também foi verificado que pesquisas que utilizam os tubérculos da planta tem destacado o seu alto potencial oleaginoso e sua utilização para a produção de biodiesel (WANG et al. 2013).

Já os estudos farmacológicos (13,04 %) abordam sobre compostos bioativos, perfil fitoquímico e propriedades biológicas com a finalidade de obtenção de bioprodutos. As principais potencialidades farmacológicas encontradas nas publicações apontam para atividade antibacteriana dos tubérculos e frutos de *C.esculentus* (PRAKASH; RAGAVAN, 2009; SEUKEP et al., 2013), a identificação de flavonoides com ação contra as bactérias *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* (JING; WANG, 2016) e atividade antioxidante (ADEWUYI et al., 2012; JING et al., 2013; HAMDY, et al., 2017). Também foi verificada a utilização da planta no tratamento de infertilidade (ALLOUH et al., 2015; SAGANUWAN, 2015). Neste sentido, as pesquisas revelam que a espécie apresenta propriedades terapêuticas importantes, com aplicação em diferentes áreas. Sobre o perfil fitoquímico, os trabalhos descrevem a presença de flavonoides, taninos e esteroides (ADENUYI et al., 2014).

A análise das áreas de aplicação das tecnologias patenteadas, em relação à Classificação Internacional de Patentes (IPC), demonstrou que a maioria dos depósitos está atribuída à Necessidades Humanas, com 93,41% dos registro, que abrange produtos e processos voltados para a área de agricultura, saúde e alimentos, e ainda, artigos de uso pessoal e doméstico.

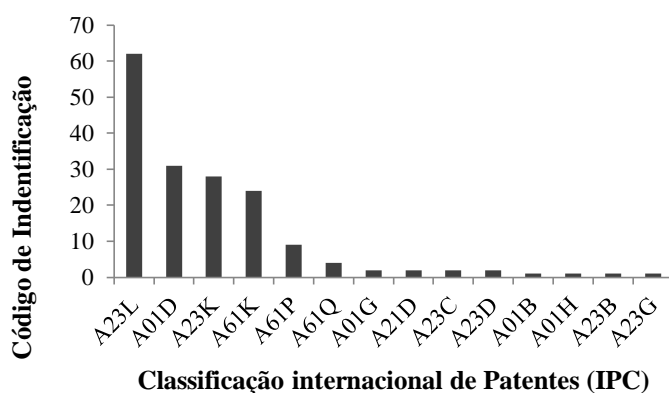
**Gráfico 3-** Percentual de patentes por área de aplicação da tecnologia de acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC).



Fonte: Autoria própria, 2018.

Os códigos de identificação do IPC de maior frequência nas patentes relacionadas a Necessidades Humanas foram A23L (alimentos, produtos alimentícios ou bebidas não alcoólicas), seguida de A01D (Agricultura) e de A23K (produtos alimentícios e métodos de preparação e o especialmente adaptados para animais) (Gráfico 4). Isso evidencia o aproveitamento tecnológico do *C. esculentus* para o desenvolvimento de produtos com finalidades alimentícias, confirmando que a espécie detém um grande potencial para a indústria alimentícia. Essa tendência é atribuída a compostos que atribuem valor nutricional à planta, como carboidratos (OLADELE; AINA, 2007; ARAFAT et al., 2009;), proteínas, lipídios, minerais (ADEGUNWA et al., 2017). Neste sentido, a principal aplicação tecnológica A23L corrobora com as publicações científicas referentes à importância nutricional, agregando valor econômico ao *C. esculentus*.

**Gráfico 4-** Frequência de códigos de identificação das patentes relacionadas ao *Cyperus esculentus*, de acordo a Classificação Internacional de Patentes (IPC).



Fonte: Autoria própria, 2018.

Considerando a aplicação terapêutica da planta, foi observado o registro de cinco patentes relacionadas ao potencial farmacológico. Neste contexto, a classificação A61K foi a mais frequente e trata de invenções com finalidades médicas, odontológicas ou

higiênicas, com destaque para preparações farmacêuticas. Outro código que também aparece é o A61P que é caracterizado por enquadrar atividades terapêuticas de compostos químicos e de preparações medicinais. As patentes encontradas com esses códigos visam a utilização da espécie para tratamento capilar, combate ao envelhecimento e estresse emocional, efeito antidiabético e antibacteriano contra *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* (Quadro 1), demonstrando a aplicação tecnológica de propriedades terapêuticas da planta.

**Quadro 1-** Lista de patentes relacionadas ao potencial farmacológico da espécie *C. esculentus*.

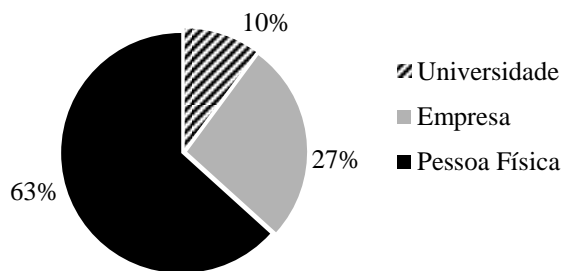
Número da Patente	País	Ano	Título	IPC
DE102012203989	Alemanha	2012	COMPOSITION, USEFUL TO TREAT HAIR, COMPRISES CYPERUS ESCULENTUS TUBER EXTRACT, A QUATERNARY AMMONIUM COMPOUND E.G. AN ESTERQUAT OR POLYQUATERNIUM-74, AND AN AMINO FUNCTIONAL SILICONE	A61K8/41 A61K8/898 A61K8/97
US2010291250	Estados Unidos	2009	USE OF AN ACTIVE INGREDIENT THAT IS OBTAINED FROM CYPERUS ESCULENTUS FOR ITS ANTIAGING CUTANEOUS ACTION	A61K36/8905; A61P43/00; A61Q19/08; A61K36/8905
CN104083571	China	2014	EXTRACTION METHOD AND USE OF CYPERUS ESCULENTUS GENERAL FLAVONE CAPABLE OF ENHANCING MICROCIRCULATION	A61K36/8905 A61P39/06 A61P7/02
RU2197259	Rússia	2001	ANTIDIABETIC AGENT	A61K36/8905; A61P3/00; A61P3/10; A61K125/00; A61K35/78; A61P3/00
RU2176516	Rússia	2000	STRESS CORRECTING ADAPTOGEN	A61K36/185 A61P25/00 A61P43/00

Fonte: Autoria própria, 2018.

Em relação ao perfil dos depositantes, verificou-se que o percentual de depósitos por pessoa física (inventores independentes) é bem maior em relação à empresa e universidade, representando 63% dos registros de patentes (Gráfico 5). Segundo Mueller e Perucchi (2014), vários países têm incentivado a inserção das universidades na produção de patentes, e os depósitos de patentes universitárias tem aumentado entre a década de 1990 e a primeira década deste Século XXI.



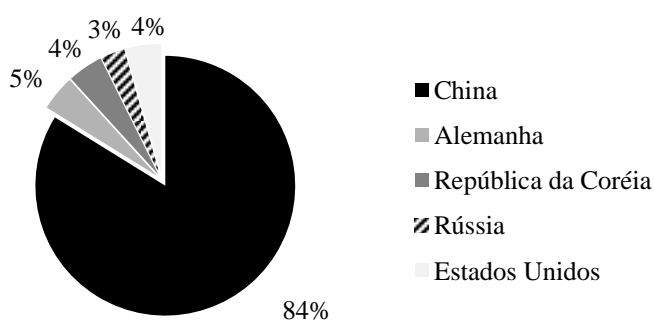
**Gráfico 5-** Percentual dos documentos de patentes sobre a espécie *Cyperus esculentus* por tipo de depositante.



Fonte: Autoria própria, 2018.

De acordo com a análise de distribuição de depósitos de patentes por país de origem da tecnologia, a China foi o país de maior destaque, sendo responsável por 84% dos registros (Gráfico 6), sendo considerada uma das maiores potências em depósitos de patentes em biotecnologia, e isso pode ser justificado pelos incentivos do governo à Ciência e Educação (GONCALVES et al., 2017).

**Gráfico 6-** Principais países detentores de patentes relacionadas ao *C. esculentus*.



Fonte: Autoria própria, 2018.

O Brasil não aparece entre os países detentores de tecnologias com *C. esculentus*, mesmo apresentando publicações científicas relacionadas à espécie. Em 2004, foi aprovada a Lei de Inovação, que busca facilitar a transferência de tecnologia, e um dos seus efeitos foi a criação Núcleos de Inovação Tecnológica (NITs) nas universidades (MUELLER; PERUCCHI, 2014). Lima (2016) ressalta que apesar do estímulo à propriedade intelectual a partir dessa lei, ainda é grande a diferença entre a produção científica brasileira e o de registro de patentes. De acordo com Costa et al. (2015), o Brasil ainda possui baixa concorrência e apresenta pouco esforço em inovar na área de invenções tecnológicas, atribuindo esse cenário à falta de incentivo em proteger as tecnologias desenvolvidas no país, bem como a dificuldade de articulação entre governo, empresas e instituições.

## CONCLUSÃO

As invenções tecnológicas referentes ao *C. esculentus* demonstram a aplicação biotecnológica da espécie agregando importância científica, tecnológica e econômica, com destaque para publicações e patentes com finalidades alimentícias. Os resultados também evidenciam a potencialidade tecnológica e científica da espécie para a indústria farmacêutica, pois as publicações e patentes analisadas revelam a aplicação terapêutica da espécie, bem como a presença de compostos bioativos. Sendo assim, os documentos relacionados ao *C. esculentus* revelam o seu potencial para atender necessidades humanas na área de alimento e saúde, podendo ser explorado pela indústria alimentícia, de cosmético e farmacêutica, com perspectiva para geração de novas tecnologias.

## REFERÊNCIAS

- ADEBOWALE, A.A.; KAREEM, S.T.; SOBUKOLA, O.P. Mineral and antinutrient content of high quality cassava-tigernut composite flour extruded Snack. **Journal of Food processing and Preservation**, v41, 2017.
- ADEGUNWA, M.O. ADELEKAN, E.O.; ADEBOWALE, A.A. Evaluation of nutritional and functional properties of plantain (*Musa paradisiaca* L.) and tigernut (*Cyperus esculentus* L) flour blends for food formulations. **Congent Chemistry**, v3, 2017.
- ADEJUYITAN, A. Tigernut processing: its food uses and health benefits. **American Journal of Food Technology**, v6, 197–201, 2011.
- AGUILAR, N.; ALBANELL, E.; MIÑARRO, B.; CAPELLAS, M. Chickpea and tiger nut flours as alternatives to emulsifier and shortening in gluten-free bread. **Food Science and Technology**, v62, 225–232, 2015.
- ADENIYI, T.A.; ADEONIPEKUN, P.A.; OMOTAYO, E.A. Investigating the Phytochemicals and Antimicrobial Properties of Three Sedge (Cyperaceae) Species Tiwalade Adeyemi. **Notulae Scientia Biologicae**, v6, 276-281, 2014.
- ADEWUYI, A.; ODERINDE, R.A.; AYODELE, G.A. Antimicrobial activity of diethanolamide: a nonionic surfactant from *Calophyllum inophyllum* and *Cyperus esculentus*. **La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse**. v, 2012.
- ALLOUH, M.H.; DARADKA, H.M.; GHADA, H.J.H.A. Influence of *Cyperus esculentus* tubers (Tiger Nut) on male rat copulatory behavior. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v 15, 331-335, 2015.
- ARAFAT, S.M.; GAAFAR, A.; BASUNY, A.M.; SHEREEN, L.N. Chufa Tubers (*Cyperus esculentus* L.): As a New Source of Food. **World Applied Sciences Journal**, v7, 151-156, 2009.
- ARIAS-PEREZ, F.H.; ESPINOSA-CAMILO, O.L.; DOMINGUEZ-MONGE, S. New host of *Cyrtomenus crassus* Walker in the Central Valley of Mexico. **Southwestern Entomologist**, v42, 601-604, 2017.
- BADO, P.S.; BAZONGO, P.; SON, G.; KYAW, M.T.; FORSTER, B.P.; NIELEN, S.; LYKKE, A.M.; OUÉDRAOGO, A.; BASSOLÉ, I.H.N. Physicochemical characteristics and composition of three morphotypes of *Cyperus esculentus* tubers and tuber oils. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v2015, 2015.
- CODINA-TORRELA, I.; GUAMIS, B.; FERRAGUT, V. Potential application of ultra-high pressure homogenization in the physico-chemical stabilization of tiger nuts' milk beverage. **Innovative Food Science & Emerging**, v40, 42-51, 2017.
- COSTA, N.J.; OLIVEIRA, S.C.; SILVA, S.F.; PACHECO, A.L.; ABREU, M.C.; CAVALCANTE, A.M.; FERREIRA, P.P. Technological and therapeutic potential of *Calotropis procera*. **Revista GEINTEC**, v5, 2222- 2236, 2015.
- FOLLAK, S.; BELZ, R.; BOHEREN, C.; CASTRO, O.; ESSL, F. Biological flora of Central Europe: *Cyperus esculentus* L. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v23, 33-51, 2016.

- GONÇALVES, B. BASTOS, E. HANNA, S. Prospecção tecnológica de fungos endófitos e aplicações na indústria farmacêutica. **Caderno de Prospecção**, v10, 56-67, 2017.
- GUSMAN-KANTUN, S.; ESPINOSA-CAMILO, O.L.; CAMPOS-FIGUEIROA, M. New report of *Phenacoccus solani* Ferris on *Cyperus esculentus* L. in the Valley of Mexico. **Southwestern Entomologist**, v42, 305-308, 2017.
- HAMDY, S.M.; SHABAAN, A.M.; LATIF, ABDEL, M. Protective effect of hesperidin and tiger nut against acylamide toxicity in female de rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v69, 580-588, 2017.
- HOLM, L.G., PLUCKNETT, D.L., PANCHO, J.V., HERBERGER, J.P. **The World's Worst Weeds**. Krieger Publishing Company, Florida.Holt, J.S., Orcutt, D.R., 1991
- JING, S.; OUYANG, W.; REN, Z.; XIANG, H.; MA, Z. The in vitro and in vivo antioxidant properties of *Cyperus esculentus* oil from Xinjiang, China. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v93, 1505-9, 2013.
- JING, S.; WANG, S.; Dynamic high pressure microfluidization-assisted extraction and bioactivities of *Cyperus esculentus* (*C. esculentus* L.) leaves flavonoids. **Food Chemitry**, 192, 316-327, 2016.
- JOHNSON, W.C.; WAY, T.R.; BEALE, D.G. An undergraduate student project to improve mechanical control of perennial nutsedges with a peanut digger in organic crop production. **Weed Thechnology**, v29, 861-867, 2015.
- KISSMAN, K.G. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF, 1997.
- LIMA, D.F.; SILVA, R.A.; MARQUES, L.A.; VÉRAS, L.C.; SIMÕES, E.B; LEITE, J.A.1; SANTOS, M.C; PESSOA, C. Technological forecasting of jaborandi (*Pilocarpus Microphyllus*): economically important specie in the north and northeast of Brazil. **Revista GEINTEC**, v5, 1626-1638, 2015.
- LIMA, A.M.C. Panorama do desenvolvimento tecnológico do *Morinda citrifolia* L. no período de 2006 a 2016. **Caderno de Prospecção**, v9, 316-322, 2016.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas**, Nova Odessa, SP, Inst. Plantarum, 2008.
- MATOS, F.J.A.; CAVALCANTI, F.S.; PARENTE, J.P. Estudo agrônômico qualitativo e quantitativo de *Cyperus esculentus* L. (junça) - Uma fonte inexplorada de alimento energético. **Revista de Ciências Agrônômica**, v39, 124-129, 2008.
- MELLO, S.C.M. **Fungos e seus metabolitos no controle de tiririca**. Emprapa: Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003.
- MEYERS, S.; SHANKLE, M.W. Na evaluation of pre-emergence metam-potassium and s-metolachlor for yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*) management in sweetpotato. **Weed Technology**, v31, 436-440, 2017.
- MHLANGA, B.; CHEESMAN, S.; CHAUHAN, B.S.; THIERFELDER. Weed as affected by maize (*Zea mays* L.)- cover crop rotations in contrasting arable soils of Zimbabwe under conservation agriculture. **Crop Protection**, v81, 47-56, 2016.
- MUELLER, Suzana Pinheiro Machado; PERUCCHI, Valmira. Universidades e a produção de patentes: tópicos de interesse para o estudioso da informação tecnológica. **Perspectivas em Ciência da Informação**, v 19, 15-36, 2014.

- OKYEREA, C.A.A.; ODAMTTENB, G.T. Physicochemical, functional and sensory attributes of milk prepared from irradiated tiger nut (*Cyperus esculentus* L.) **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v7, 583–588, 2014.
- OLADELE, A.K.; AINA, O. Chemical composition and functional properties of flour produced from two varieties of tiger nut (*Cyperus esculentus*). **African Journal of Biotechnology**, v6, 2473–2476, 2007.
- OLIVEIRA JR., R.S; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. **Biologia e Manejo de Plantas Daninhas**. Omnipax Editora, 2011.
- PRAKASH, N.; RAGAVAN, B. Phytochemical observation and antibacterial activity of *Cyperus esculentus* L. **Ancient Science of Life**, v28,16-20, 2009.
- RUBERT, J.; MONFORTE, A.; HURKOVA,K. Untargeted metabolomics of fresh and heat treatment tiger nut (*Cyperus esculentus* L.) milks reveals further insight into food quality and nutrition. **Journal of Chromatography**, v1514, 80-87, 2017.
- SAGANUWAN , A. Tropical plants with fertility and infertility value. **Journal of the European enopause and Andropause Society (EMAS)**, v18, 195-196, 2015.
- SEUKEP, J.A.; FANKAM, A.G.; DJEUSSI , D.E.; VOUKENG, I.K.; TANKEO, S.B.; NOUMDEM, J.A.; KUETE, A.H.; KUETE , V. Antibacterial activities of the methanol extracts of seven Cameroonian dietary plants against bacteria expressing MDR phenotypes. **SpringerPlus**, v2, 2-8, 2013.
- SIMÕES, E. R. B.; MARQUES, L. G. A.; PINHEIRO, B. M.; SANTOS, M. R. C.; PESSOA, C. Technological Forecasting on Phytotherapics Development in Brazil. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, v 67,132-136, 2012.
- WANG, W.; ZHOU, W.; LIU, J.; LI, Y.; ZHANG, Y. Biodiesel production from hydrolysate of *Cyperus esculentus* waste by *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v136, 24-29, 2013.

## **CAPITULO 2**

---

*Manuscrito formatado de acordo as normas da Revista BMC Complementary and Alternative Medicine*

## CAPITULO 2 Atividade antimicrobiana e potencial antibiofilme de *Cyperus esculentus* L.

Renata Correia\*<sup>1</sup>, Regineide Xavier Santos<sup>2</sup>, Gabriele Marisco<sup>2</sup>, Cristina Pungartnik<sup>3</sup>

\*E-mail: [renatacorreiaassunção@hotmail.com](mailto:renatacorreiaassunção@hotmail.com) (R. Correia)

<sup>1</sup> Programa de Pós graduação em Biotecnologia-RENORBIO, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista-BA, Brasil

<sup>3</sup> Laboratório de Biotecnologia de Fungos, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, Brasil

### Resumo

**Introdução:** A resistência bacteriana aos antibióticos convencionais é um desafio de ordem mundial, tornando-se necessário o desenvolvimento de pesquisas nesse âmbito e a descoberta de novos compostos mais eficazes contra bactérias patogênicas. Estudos com plantas do gênero *Cyperus* tem evidenciado resultados promissores contra microrganismos patogênicos, se configurando como alternativa à resistência bacteriana. A espécie *Cyperus esculentus* tem sido utilizado na medicina tradicional e estudos fitoquímicos apontam a presença de compostos bioativos. Neste sentido, investigou a atividade antimicrobiana e antibiofilme desta planta contra bactérias patogênicas.

**Métodos:** O Screening *in vitro* de *Cyperus esculentus* foi realizado pelo método de disco-difusão. Também foi utilizada a técnica de micro diluição em caldo para avaliar atividade antibacteriana, a concentração mínima inibitória (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). A ação antibiofilme foi estudada contra *P. aeruginosa* e *S. epidermidis* através da análise da absorbância OD<sub>630nm</sub> e pelo ensaio cristal violeta. Para caracterizar o extrato e frações utilizou-se da técnica de prospecção fitoquímica e análise por HPLC-DAD.

**Resultados:** Dentre os extrato brutos testados, o da folha apresentou efeito significativo contra crescimento antibacteriano com aparecimento de halo acima de 9 mm para *S. aureus* (9 mm), *S. epidermidis* (9 mm) e *P. aeruginosa* (17 mm). As frações do extrato bruto da folha exibiram CIM entre 0,1 a 0,5 mg/mL e CBM de 0,5 e 0,75 mg/mL mostrando o potencial bactericida sobre bactéria Gram-positiva (*S. epidermidis*) e Gram-negativa (*P. aeruginosa*). A atividade antibiofilme foi exibida contra *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*, sendo a concentração de 0,3 mg/mL a que provocou maior redução de biofilme. O perfil fitoquímico se caracteriza pela presença de compostos fenólicos, esteroides e triterpenos, com predominância de compostos fenólicos. Os resultados experimentais foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três repetições.

**Conclusões:** O presente estudo evidenciou o potencial antibacteriano e antibiofilme de *Cyperus esculentus* contra bactérias patogênicas de interesse clínico, bem como a presença de compostos da classe dos flavonoides como fitoconstituente majoritário responsável pela atividade biológica da planta, e trouxe contribuições promissoras para a descoberta de novos agentes antimicrobianos.

Palavras-chave: antibacteriano, biofilme, flavonoide.

## Abstract

**Background:** Bacterial resistance to conventional antibiotics is a worldwide challenge, requiring the development of researches in this field and the discovery of new and more effective compounds against pathogenic bacteria. Studies with *Cyperus* have shown promising results against pathogenic microorganisms, becoming an alternative to bacterial resistance. *C. esculentus* has been used in traditional medicine and phytochemical studies to indicate the presence of bioactive compounds. In this regard, it was investigated the phytochemical profile, antimicrobial activity and antibiofilm of this plant against pathogenic bacteria.

**Methods:** In vitro screening of *C. esculentus* was performed by the disc-diffusion method. Broth microdilution technique was also used to evaluate antibacterial activity, minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC). The antibiofilm action was studied against *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* through OD<sub>630nm</sub> absorbance and crystal violet assay. To characterize the extract and fractions was used the technique of phytochemical prospecting and analysis by HPLC-DAD.

**Results :** The leaf of this plant showed a significant effect against antibacterial growth among the crude extracts tested, with halo appearance above 9 mm for *S. aureus* (9 mm), *S. epidermidis* (9 mm) and *P. aeruginosa* (17 mm). Fractions of crude leaf extract presented MIC between 0.1 and 0.5 mg / mL and MBC of 0.5 and 0.75 mg / mL showing the bactericidal potential on Gram-positive (*S. epidermidis*) and Gram-negative (*P. aeruginosa*). Antibiofilm activity was displayed against *P. aeruginosa* and *S. epidermidis*, with a concentration of 0.3 mg / mL promoting the greatest biofilm reduction. The phytochemical profile is characterized by the presence of phenolic compounds, steroids and triterpenes, predominating the flavonoid class compounds. Data represent the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.

**Conclusions:** This study reinforced the antibacterial and antibiofilm potential of *Cyperus esculentus* against pathogenic bacteria of clinical interest, as well as the presence of flavonoid as the major phytoconstituent responsible for the biological activity of the plant, bringing promising contributions in the discovery of new antimicrobial agents.

**Keywords:** *Cyperus esculentus*, antibacterial, antibiofilm



## Introdução

As bactérias patogênicas durante seu processo de desenvolvimento e multiplicação podem provocar doenças infecciosas e a gravidade desse transtorno no organismo depende dos fatores de virulência, estruturas, produtos ou mecanismo usados pelas bactérias para aumentar sua capacidade de causar infecção [1].

As bactérias formadoras de biofilme geralmente apresentam maior resistência aos antibióticos, maior tolerância ao sistema imunológico e melhor adaptação aos fatores ambientais [2]. Os biofilmes se caracterizam pela adesão de comunidades de microrganismos, de uma ou várias espécies, a praticamente qualquer tipo de superfície [3] e possui um papel importante no potencial virulento de patógenos [4].

Dentre as bactérias patogênicas que causam impacto na saúde pública e com alta incidência de formação de biofilmes se destacam *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*. *P. aeruginosa* é uma das principais causadoras de infecções adquiridas em ambientes hospitalares, sendo responsável por aproximadamente 10% de todas as infecções nosocomiais em todo o mundo [5]. Isolados clínicos apresentam-se multirresistentes, associados a elevados índices de morbidade/mortalidade, e devido sua diversidade metabólica e capacidade de formar biofilme é considerada um patógeno oportunista que ataca principalmente paciente imunodeprimidos [6,7]. *S. epidermidis*, é muito comum na microflora cutânea, geralmente de natureza inócua, entretanto nos últimos 20 anos essa bactéria tem sido responsável por uma variedade de infecções crônicas, principalmente em ambientes hospitalares [8], e por infecções graves em recém-nascidos e indivíduos imunocomprometidos [9].

O uso inadequado e prolongado de antibióticos está entre os fatores que tem acarretado o desenvolvimento de bactérias resistentes [10], desafiando a antibioticoterapia humana e animal [11]. A resistência às drogas convencionais, altas taxas de morbidade e mortalidade, se configura uma questão de saúde pública, pois as opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por agentes etiológicos resistentes são limitados e representam um grande desafio para o sistema de saúde [12].

A resistência de microrganismos patogênicos e o surgimento de infecções oportunistas fatais tem estimulado a pesquisa de novos agentes antimicrobianos. Nos últimos anos, tem-se intensificado o desenvolvimento de novos antibióticos, a utilização de diferentes combinações dessas drogas e a identificação de métodos de tratamento alternativos (Chatterjee et al. 2016). As substâncias oriundas de plantas estão sendo empregadas como alternativas no tratamento contra diferentes patógenos, pois produzem diversos

metabólitos bioativos, que são fontes para a síntese de drogas terapêuticas, produtos farmacêuticos e nutracêuticos [13].

*C. esculentus* L. é uma planta herbácea [14], provavelmente originária do Mediterrâneo e sudoeste da Ásia e, atualmente, é amplamente distribuída em regiões tropicais, subtropicais e temperadas em todo o mundo [15, 16]. É tradicionalmente usada como afrodisíaco, antidiurético e estimulante [17], tratar sarampo e estados febris [18]. As propriedades farmacológicas da espécie já foram relatadas, incluindo atividade antimicrobiana [19, 20], antioxidante [21, 22]. Investigações fitoquímicas iniciais realizadas anteriormente revelam a presença de carboidratos, esteroides, açúcares redutores, taninos [23] e flavonoides [24]. Portanto, considerando o potencial das plantas como fonte de compostos bioativos e como alternativa para produção de substâncias com potencial antimicrobiano, o objetivo deste estudo foi verificar o perfil fitoquímico e avaliar a atividade antimicrobiana e o potencial antibiofilme de *C. esculentus*.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Material Vegetal**

O material vegetal de *C. esculentus* (folhas, raízes e inflorescência) foi coletados em Itapetinga, Bahia (15 14 13S 40 13 39W). Exemplar da espécie foi identificado e depositado no herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia- (número HUESBVC 8201).

### **2.2. Preparação e fracionamento do extrato**

As folhas, raízes e inflorescência da planta *C. esculentus* foram submetidas a secagem em estufa com circulação de ar a 40 °C durante três dias. Em seguida o material foi macerado para obtenção do extrato etanólico por extração até a exaustão da amostra. Depois foram filtrados através de papel de filtro estéreis. O etanol foi removido em evaporador rotativo para obtenção do seguintes extratos: extrato bruto das folhas (CEL), raízes (CER) e inflorescência (CEI). Dez gramas de extrato bruto foram fracionados de acordo a metodologia de Harborne (1984), com algumas modificações, obtendo as frações cloroformio (CEL1), fração aquosa (CEL2). Por extração em fase sólida (SPE) Foram obtidas a fração etanólica (CEL3) e fração acetato de etila (CEL4) (material suplementar-Anexo). O solvente foi removido por evaporador rotativo e para o bioensaio as frações foram diluídas em dimethylsulfoxido (DMSO) a 1%.

## 2.3. Atividade antimicrobiana

### 2.3.1. Microrganismos

As bactérias utilizadas representam espécies patogênicas e consistem de cepas Gram-positiva, *Staphylococcus aureus* (ATCC25921), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC35984), e cepas Gram-negativa, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), *Escherichia coli* (ATCC25922) and *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708).

### 2.3.2. Atividade antibacteriana

Todas as culturas bacterianas foram cultivadas em ágar Mueller-Hinton a 37°C por 24 h. Os inóculos foram suspensos em 10mL de solução salina (0,9% NaCl) e ajustados para atingir uma absorvância entre 0,08 e 0,10, em densidade óptica (OD) a 630 nm (espectrofotômetro Beckman DU-70 UV-vis), representando aproximadamente  $2 \times 10^8$  CFU/mL. Os extratos brutos (CEL, CER e CEI ) foram diluídos em etanol (PA) e submetido à avaliação da atividade antibacteriana nas seguintes concentrações: 0,1; 0,5; 1,0; 1,5 mg / mL.

A atividade antibacteriana de CEL, CER e CEI foi realizada pelo método de disco-difusão adaptado de Bauer et al. [25], recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* [26], para determinação do halo de inibição de crescimento dos extratos brutos em estudo. Ação antimicrobiana foi verificada a partir do tamanho do diâmetro do halo medido em milímetro (mm) e foi considerado para extratos com zona de inibição igual ou maior que 9 mm.

Os extratos bioativos foram investigados pelo método de microdiluição em caldo a fim de avaliar a inibição do crescimento bacteriano e determinar a concentração inibitória mínima (MIC) e a concentração bactericida mínima (MBC), protocolo adaptado de Basri et al. [27]. Utilizou-se microplacas de 96 poços, sendo para cada 80µL de inóculo ( $5 \times 10^5$  UFC / mL) adicionou-se 40µL de Tryptic Soy Broth (TSB) e 80µL de CEL (concentrações 0,1–1,0mg/mL) e frações (CEL1, CEL2, CEL3, CEL4), em concentrações de 0,1–1,0 mg/mL). As soluções controles foram: (i)80µL de água salina (0,9%), 40 mL de meio TSB 80 µL do inóculo; (ii)80 µL de água destilada, 40 µL de meio TSB, 80 µL do inóculo. A atividade antibacteriana foi avaliada por leituras OD<sub>630 nm</sub> às 0 e 24 h após a inoculação. MIC foi considerado como a concentração mais baixa do composto que inibiu o crescimento bacteriano (OD <0,05 em relação ao controle) após o período de incubação. Em seguida, os valores de MBC foram determinados sub-

cultivando as amostras sem crescimento visível nos ensaios de MIC. Os resultados representam dados de no mínimo três repetições. Para determinar o efeito do extrato e frações considerou a razão MBC:MIC, sendo bacteriostático se for igual a 4, e bactericida quando é igual a 2 [Kipre et al. [28].

### 2.3.3. Atividade antibiofilme

A atividade antibiofilme do extrato bruto e da fração bioativa foi determinada de acordo o método de Antunes et al. [29], com adaptações. Utilizou-se microplaca de 96 poços contendo 80  $\mu$ L da suspensão bacteriana, 80  $\mu$ L extrato (concentração de 0,1-1,0 mg/mL nos poços) e 40 $\mu$ L de TSB. Após 24hs de incubação, o conteúdo foi removido e os poços lavados três vezes com solução salina estéril. As bactérias restantes foram fixadas utilizando metanol por 15 min. O biofilme formado foi corado com cristal violeta (0,4%) por 15 min à temperatura ambiente. Para determinação da formação do biofilme utilizou-se a densidade óptica (OD) de 630 nm. O controle representa 100% da formação de biofilme e resultados inferiores 100% representam a diminuição da sua formação.

### 2.4. Análise fitoquímica

O extrato bruto e a fração bioativa (CEL4) de *C. esculentus* foram submetidos à triagem química qualitativa, por ensaio colorimétrico, para identificação das classes alcalóides (teste de Mayer), compostos fenólicos ( $\text{FeCl}_3$  como reagente), saponinas (índice de formação de espuma), antraquinonas (teste de Borntraeger) e terpenos (reação de Lieberman-Burchardr).

### 2.5. Caracterização da fração bioativa por cromatografia líquida (LC-DAD)

O trabalho foi conduzido em Cromatógrafo Shimadzu Proeminence-i LC2030C-3D, equipado com coluna Phenomenex Luna (II)<sup>®</sup> C18 (250 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m) e com detecção por arranjo de diiodo (HPLC-DAD). As amostras foram injetadas em volumes de 10  $\mu$ L. A fase móvel utilizada consistiu numa mistura isocrática entre acetonitrila e água, acidificado com 0,04% de TFA, (15:85, v/v), vazão constante de 1 mL min<sup>-1</sup> e temperatura mantida a 40 °C durante o período da análise.

### 2.6. Análise estatística

Os resultados experimentais foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (SD) de três repetições. Onde aplicável, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e diferenças entre amostras foram determinadas pelo teste Tukey. Valores de p <0.05

foram considerados estatisticamente significativo. O desvio padrão e as análises estatísticas foram calculados pelo programa GraphPad Prism.

### 3. Resultado

#### 3.1. Atividade antibacteriana

O screening da atividade antimicrobiana dos extratos brutos da folha (CEL), raiz (CER) e inflorescência (CEI) de *C. esculentus*, foi realizado através do método disco-difusão e está representado na Tabela 1. Os resultados revelaram que apenas o CEL apresentou bioatividade satisfatória, com formação de halos de inibição para *S.epidermidis*, *S.aureus* e *P. aeruginosa*.

Tabela 1: Zona de inibição do extrato bruto de *Cyperus esculentus* contra cepas bacterianas.

Bacterial strains	Inhibitions halo (mm)		
	CEL	CER	CEI
Gram-positive			
<i>S.epidermidis</i>	9.33±0.57 <sup>b</sup>	5.33±1.52 <sup>b,c,d,e</sup>	7.66±1.52 <sup>b,c,d</sup>
<i>S.aureus</i>	9.33±1.15 <sup>b</sup>	4.33±1.52 <sup>c,d,e</sup>	6.00 ±1.00 <sup>b,c,d,e</sup>
Gram-negative			
<i>K. pneumoniae</i>	3.66±0.57 <sup>d,e</sup>	3.00±1,00 <sup>e</sup>	3.66±1.52 <sup>d,e</sup>
<i>P. aeruginosa</i>	17.66±2.51 <sup>a</sup>	4.33±1.52 <sup>d,e</sup>	4.00±1.00 <sup>d,e</sup>
<i>S. Choleraesuis</i>	3.33±1.15 <sup>e</sup>	2.33±0.57 <sup>e</sup>	3.33±1.15 <sup>e</sup>
<i>E. coli</i>	2.33±1.52 <sup>e</sup>	3.00±1.73 <sup>e</sup>	2.66±1.15 <sup>e</sup>

CEL (extrato bruto da folha); CER (extrato bruto da raiz); CEI (extrato bruto da inflorescência). Os resultados representam a média ± padrão desvio de três experimentos independentes e valores com letras diferentes, na mesma linha, são estatisticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

Apenas o extrato que apresentou atividade antimicrobiana para a maioria das cepas testadas e halos de inibição iguais ou maiores que 9 mm, o CEL, foi submetido ao teste de microdiluição em caldo para avaliação do crescimento bacteriano e determinação da concentração inibitória mínima (MIC). Os resultados demonstraram que o CEL provoca inibição do crescimento bacteriano de *P. aeruginosa* (Figura 1), *S. epidermidis* e *S. aureus* (Figura 2). Foi observado MIC na faixa entre 0,5 e 1,0 mg/mL para *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, e de 0,25 mg/mL para *S. aureus*.

Os resultados de microdiluição em caldo foram analisados utilizando Análise de Variância (ANOVA), indicando que há diferença significativa na sensibilidade dos microrganismos testados ( $p < 0,05$ ).

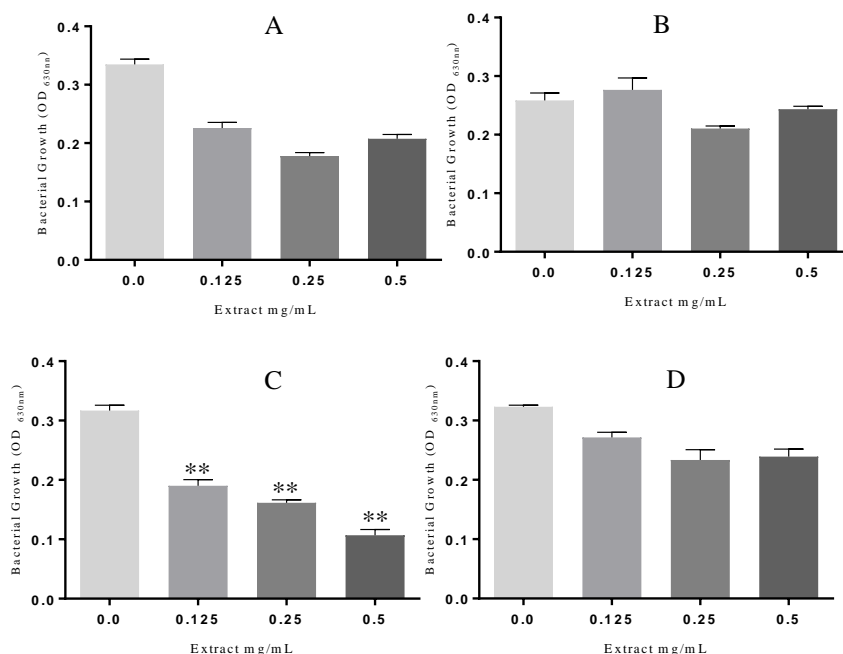


Figura 1. Atividade antimicrobiana do extrato bruto das folhas de *C. esculentus* contra bactéria gram-negativa. A: *K. pneumoniae*; B: *S. Choleraesuis*; C: *P. aeruginosa*; D: *E. coli*.

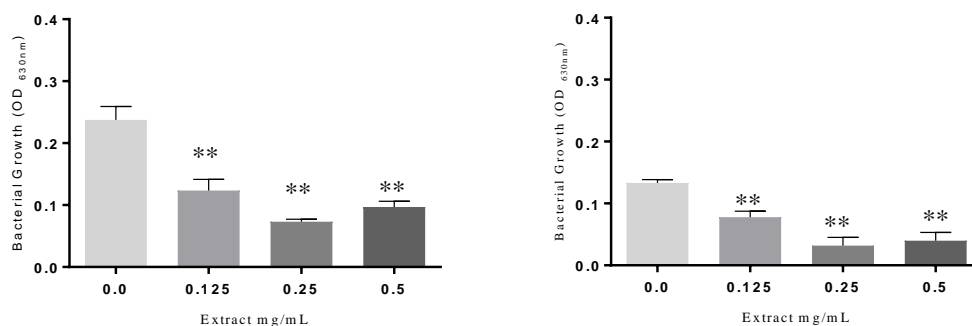


Figura 2. Atividade antimicrobiana do extrato bruto das folhas de *C. esculentus* contra bactéria gram-positiva. A: *S. epidermidis*; B: *S. aureus*.

Somente o extrato bruto bioativo (CEL) foi fracionado e obteve-se quatro frações (CEL1, CEL2, CEL3, CEL4), que foram testadas frente às bactérias mais sensíveis ao CEL (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*). A CEL1 apresentou MIC de 0,10mg/mL para *S. epidermidis*, de 0,25 mg/mL para *P. aeruginosa* e valores maiores que 0,6 mg/mL para *S. aureus*. Já os valores de CEL4 foram de 0,35 mg/mL para *P. aeruginosa* e de 0,50 mg/mL para *S. epidermidis* e para *S. aureus*, maior que 0,6 mg/mL. Dentre as frações avaliadas apenas a CEL4 demonstrou efeito bactericida frente *P. aeruginosa* e *S. epidermidis* (Tabela 2)

Tabela 2. Concentração mínima inibitória (MIC) e concentração bactericida mínima (MBC) do extrato e frações da folha de *C. esculentus* contra cepas patogênicas (mg/mL).

Extrato	<i>P. aeruginosa</i>				<i>S. epidermidis</i>				<i>S. aureus</i>			
	MIC	MBC	MBC/ MIC	Efeito	MIC	MBC	MBC/ MIC	Efeito	MIC	MBC	MBC/ MIC	Efeito
CEL	>0.50±1.15	-	nd	Nd	>0.50±0.57	nd	Nd	Nd	0.25±1.00	0.75±1.00	3	Bacteriostático
CEL1	0.25±1.53	0.50±1.00	2	Bactericida	0.10 ±1.68	0.50 ±1.00	5	Bacteriostático	>0.60±1.10	Nd	nd	nd
CEL2	-	-	nd	Nd	-	-	Nd	Nd	-	-	nd	nd
CEL3	-	-	nd	Nd	-	-	Nd	Nd	-	-	nd	nd
CEL4	0.35±1,25	0.50±1.37	2	Bactericida	0.50 ±1.00	0.75 ±1.54	1	Bactericida	>0.60±0.90	-	Nd	nd

CEL1 = Fração clorofórmio; CEL2 = Aqueous fraction; CEL3 = Fração etanol; CEL4 = Fração acetato de etila. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão (SD) de três experimentos independentes. (ANOVA e Turkey test). Valores com letras diferentes são significativamente diferentes em  $p < 0,05$ . nd: não determinado; MIC:  $\geq 1$  mg/mL.

### 3.2. Atividade antibiofilme

Para avaliação do potencial antibiofilme foi considerado apenas CEL4, fração que apresentou ação bactericida contra bactéria Gram-positiva (*S. epidermidis*) e Gram-negativa (*P. aeruginosa*). Foi evidenciado que CEL4 tem ação antibiofilme contra *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*, sendo a concentração de 0,3 mg/mL a que provocou maior redução de biofilme (Figura 3).

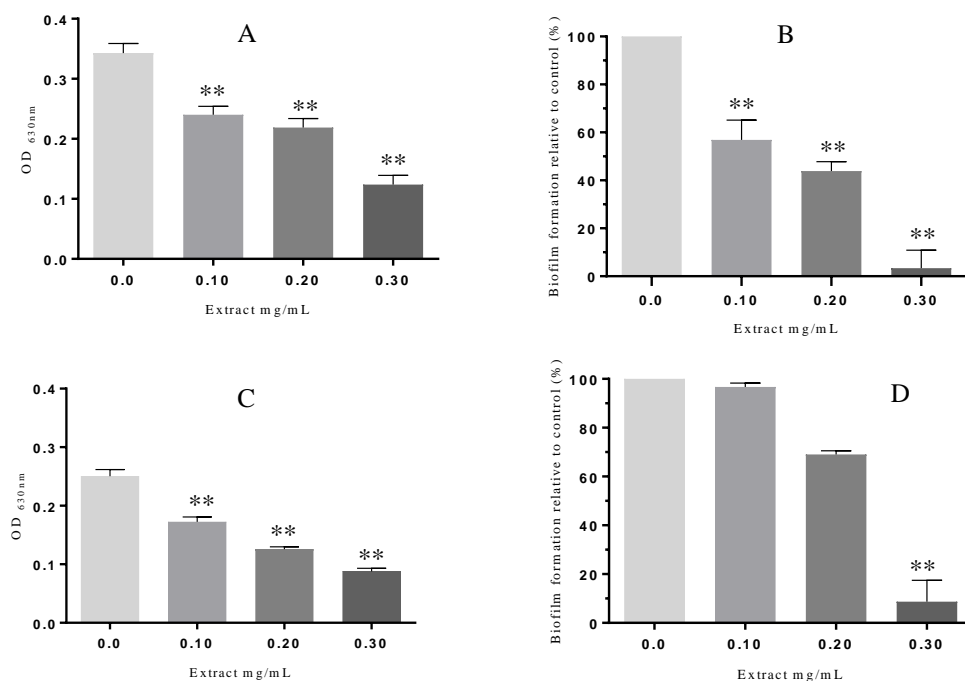


Figura 3: Atividade antibiofilme da fração CEL4 contra *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*. (A) Crescimento de *S. epidermidis* (ATCC35984) exposto à fração CEL4 (ATCC35984); (B) Formação de biofilme de *S. epidermidis* \*\*  $P < 0.01$  relativo ao controle (100%); (C) Crescimento de *P. aeruginosa* (ATCC27853) exposto à fração; (D) Formação de biofilme de *P. aeruginosa* \*\*  $P < 0.01$  relativo ao controle (100%).

### 3.3 Análise fitoquímica do extrato e frações bioativas

O CEL e as frações bioativas foram submetidos a diferentes ensaios colorimétricos (Tabela 3). A presença de compostos fenólicos, esteroides ou terpenos e ausência de saponinas e alcaloides foi observada em CEL e CEL1. A fração CEL4 foi positiva para flavonoides (Tabela 3).



**Tabela 03:** Screening fitoquímico do extrato bruto das folhas de *Cyperus esculentus* e frações bioativas.

Metabolitos	Extrato/Frações		
	CEL	CEL1	CEL4
Alcaloides	-	-	-
Flavonoides	+	+	+
Fenois/Taninos	+	-	-
Saponinas	+	-	-
Triterpenoides/Esteroides	+	+	-
Antraquinonas	-	-	-

Para tentar correlacionar a atividade antibiofilme com uma classe de metabólitos, a fração CEL4 foi analisada por HPLC-DAD e dados observados estão apresentados na figura 4. O perfil cromatográfico de CEL4 e os espectros na região UV do pico 4 e 5 obtidos para CEL4, apresentam máximos de absorção característicos de compostos da classe dos flavonoides, e representam 55,07% dos compostos registrado no cromatograma.

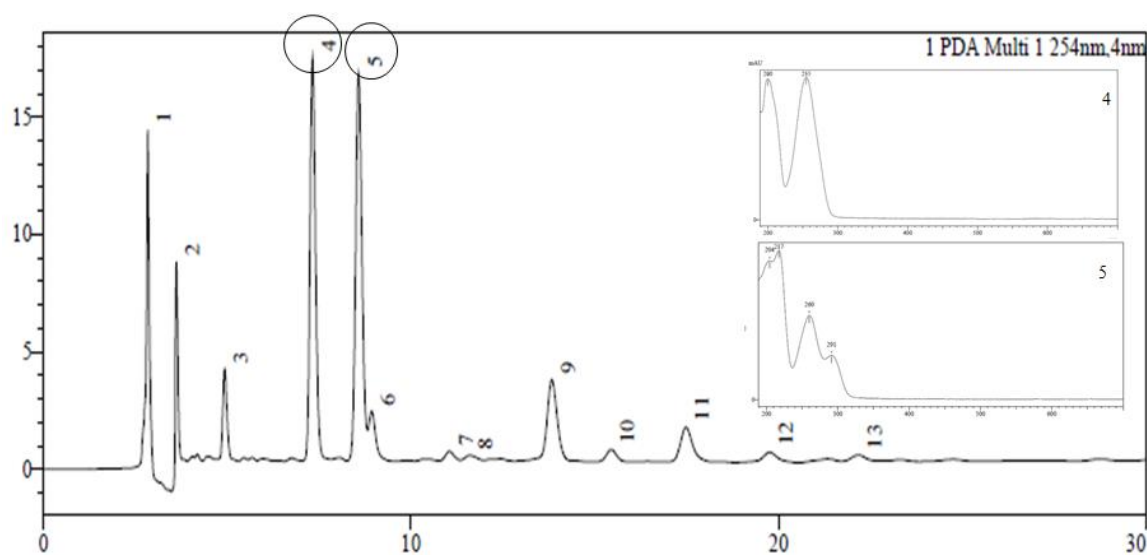


Figura 4: Cromatograma HPLC-DAD da fração CEL4 e espectros ultravioleta dos picos majoritários (4, 5).

#### 4. Discussão

O resultado deste estudo indicou que *C. esculentus* possui atividade contra bactérias patogênicas. A triagem por disco-difusão revelou que o CEL apresentou efeito antimicrobiano contra as bactérias *S. epidermidis* e *S. aureus* (Gram-positiva) e *P. aeruginosa* (Gram-negativa) (Tabela 1).

Extratos do tubérculo de *C. esculentus* foram avaliados por Prakash e Ragavan [30] pelo método de disco-difusão, utilizando como critério halos entre 10 e 15 mm, para

substância ativa, e entre 15-20 mm para compostos com atividade máxima antibacteriana. E corroborando com o presente estudo também apresentaram ação contra *P. aeruginosa*. Utilizando esses mesmos critérios pode-se inferir que o extrato CEL exibe máxima atividade antibacteriana (halo=17,66±2,51). Jing et al. [20] também evidenciou inibição de crescimento bacteriano por *C. esculentus* pelo método de disco-difusão, avaliando o efeito de flavonóides de folhas contra *Bacillus subtilis* (11,90 ± 0,12 mm) e *E. coli* (9,70 ± 0,09 mm).

Resultados que indicam diferenças na sensibilidade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas frente a extratos vegetais é esperado, pois segundo Elisha et al. [10] as respostas dessas bactérias a metabólitos vegetais podem variar devido à diferenças na estrutura da parede celular. As bactérias Gram-negativas possuem camada lipossacarídica externa que formam uma barreira de permeabilidade, tornando a parede celular impermeável a solutos lipossolúveis [31,32]. Neste sentido, extratos mais polares como CEL tendem apresentar atividade mais promissora contra bactérias Gram-negativas, o que pode ser corroborado nos testes fitoquímicos positivos para compostos polares (Tabela 3). Além disso, Moreno et al. [33] afirmam que técnica de disco-difusão favorece a bioatividade de compostos mais polares.

O comportamento de cepas patogênicas frente ao CEL e frações (CEL1, CEL2, CEL3, CEL4) foram avaliados pelo método de microdiluição em caldo confirmando a sensibilidade de *S.epidermidis*, *S.aureus* e *P. aeruginosa* (Figura 1 e 2; Tabela 2).

*S.epidermidis* e *P. aeruginosa* se mostraram mais sensíveis às frações do CEL, evidenciado que fracionamento do extrato (CEL1 e CEL4) foi mais vantajoso para inibir o crescimento dessas bactérias, provavelmente devido à concentração dos compostos após o fracionamento. Entretanto, esse comportamento não foi observado para *S.aureus*. A atividade inibitória das frações frente a *S.aureus* (MIC > 0,6 mg/mL) foi inferior ao efeito provocado pelo CEL (Tabela 2), provavelmente esse resultado está relacionado a sinergia e associação da ação dos fitoconstituintes presentes no extrato bruto [34]. Esse efeito sinérgico com extratos de plantas pode ser observado em outros trabalhos como de Anantaworasakul et al. [35], Naksuriya e Okonogi [36], Santos et al. [37].

CEL1 foi a fração que apresentou melhores valores de MIC seguida de CEL4 (Tabela 2). Resultados evidenciaram que *C. esculentus* apresenta atividade antibacteriana para agentes patogênicos de importância médica. Sendo assim, os compostos fitoquímicos dessa planta podem ser considerados potencialmente úteis para desenvolvimento de

agentes antimicrobiano. Substâncias com valores de MICs inferiores a 8 mg/mL tem ótimo potencial para aplicação terapêutica [38].

Também foi observado no presente estudo que a fração CEL4 apresentou razão MBF:MIC mais vantajosa, exibindo ação bactericida contra *S.epidermidis* e *P. aeruginosa* (Tabela 2), evidenciando seu efeito na mortalidade de espécies patogênicas Gram-positiva e Gram-negativa, em concentrações abaixo de 0,5 mg/mL.

A atividade antibacteriana de *C. esculentus* também foi evidenciada em outros trabalhos. Jing et al. [20] verificou ação antimicrobiana contra bactérias patogênicas, *B. subtilis* e *E. coli*. Resultados semelhantes foram obtidos por Seukep et al. [19] com extrato dos frutos contra *E. coli* resistente múltiplas drogas (MDR). Entretanto, considerando o método de microdiluição em caldo, o presente trabalho traz os primeiros resultados referentes à atividade antibacteriana de *C. esculentus* frente a *S.epidermidis*, *S.aureus* e *P. aeruginosa*, uma vez que esses microrganismos estão associados à incidência de infecções graves e resistência microbiana.

O potencial antibacteriano também foi atribuído à espécie do mesmo gênero, o *Cyperus rotundus*. Utilizando a mesma metodologia de avaliação do crescimento bacteriano, Dakook et al. [39] confirmaram ação do extrato da parte aérea de *C. rotundus* contra *B. subtilis*, *S.aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, e Muthu et al. [40] verificaram que as três frações do tubérculo que foram analisadas possuem ação contra cepas MDR de *P. aeruginosa*, associando os resultados obtidos ao fitoconstituintes presentes nas frações. Os testes fitoquímicos realizados por Muthu et al. [40] revelam a presença de esteroides, triterpenoides, compostos fenólicos, flavonoides, metabólitos secundários relacionados com ação antimicrobiana e antibiótica [41, 42,43]. Perfil fitoquímico semelhante ao das frações bioativas testadas no presente estudo (Tabela 3). Neste sentido, o extrato bruto das folhas de *C. esculentus* e suas frações possuem fitoquímicos potencialmente ativos contra bactérias patogênicas de grande interesse clínico.

Para avaliação da atividade antibiofilme foi considerada apenas a fração CEL4 devido ao seu efeito bactericida contra bactérias formadoras de biofilme, pois de acordo com Trentin et al. [44] uma das estratégias utilizadas para investigar a inibição da formação de biofilme é uso de compostos bactericidas. Os dados obtidos demonstraram a capacidade da CEL4 impedir a colonização microbiana de *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*, e conseqüentemente, o potencial de *C. esculentus* como fonte de compostos antivirulentos. Os resultados indicaram que a inibição do biofilme em *S. epidermidis* é dependente da concentração da fração e é proporcional à redução do

crescimento bacteriano. Resultados similares à redução do biofilme dependente da concentração foi observado por Saito et al. [45], Araújo et al [46] e Sivaranjani et al. [47] ao analisar o efeito de compostos vegetais em biofilme de *S. epidermidis*. Em *P. aeruginosa* não foi observado esse comportamento, apesar das concentrações testadas terem provocado inibição do crescimento, apenas a concentração de 0,30 mg/mL apresentou potencial antibiofilme (Figura 3). Os resultados apresentados neste estudo estão em consonância com pesquisas que confirmam atividade antibiofilme eficiente de compostos de origem vegetal contra *P. aeruginosa* e *S. epidermidis* [47,48, 49, 50]. Até o momento são os primeiros relatos sobre atividade antibiofilme de *C. esculentus* frente a *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*.

Os dados revelam que CEL4 mostrou atividade antibiofilme e melhor desempenho bactericida, sendo considerada a fração bioativa. Sugere-se que o potencial antimicrobiano pode ser atribuído a ação de compostos da classe dos flavonoides, uma vez que os cromatogramas obtidos (Figura 4) indicam a presença deste metabolito. Jing et al. [20] estudando *C. esculentus* também identificou a presença de flavonoides nas folhas da planta e relacionou a este composto o efeito antibacteriano observado frente *Bacillus subtilis* e *E. coli*. Os flavonoides são compostos fenólicos e apresentam atividade antimicrobiana [43, 51, 52]. Esse potencial deve-se, provavelmente, à sua capacidade em formar complexos com proteínas solúveis e com a parede celular das bactérias [53], ou ainda podem romper a membrana microbiana, devido sua característica lipofílica [54,55].

Atividade antibiofilme em *S. epidermidis* também já tem sido associada à compostos fenólicos [50]. Resultado semelhante foi descrito por Al-Dhabi et al. [56], ao considerar que esses metabolitos são os responsáveis pela inibição de biofilme em *P. aeruginosa*. De acordo Pirzada et al. [57] estes compostos tem efeito tóxico sobre o crescimento e desenvolvimento de patógenos. Vikram et al. [58] considera que eles tem a capacidade de suprimir a atividade autoindutor, um sistema de sinalização responsável pela comunicação célula-a-célula.

## **5. Conclusão**

O extrato bruto da folha e frações (CEL1, CEL4) de *C. esculentus* inibiu o crescimento de bactérias patogênicas (*P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. epidermidis*), mostrando propriedades antimicrobianas em relação às bactérias Gram-positiva e Gram-negativa. A fração CEL4 exibiu significativa atividade antibiofilme contra *P. aeruginosa* e *S.*

*epidermidis*. O efeito antimicrobiano observado foi atribuído a compostos da classe dos flavonoides.

O presente estudo revelou resultados promissores sobre propriedades antibacteriana e antibiofilme de *C. esculentus* contra bactérias responsáveis por quadro infecciosos graves, pioneiro nas pesquisas sobre potencial antibiofilme de *C. esculentus* contra as bactérias *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*.

Os resultados revelam o potencial da planta como fonte de compostos bioativos com atividade antimicrobiana e trazem perspectivas para estudos relacionados ao isolamento e elucidação de moléculas ativa, bem como, voltados para o mecanismo de ação do extrato/frações.

## 6.Referências

- [1] Madigan, MT, Martinko, JM, Stahl. DA, Clark, DP. Brock biology the microorganisms. Int. Microbiology, 13 th ed, 2012.
- [2] Chessa, L, Pusino, A, Garau, G, Mangia, NP, Pinna, MV. Soil microbial response to tetracycline in two different soils amended with cow manure. Environmental Science and Pollution Research 2016, v23: 5807–5817.
- [3] Liao, J, Sauer, K. The MerR-Like regulator BrIR contributes to *Pseudomonas aeruginosa* biofilm tolerance. Journal of Bacteriology 2012, v194: 4823–4836.
- [4] Visick, KL, Schembri, MA, Yildiz, F, Jean-Marc, G, Higod, J. Biofilms 2015: Multidisciplinary Approaches Shed Light into Microbial Life on Surfaces. Journal of Bacteriology , 2016., v198: 2553-2563.
- [5] Chatterjee, M, Anju, CP, Biswas, L, Kumar, VA, Mohan, CG. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. International Journal of Medical Microbiology 2016, v306: 48-58.
- [6] Zhao, WH, HU, ZQ. Beta-lactamase indentified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Critical Reviews in Microbiology 2010, v36: 245-258.
- [7] Abdelghany, S.M. Quinn, D.J., Ingram, R.J. Gilmore, B.F., Donnelly, R.F.; Taggart, C.C.; Scott, C.J. Gentamicin-loaded nanoparticles show improved antimicrobial effects towards *Pseudomonas aeruginosa* infection. International Journal of Nanomedicine 2012, v7: 4053-4063.
- [8] Wojtyczka, RD, Orlewska, K, Kępa, M, Idzik, D, Dziedzic, A, Mularz, T, Krawczyk, M, Mikłasińska, M, Wąsik, TJ. Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* Strains from a Hospital Environment. International Journal of Environmental Research and Public Health 2014, v 11: 4619-4633.
- [9] Freitas, AS, Vasconcelos, C, Vilanova, M, Cerca, N. Optimization of an automatic counting system for the quantification of *Staphylococcus epidermidis* cells in biofilms. Journal of Basic Microbiology 2014, v54: 750-757.
- [10] Elisha, LI, Botha, FS, McGaw, LJ, Eloff, JN. Teh antibacterial activity of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. BMC Complementary Alternative Medicine 2017, v17.
- [11] Carvalho, AF, Silva, DM, Silva, TRC, Scarcelli, E, Manhani, MR. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 2014.
- [12] Neidell, MJ, Cohen, B, Furuya, Y, Hill, J, Jeon, CY, Glied, S, Larson, EL. Costs of healthcare and community-associated infections with antimicrobial-resistant versus antimicrobial-susceptible Organisms. Costs of Drug-Resistant Infections 2012, v55.
- [13] Newman, DJ, Cragg, GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. Journal of Natural Products 2007, v70: 461-77.

- [14] Lorenzi, H. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas, Nova Odessa, SP, Inst. Plantarum, 2008.
- [15] Holm, LG, Plucknett, DL, Pancho, JV, Herberger, JP. The World's Worst Weeds. Krieger Publishing Company, Florida. Holt, J.S., Orcutt, D.R., 1991.
- [16] Follak, S, Belz, R, Boheren, C, Castro, O, Essl, F. Biological flora of Central Europe: *Cyperus esculentus* L. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 2016, v23: 33-51.
- [17] Adejuyitan, A. Tigernut processing: its food uses and health benefits. American Journal of Food Technology 2011, v6, 197–201.
- [18] Matos, FJA, Cavalcanti, FS, Parente, JP. Estudo agronômico qualitativo e quantitativo de *Cyperus esculentus* L. (junça) - Uma fonte inexplorada de alimento energético. Revista de Ciências Agronômica 2008, v39: 124-129.
- [19] Seukep, JA, Fankam, AG, Djeussi, DE, Voukeng, IK, Tankeo, SB, Noumdem, JA, Kuete, AH, Kuete, V. Antibacterial activities of the methanol extracts of seven Cameroonian dietary plants against bacteria expressing MDR phenotypes. SpringerPlus 2013, v2 : 2-8.
- [20] Jing, S, Wang, S. Dynamic high pressure microfluidization-assisted extraction and bioactivities of *Cyperus esculentus* (*C. esculentus* L.) leaves flavonoids. Food Chemistry 2016, 192: 316-327.
- [21] Badejo, AA, Olawoyin, B, Salawu, SO. Antioxidative potentials and chromatographic analysis of beverages from blends of gluten-free (*Digitaria exilis*) and tigernut (*Cyperus esculentus*) extracts. Journal of Food measurement and characterization 2017, v11: 2094-2101.
- [22] Hamdy, S.M.; Shabaan, A.M.; Latif, Abdel, M. Protective effect of hesperidin and tiger nut against acylamide toxicity in female rats. Experimental and Toxicologic Pathology 2017, v69: 580-588.
- [24] Adeniyi, TA, Adeonipekun, PA, Omotayo, EA. Investigating the Phytochemicals and Antimicrobial Properties of Three Sedge (Cyperaceae) Species Tiwalade Adeyemi. Notulae Scientia Biologicae 2014: 276-281.
- [25] Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology 1966; v45, 493-106.
- [26] CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 17 ed. 2007. CLSI document M100-S17.
- [28] Kipre, GG, Guessennd, NK, Koné, MW, Gbonon, V, Coulibaly, JK, Dosso, M. Antibacterial activity of the stem bark of *Tieghemella Hecelli* Pierre ex. Chev against methicillin-resistant *Syaphylococcus aureus*. BMC Complementary and Alternative Medicine 2017,17:170.

- [29] Antunes AL, Trentin DS, Bonfanti JW, Pinto CC, Perez LR, Macedo, AJ, Barth AL. Application of a feasible method for determination of biofilm antimicrobial susceptibility in *Staphylococci*. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 2010, v 118: 873–877.
- [30] Prakash, N, Ragavan, B. Phytochemical observation and antibacterial activity of *Cyperus esculentus* L. *Ancient Science of Life* 2009, v28,16-20.
- [31] Wallace, J. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of Nutrition Society* 2009, v63 (4): 621-629.
- [32] Forsythe SJ. *Microbiology of food safety*. 2. ed. Porto Alegre, Artmed, 2013.
- [33] Moreno S, Scheyer T, Romano CS, Vojnov AA. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research* 2006; 40: 223-231.
- [34] Yunes RA, Pedrosa RC, Cechinel V. Drugs and phytotherapies: the need for the development of the phytotherapeutic and phytopharmaceutical industry in Brazil. *New Chemistry* 2001; 4: 147-52.
- [35] Anantaworasakula P, Hamamoto H, Sekimizub H, Okonogia S. *In vitro* antibacterial activity and in vivo therapeutic effect of *Sesbania grandiflora* in bacterial infected silkworms. *Pharmaceutical biology* 2017; 55 (1): 1256–1262.
- [36] Naksuriya O, Okonogi S. Comparison and combination effects on antioxidant power of curcumin with gallic acid, ascorbic acid, and xanthone. *Drug Discoveries & Therapeutics* 2015; (2): 136- 141.
- [37] Santos RX, Oliveira DA, Sodr e GA, Gosmann G, Brendel M, Pungartnik C. Antimicrobial activity of fermented *Theobroma cacao* pod husk extract. *Genetics and Molecular Research* 2014; 13(3):7725-35.
- [38] Fabry W, Okemo PO, Ansorg R. Antibacterial activity of East African medicinal plants. *Journal Ethnopharmacology* 1998; 60: 79-84.
- [39] Dadook M, Mehrabian S, Irian S. Antimicrobial Effect of *Cyperus rotundus* on multiple drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Journal of Medical Bacteriology* 2016; 5 (1, 2): 15-20.
- [40] Muthu K, Hema M, Nagaraj S, Rengasamy R. *In-vitro* antibacterial potential, Phytochemical characterization of *Cyperus rotundus* flower extract. *International Journal of Natural Products Research* 2014; 4(1): 6-8.
- [41] Sim oes CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5a ed. Florian polis: Editora da UFSC; 2004.
- [42] Teffo LS, Aderogba MA, Eloff JN. Antibacterial and antioxidant activities of four kaempferol methyl ethers isolated from *Dodonaea viscosa* Jacq. var. *angustifolia* leaf extracts. *South African Journal of Botany*. 2010; 76:25-29.
- [43] Araruna MK, Brito AS, Morais-Braga MF, Santos KK, Souza TM, Leite TR. Evaluation of antibiotic and antibiotic modifying activity of pilocarpine and rutin. *The Journal of Medical Research* 2012;135(2):252-254.



- [44] Trentin, DS, Giordani, RB, Macedo, AJ. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato*, Novo Hamburgo, 2013; 14 (22):113-238.
- [45] Saito ST, Trentin DS, Macedo, AJ, Pungartnik, C, Grace Gosmann, G, Silveira, JD, Guecheva, TN, Henriques, JP, Brendel, M. Bioguided fractionation shows *Cassia alata* extract to inhibit *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* growth and biofilm formation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012.
- [46] Araujo AR, Quelemes PV, Perfeito MLG, Lima LI, Sá MC, Nunes PHM, Joanitti GA, Eaton P, Soares MJS, Leite JR, Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Terminalia fagifolia* Mart. extract and fractions. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2015; 14:25.
- [47] Sivaranjani, M, Prakash, M, Gowrishankar, S, Rathna, R, Pandian, SK, Ravi, AV. *In vitro* activity of alpha-mangostin in killing and eradicating *Staphylococcus epidermidis* RP62A biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017.
- [48] Silva, LN, Trentin, DS, Zimmer, KR, Treter, J, Brandelli, CLC, Frasson, AP, Tiana, T, Silva, AG, Macedo, AJ. Anti-infective Brazilian Caatinga plants Anti-infective effects of Brazilian Caatinga plants against pathogenic bacterial biofilm formation. *Pharmaceutical Biology*, 2015; 53(3): 464–468.
- [49] Sánchez, E, Morales, CR, Castillo, S, Leos-Rivas, C, García-Becerra, L, Martínez, DMO. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Methanolic Plant Extracts against Nosocomial Microorganisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2016.
- [50] Trentin, DS, Giordani, RB, Zimmer, KR, Silva, AG, Correia, MTS, Baumvol, IJR, Macedo, AJ. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region Caatinga against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *Journal of Ethnopharmacology* 2011; 137: 327– 335.
- [51] Harbone, JB. *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman an. ed. London, 1984.
- [52] Zuannazzi JSS. Flavonoids. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello, JCP, Mentz, LA, Petrovick PR. *Pharmacognosy: the plant to the drug*. 2 ed. See. Porto Alegre / Florianópolis. Ed. University / UFRGS / Ed. UFSC, 2000.
- [53] Orhan, DD, Zc-Elik, B; Zgen, S, Ergun, F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research*, 2010, 165: 496—504.
- [54] Salas, PM, Céliz, G, Geronazzo, H, Daz, M, Resnik, SL. Antifungal activity and enzymatically – modified flavonoids isolated from citrus species. *Food Chemistry*, 2011, 124 : 411 – 1415.
- [55] Arif, T, Mandal, TK, Dabur, R. Natural products: Anti – fungal agents derived from plants. *Opportunity Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry*, 2001, 81: 283 – 311.
- [56] Al-Dhabi, NA, Arasu, MV, Rejiniemon, TS. *In Vitro* Antibacterial, Antifungal, Antibiofilm, Antioxidant, and Anticancer Properties of Isosteviol Isolated from

Endangered Medicinal Plant *Pittosporum tetraspermum*. Journal of Ethnopharmacology 2011; 137: 327– 335.

[57] Pirzada, AM, Ali, HH, Naeem, M, Latif, M, Bukhari, AH, Tanveer, A. *Cyperus rotundus* L.: Traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities. Journal of Ethnopharmacology 2015; 174:540–560.

[58] Vikram A, Jayaprakasha GK, Jesudhasan PR, Pillai SD, Patil BS. Suppression of bacterial cell–cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. Journal of Applied Microbiology 2010; 109(2):515-27.

## **CAPITULO 3**

---

## CAPITULO 3. Potencial antifúngico de *Cyperus esculentus* L. contra fitopatógenos

Renata Correia\*<sup>1</sup>, Regineide Xavier Santos<sup>2</sup>, Gabriele Marisco<sup>2</sup>, Rômulo Spósito<sup>3</sup>, Cristina Pungartnik<sup>4</sup>

\*E-mail: [renatacorreiaassunção@hotmail.com](mailto:renatacorreiaassunção@hotmail.com) (R. Correia)

<sup>1</sup> Programa de Pós graduação em Biotecnologia-RENORBIO, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brasil

<sup>2</sup> Laboratório de Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista-BA, Brasil

<sup>4</sup> Instituto Federal Baiano/Campus Itapetinga-BA

<sup>3</sup> Laboratório de Biotecnologia de Fungos, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, Brasil

### Resumo

O presente objetivou avaliar o efeito antifúngico da fração acetato de etila das folhas de *C. esculentus* contra os fungos fitopatogênicos *Moniliophthora perniciosa* e *Aspergillus niger*. Para realizar os bioensaios utilizou-se o teste de sobrevivência com a utilização de hifas quebradas e a técnica de microdiluição em caldo para determinar a concentração mínima inibitória. Foi verificado que a fração acetato de etila provocou a diminuição do crescimento de *M. perniciosa*, com taxa sobrevivência <10% na concentração de 1 mg/mL. Também foi verificado a inibição do crescimento de *A. niger* com valor de MIC de 0,5mg/mL. Esses resultados demonstraram o potencial de *C. esculentus* como fonte de bioativos fungicidas, sendo uma alternativa mais segura para o ambiente e a saúde humana. Contudo são os primeiros relatos sobre atividade antifúngica dessa planta contra *M. perniciosa* e *A. niger*, evidenciando a necessidade de mais investigações sobre mecanismos de ação, identificação e isolamento de substâncias.

Palavras-Chave: Antifúngico. *Cyperus esculentus*. *Moniliophthora perniciosa*. *Aspergillus niger*.

### Abstract

The present study aimed to evaluate the antifungal effect of the ethyl acetate fraction of *C. esculentus* leaves against the phytopathogenic fungi *Moniliophthora perniciosa* and *Aspergillus niger*. To carry out the bio-assays, the survival test was performed using broken hyphae and the broth microdilution technique to determine the minimum inhibitory concentration. It was verified that the ethyl acetate fraction, decreasing the growth of *M. perniciosa*, with a survival rate of <10% in the concentration of 1 mg / mL. Growth inhibition of *A. niger* with MIC value of 0.5mg / mL was also verified. These results has shown the potential of *C. esculentus* as a source of bioactive fungicides, being a safer alternative for the environment and human health. However they are the first reports on the antifungal activity of this plant against *M. perniciosa* and *A. niger*, highlighting the need for further investigations on mechanisms of action, identification and isolation of substances.

Keywords: Antifungal. *Cyperus esculentus*. *Moniliophthora perniciosa*. *Aspergillus niger*

## 1. Introdução

Os fungos se caracterizam como o maior e o mais diverso grupo de organismos fitopatogênicos que atacam plantas e podem provocar graves doenças e gerar impactos econômicos negativos (Krugner; Bacchi, 2011).

Dentre os microrganismos que causam perdas na produção agrícola, tem-se o fitopatógeno *M. pernicioso*, caracterizado como um fungo hemibiotrófico causador da doença vassoura de bruxa no cacau (*Theobroma cacao* L.) que traz sérios danos à cultura (Aime; Phillips, 2005). Esse patógeno causa infecção nos tecidos meristemáticos da planta provocando sintomas característicos que se manifestam na forma de hipertrofia e superbrotamento, com proliferação de gemas laterais e engrossamento de tecidos infectados (Albuquerque 2005).

Fungos do gênero *Aspergillus* também são responsáveis por diversas doenças em plantas e produtos vegetais. *A. niger* é uma das espécies mais comuns e frequentes, sendo o agente causador de podridão do tronco (Santos et al., 2010a) e pode contaminar produtos agrícolas em diferentes fases, como pré-colheita, colheita, processamento e manuseio, além de produzir metabólitos secundários tóxicos (Perrone et al. 2007).

O controle de doenças de plantas é frequentemente realizado por fungicidas sintéticos. Entretanto, o uso desses produtos acarreta sérios danos ao ambiente, saúde humana e animal (Céspedes et al., 2014) e pode contribuir para o surgimento de populações de fitopatógenos resistentes (Talamini; Stadnick, 2004). Em substituição a produtos sintéticos recomenda-se o uso de produtos alternativos, que sejam mais seguros e biodegradáveis.

Neste contexto, destaca-se uso de plantas devido a sua variedade de metabólitos secundários que possuem princípios ativos microbiocidas, se caracterizando como fonte potencial de biopesticidas. Compostos bioativos de plantas têm mostrado resultados promissores contra o controle de várias espécies fitopatogênicas (Rhouma et al. 2009; Santos et al., 2010b; Boutefas et al., 2016; Dulf et al., 2017) provocando a inibição do crescimento micelial, a formação e a germinação de esporos dos fungos (Venturoso et al., 2011).

Extratos de vegetais do gênero *Cyperus* já foram testados contra fungos fitopatogênicos em diversos trabalhos e demonstraram atividade antifúngica eficiente (Sing et al. 1999; 2011; Ahmad et al., 2012; Ozdemir; Erincik, 2015). Tendo em vista estes resultados, o presente trabalho se propôs a verificar o efeito da fração acetato de

etila das folhas de *Cyperus esculentus* contra os fungos fitopatogênicos *Moniliophthora perniciososa* e *Aspergillus niger*.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Material botânico

As folhas de *C. esculentus* L. foram coletados em Itapetinga, Bahia (15 14 13S 40 13 39W). Um exemplar da espécie foi identificado e depositado no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) (HUESBVC 8201).

### 2.2. Preparação do extrato

As folhas de *C. esculentus* foram submetidas a secagem em estufa com circulação de ar a 40 °C durante três dias. Em seguida o material foi macerado e produzido o extrato etanólico por extração exaustiva. Depois foram filtrados através de papel de filtro estéries. O etanol foi removido em um evaporador rotativo para produzir extrato bruto. A partir do extrato bruto foi obtida a fração acetato de etila por fracionamento de acordo a polaridade (Harborne, 1984) e extração em fase sólida (SPE). O solvente foi removido por evaporador rotativo e para o bioensaio as frações foram diluídas em dimethylsulfoxido (DMSO) a 1%.

### 2.3. Atividade antifúngica

Para realização do bioensaio utilizou-se os fungos fitopatogênicos *Moniliophthora perniciososa*, biotipo *c* e *s*, e *Aspergillus niger*.

A atividade antifúngica da fração acetato de etila das folhas de *C. esculentus* foi analisada através do teste de sobrevivência com a utilização de hifas quebradas, seguindo metodologia de Filho et al. (2006). Dois ou três discos (2-3 mm) foram retirados do micélio periférico de uma cultura de *M. perniciososa* e foram transferidos para 5 mL de meio líquido CPD. Em seguida as hifas foram agitadas e quebradas e o resultado da suspensão (1 mL) foi transferido para três placas de meio de cultura sólido (contendo 0,1-2mg/mL da composição). O número absoluto de “colônias” foi contado depois de incubadas a 27 a 28° C por 5-7 dias. Os resultados foram dados como a porcentagem de sobrevivência relacionada aos controles não tratados ( $N / N_0 \times 100$ ) e representam a média de pelo menos três experimentos independentes.

Para avaliar a ação da fração contra o *A. niger* foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (MIC), protocolo adaptado de Pinto (2010). Para prerapação do inóculo os esporos foram

coletados após 5-7 dias. Utilizou-se diferentes concentrações (0,1 a 1,5 mg/mL) da fração acetato de etila que foram distribuídos em microplaca de 96 poços. O experimento foi mantido em  $28^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$  por um período de incubação de 72 hs. Para cada 80 $\mu\text{L}$  de inóculo ( $10^4$  UFC / mL) adicionou-se 40 $\mu\text{L}$  de (meio Sabouraud Dextrose Broth-SDB) e 80 $\mu\text{L}$  da fração acetato de etila, em concentrações de 0,1 – 1,5 mg / mL). As soluções controles foram: (i)80  $\mu\text{L}$  de água salina (0,9%), 40  $\mu\text{L}$  de meio SDB 80  $\mu\text{L}$  do inóculo; (ii)80  $\mu\text{L}$  de água destilada, 40  $\mu\text{L}$  de meio SDB, 80  $\mu\text{L}$  do inóculo. Em seguida, os valores de MIC foram determinados sub-cultivando as amostras do ensaio e considerando presença ou ausência de crescimento pela contagem de microrganismos em UFC/mL. Os resultados representam a porcentagem de crescimento relacionada aos controles não tratados ( $N / No \times 100$ ) e a média de pelo menos três experimentos independentes.

### 3. Análise estatística

Os resultados experimentais foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (SD) de três repetições. Onde aplicável, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e diferenças entre amostras foram determinadas pelo teste Tukey. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados estatisticamente significativo. O desvio padrão e as análises estatísticas foram calculados pelo programa GraphPad Prism.

### 4. Resultado e Discussão

A sobrevivência de *M. pernicioso*, biótipos *c* e *s*, após tratamento com a fração acetato de etila da folha de *C. esculentus* está apresentada na figura 1. A fração, na concentração de 1mg/mL, provocou diminuição do crescimento de *M. pernicioso* com taxa sobrevivência  $< 1\%$ , para o biótipo *c*, e  $< 10\%$  para o biótipo *s*. As hifas de *M. pernicioso* apresentaram sensibilidade à fração de acetato de etila, com inibição do crescimento dependente da dose e baixa taxa de sobrevivência, sendo que as hifas do biótipo *c* foram mais sensíveis à fração.

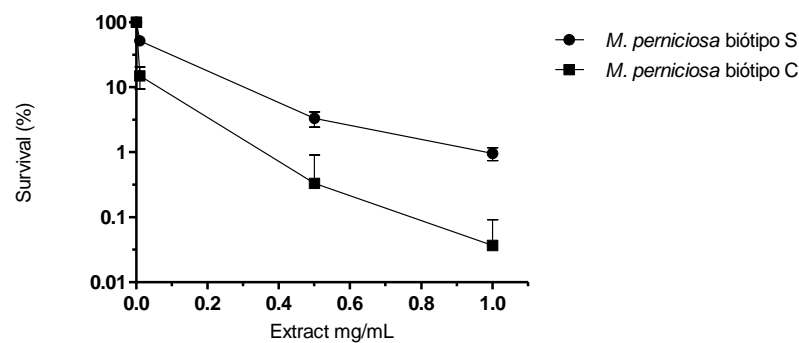


Figura 1. Sobrevivência de *M. perniciosos* após o tratamento com fração acetato de etila em 24hs de exposição. (●) biótipo S; (■) biótipo C.

Não foi encontrado relato de estudos sobre atividade antifúngica de *C. esculentus* contra *M. perniciosos*. Entretanto, os resultados deste estudo corroboram com pesquisas anteriores, *in vitro*, que evidenciaram o potencial de extratos vegetais contra esse fitopatógeno. Ramos et al. (2007) verificou que extrato de *Azadirachta indica* reduziu a germinação dos esporos, e considerou que a espécie é um fonte potencial de formulação eficaz e barata para o controle de *M. perniciosos*. Carvalho et al (2012) revelou que extratos de *Spathelia excelsa* também apresenta efeito antifúngico contra *M. perniciosos*. E Santos et al. (2014) investigando composição obtida a partir de *T. cacao* também observou efeito satisfatório.

Marisco et al. (2017), utilizando a mesma metodologia, verificou que *Spondias purpurea* exibiu propriedades antifúngicas contra *M. perniciosos*, com aproximadamente 20% de sobrevivência) na concentração de 1mg/mL. No presente estudo, para concentração de 1mg/mL, foi observado taxa de sobrevivência menor que 10% (*M. perniciosos* biótipo s) e menor que 1% (*M. perniciosos* biótipo c). Comparando com os dados encontrados por Marisco et al. (2017), os resultados indicam que *C. esculentus* apresenta melhor potencial antifúngico.

A escassez de agentes antifúngicos para combater, de forma efetiva, a vassoura de bruxa em *T. cacao* (Medeiros et al., 2010), a necessidade de desenvolver produtos contra fungos fitopatogênicos mais eficientes, seguros e biodegradáveis (Céspedes et al., 2014), e a carência de estudos na busca de fitoconstituintes contra esse fitopatógeno, são aspectos que reforçam a investigação de substâncias fungicidas contra *M. perniciosos* (Carvalho et al., 2012). Estratégias de combate de doença de plantas com produtos ambientalmente menos nocivos e mais seguros e com múltiplas ações inibitórias tem



recebido a atenção de patologistas de plantas. Neste sentido, a investigação de propriedades antimicrobianas de ervas daninhas, como espécies do gênero *Cyperus*, pode levar a novos agentes químicos eficazes contra fitopatógenos com propriedades ambientalmente seguras (Ozdemir; Erincik, 2015).

Os resultados relativos à ação da fração acetato de etila contra *A. niger* estão exibidos na figura 2. A fração causou a inibição do crescimento do fitopatógeno na concentração de 0,01 mg/mL e apresentou de MIC de 0,5 mg/mL, evidenciando o potencial antifúngico de *C. esculentus*.

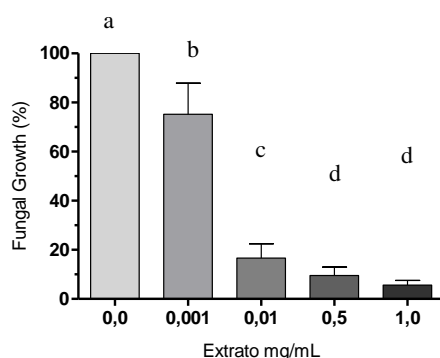


Figura 2: Efeito inibitório da fração acetato de etila frente o Crescimento de *A. niger*. Os resultados representam a média  $\pm$  padrão desvio (SD) de três experimentos independentes; letras diferentes expressam diferenças significativas entre os resultados ( $p < 0.05$ ).

Trabalhos relacionados à atividade antifúngica de *C. esculentus* contra *A. niger* são escassos. Jing et al. (2016) que avaliou o efeito de flavonoides totais das folhas de *C. esculentus* e verificou que atividade não foi significativa. Neste sentido, os resultados revelados neste estudo são inovadores e sugere que a planta tem potencial contra fungos fitopatogênicos e está de acordo com outros autores, que relataram efeitos antifúngicos satisfatório de extratos de acetato de etila do gênero *Cyperus* contra fungos que infectam plantas (Singh et al., 1999; Singh et al., 2011; Ozdemir; Erincik, 2015). Foi evidenciado que extratos de acetato de etila de rizomas de *Cyperus rotundus* provocaram a inibição da germinação de esporos de *Fusarium udum* (Singh et al., 1999) e de isolados de *Botrytis cinerea* e *Fusarium oxysporum*, além de provocar a redução do seu crescimento micelial (Ozdemir; Erincik, 2015).

Salih et al. (2017) considerou que o extrato de acetato de etila da madeira e da casca do caule de *Terminalia brownii*, apresentou ação eficiente contra *A. niger* com MIC de 0,50 mg/mL, valor similar ao exibido pela fração de acetato de etila de folhas de *C. esculentus*. Salih et al. (2017) identificou a presença de flavonoide nos extratos

bioativos e sugere que a atividade antifúngica está associada à concentração desse composto. Vários autores também relatam o efeito antifúngico da classe de flavonoide contra cepas fitopatogênicas, dentre elas, cepas de *Aspergillus* (Alves et al., 2014; Céspedes et al., 2014; Bouterfas et al., 2016).

Resultados não publicados do grupo nosso grupo de pesquisa aponta que a fração de acetato de etila de *C. esculentus* apresentou resultado positivo para flavonoides, corroborando com o perfil fitoquímico descrito por Salih et al. (2018). Portanto, infere-se que atividade antifúngica da fração de acetato de etila da folha de *C. esculentus* possivelmente está relacionado à classe de flavonoides.

Os flavonoides que tem sido associado à atividade de extratos vegetais devido a propriedades antimicrobiana testadas *in vitro* (Mohamed; El-hadidy, 2008; Serpa et al., 2012). Esses fitoconstituintes possuem ampla capacidade de inibir a germinação de esporos patogênicos em plantas (Salas *et al.*, 2011). O mecanismo de ação está relacionado, provavelmente, à sua capacidade de formar complexos com proteínas solúveis presentes nas paredes das células fúngicas, e também ao potencial destes compostos de romper as membranas do fungo, devido à sua natureza lipofílica (Arif et al., 2011; Salas et al., 2011).

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com trabalhos que evidenciam o potencial de extratos vegetais como agente fitopatogênico (Venturoso et al., 2011; Dulf et al., 2017) e recomendam isolamento e identificação de substâncias responsáveis pela atividade (Baños et al., 2002; Desoti et al., 2011), com perspectiva para elaboração de produtos fitossanitários naturais para o controle de doenças fúngicas em plantas (Gomes et al., 2016).

## 5. Conclusão

Os resultados deste estudo revelam o potencial fungicida da fração acetato de etila da folha de *C. esculentus* contra *A. niger* e *M. perniciososa* e podem ser considerado como os primeiros relatos da ação da planta contra esses fitopatógenos. Os resultados obtidos são promissores e a planta pode ser uma alternativa sustentável para o desenvolvimento de agente fungicida ambientalmente mais seguro. Contudo, novos estudos , in vitro e in vivo, devem ser realizados, tendo em vista que pesquisas sobre atividade antifúngica de *C. esculentus* ainda são escassas, a fim de isolar os constituintes fitoquímicos bioativos e identificar os mecanismos de ação.

## 6. Referências

- Aime, M.C.; Phillips Mora W. The causal agents of witches' broom and frostypodrot of cacao (chocolate, *Theobromacacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia** 97(5): 1012-1022, 2005.
- Ahmad, M.; Maharookh; Si Ahmad; Mehjabeen; Behma, A.B.; Jahan, N. Analgesic, antimicrobial and cytotoxic effect. of *Cyperus rotundus* etanol extract. **Pakistan Jornal of Pharmacology**. 29 (2): 1-7, 2012.
- Albuquerque, P.S.B.; Bastos, C.N.; Luz, E.D.M.N.; Silva, S.D.V.M.; Doenças do cacaeiro. In: Kimati, H. Amorim, L. Rezembe, J.A.M.; Bergamim Filho, A.; Camargo, L.E.A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia**. Piracicaba: Ceres, 2005.
- Alves, C.T.; Ferreira, I.C.; Barros, L.; Silva, S.; Azeredo, J.; Henriques, M. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. **Future Microbiology**. 9: 139–146, 2014.
- Arif, T.; Mandal, T.K.; Dabur, R. Natural products: Anti – fungal agents derived from plants. Opportunity Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry, 81: 283 – 311, 2001.
- Bouterfas, K.; Mehdadi, Z.; Aouad, L.; Elaoufi, M.M.; Khaled, M.B.; Latreche, A.; Benchiha, W. La localité d'échantillonnage influence-t-elle l'activité antifongique des flavonoïdes de *Marrubium vulgare* vis-à-vis de *Aspergillus niger* et *Candida albicans*? **Journal de Mycologie Médicale**. 607, 2016.
- Baños, S.B., Leticia, L., Necha, B., Luna, L.B., Torres, K.B., Fitopatología, R.M. De, Bautistabaños, S., Barrera-necha, L.L., Bravo-luna, L., Desarrollo, C. De, Bióticos, D.P., Politécnico, I., Yautepec-jojutla, C., Yautepec, S.I., Cp, M. Antifungal Activity of Leaf and Stem Extracts from Various Plant Species on the Incidence of *Colletotrichum gloeosporioides* of Papaya and Mango Fruit After Storage. **Revista Mexicana de Fitopatología** 2002.
- Carvalho, L.E.; Lima, M.P.; Máximo, A.C.; Pereira, E.C.S; Moreira, W.A.S. Estudo em raiz e ráquis foliar de *Spathelia excelsa*: fitoquímica e atividade frente ao fungo. **Química Nova**. 35 (11): 2237-2240, 2012.
- Céspedes, C.L.; Salazar, J.R.; Ariza-Castolo, A.; Yamaguchi, L.; Avila, J.G.; Aqueveque, P.; Kubo, I.; Alarcón, J. Biopesticides from plants: *Calceolaria integrifolia* s.l. **Environmental Research**. 132:391-406, 2014.
- Desoti, V. C.; Maldaner, C. L.; Carletto, M. S.; Heinz, A. A.; Coelho, M. S.; Piat, D.; Tiuman, T. S. Triagem fitoquímica e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica de plantas medicinais nativas da região oeste do estado do Paraná. **Arquivos de Ciências da Saúde**. 15: 3-13, 2011.

Dulf, F.V.; Vodnar, D.C.; Dulf, E.H.; Pinteá, A. Phenolic compounds, flavonoids, lipids and antioxidant potential of apricot (*Prunus armeniaca* L.) pomace fermented by two filamentous fungal strains in solid state system. **Chemistry Central Journal**. 11 (92), 2017.

Filho, D.; Pungartnik, C.; Cascardo, J, Brendel, M. Brokenhyphae of the basidiomycete *Crinipellis perniciosa* allow quantitative assay of toxicity. **Current Microbiology**. 52(5): 407-412, 2006.

Gomes, E.M.C.; Pena, R.C.W.; Almeida, S.S.M.S. Composição fitoquímica e ação fungicida de extratos brutos de *Cinnamomum zeylanicum* sobre *Quambalaria eucalypti*. **Biota Amazônica**.6 (4): 54-58, 2016

Jing, S.; Wang, S. Dynamic high pressure microfluidization-assisted extraction and bioactivities of *Cyperus esculentus* (*C. esculentus* L.) leaves flavonoids. **Food Chemistry**, 192, 316-327, 2016.

Krugner;T.L.; Bacchi,L.M.A. Fungos. In: Amorim, L.; Rezende, J.A.M.; Bergamin Filho, A. (eds). **Manual de Fitopatologia**. Volume 1 - Princípios e Conceitos. 4ª Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo, 2011.

Marisco, G; Xavier, R.; Pungartnik, C. Antifungal Potential of Terpenes from *Spondias Purpurea* L. Leaf Extract against *Moniliophthora Perniciosa* that causes Witches Broom Disease of *Theobroma Cacao*. **International Journal of Complementary and Alternative Medicine**. 7: 1-6, 2017.

Medeiros, F.H.V.; Pomella, A.W. V.; Souza, J.T.; Niella, G.R.; Valle, R.; Bateman, R.P.; Fravel, D.; Vinyard, B.; Hebbar, P.K. A novel, integrated method for management of witches broom disease in Cacao in Bahia, Brazil. **Crop Protection**. 29: 704–711, 2010.

Mohamed, N.H.; El-hadidy, A.M. Studies of Biologically Active Constituents of *Verbascum eremobium* Murb. and its Inducing Resistance against some Diseases of Cucumber. **Egyptian Journal of Phytopathology**. 36: 133–150, 2008.

Ozdemir, Z.; Erincik, O. Antimicrobial activities of extracts of *Cyperus rotundus* L. rhizomes against some bacterial and fungal pathogens of strawberry and tomato. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**. 48 (13–16): 850–861, 2015.

Perrone, G.; Susca, A.; Cozzl, G.; Ehrlich, K.; Varga, J.; Frisvad, J.C.; Meijer, M.; Noonim, P.; Mahakarnchanakul, W.; Samson, R.A. Biodiversity of *Aspergillus* species in some importante agricultural products. **Studies in Mycology**. 59: 53–66, 2007.

Pinto, D.M.L. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato de *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling**. Dissertação (Mestrado em FÁRMACO e Medicamentos)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 2010.

Ramos, A.R.; Falcão, L.L.; Barbosa, G.S.; Marcellino, L.H.; Gander, E.S. Neem *Azadirachta indica* a. Juss) components: candidates for the control of *Crinipellis pernicioso* and *Phytophthora* ssp. **Microbiological research**.162: 238–43, 2007.

Rhouma, A.; Ben Daoud, H.; Ghanmi, S.; ben Salah, H.; Romdhane, M.; Demak, M. Antimicrobial activities of leaf extracts of *Pistacia* and *Schinus* species against some plant pathogenic fungi and bacteria. **Journal of Plant Pathology**. 91 (2): 339-345, 2009.

Salas, P.M.; Céliz, G.; Geronazzo, H.; Daz, M.; Resnik, S.L. Antifungal activity and enzymatically – modified flavonoids isolated from citrus species. **Food Chemistry**. 124:1411 – 1415. 2011.

Salih, E.Y.A.; Fyhrquist, P.; Abdalla, A.M.A. LC-MS/MS Tandem Mass Spectrometry for Analysis of Phenolic Compounds and Pentacyclic Triterpenes in Antifungal Extracts of *Terminalia brownii* (Fresen). **Antibiotics**. 6 (4): 37, 2017.

Santos, R.X.; Oliveira, D.A.; Sodré, G.A.; Gosmann, G.; Brendel, M.; Pungartnik, C. Antimicrobial activity of fermented *Theobroma cacao* pod husk extract. **Genetics and Molecular Research**.13: 7725-7735, 2014.

Santos, M.B; Santos, C.Y; Almeida, M.A; Santos, C.R.S; Sant'Anna, H.L.S; Santos, O.S.N; Silva, F; Martins, G.N. Efeito inibitório in vitro de extrato vegetal de *Allium sativum* sobre *Aspergillus niger* Tiegh. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. [online].12 (1):13-17, 2010a.

Santos, A.C.A.; Rossato, M.; Serafini, L.A. Bueno, M.; Crippa, L.B. Sartori, V.C.; Dellacassa, E. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 20 (2): 154-159, 2010b.

Serpa, R.; França, E.; Maia, L.; Andrade, C.; Diniz, A.; Furlaneto, M. In vitro antifungal activity of the flavonoid baicalein against *Candida* species. **Journal of Medical Microbiology**. 61: 1704 – 1709, 2012.

Singh, U.P.; Prithviraj, B.; Khiste, S.; Kumar, V.; Srivastava, J.S.; Manickam, M.; Singh, A. Effect of *Cyperus rotundus* rhizome extract on *Fusarium udum*. **Indian Phytopathology**. 52:18–23, 1999.

Singh, A.; Maurya, S.; Singh, R.; Singh, U.P. Antifungal efficacy of some ethyl acetate extract fractions of *Cyperus rotundus* rhizomes against spore germination of some fungi. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**. 44:2004–2011, 2001.

Talamini, V., Stadnik, M.J. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: Stadnik, M.J., Talamini, V. (eds). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: UFSC, 2004.

Venturoso, L.D.R.; Bacchi, L.M.A.; Gavassoni, W.L.; Conus, L.A.; Pontim, B.C.A.; Bergamin, A.C. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**. 37(1): 8-23, 2011.

## **CAPITULO 4**

---

*Pedido de patente protocolado no INPI*



## **CAPITULO 4. COMPOSIÇÃO ORIUNDA DE CYPERUS ESCULENTUS L. COM ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME**

### **CAMPO DA INVENÇÃO**

[001] A presente invenção refere-se a uma composição herbácea proveniente de extratos vegetais com propriedade antimicrobiana e atividade antibiofilme, com aplicabilidade na indústria farmacêutica. A composição trata-se de um produto inovador.

[002] Mais particularmente a invenção se refere tanto a um extrato como a seus derivados obtidos a partir da espécie *Cyperus esculentus* com ação antimicrobiana e antibiofilme, caracterizado por uma composição sob a forma de solução, suspensão, pó, grânulos, aerossol ou qualquer outro tipo de formulação aceitável pela indústria.

[003] Mais especificamente a invenção trata de uma composição obtida a partir da espécie *C. esculentus* com ação antibacteriana e atividade antibiofilme contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus epidermidis*, e outras bactérias patogênicas.

### **FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO E ESTADO DA TÉCNICA**

[004] A espécie *C. esculentus* L. é uma planta herbácea de ampla distribuição, sendo caracterizada como planta invasora [MELLO, S.C.M. Fungos e seus metabolitos no controle de tiririca. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003]. Entretanto a medicina popular utiliza os tubérculos (parte subterrânea) da planta para diversos tipos de tratamento.

[005] A investigação de compostos com propriedades biológicas em *C. esculentus* traz possibilidades de encontrar uma nova fonte de bioprodutos, uma vez que substâncias extraídas de plantas tem apresentado aplicação farmacológica [BARBOSA-FILHO JM, NASCIMENTO-JÚNIOR FA, TOMAZ ACA, ATHAYDE-FILHO PF, SILVA MS, CUNHA EVL, SOUZA MFV, BATISTA LM, DINIZ MFFM. Natural products with antileprotic activity. Rev Bras Farmacognosia, 17: 141-148. 2007].

[006] O surgimento de microrganismos resistentes e de infecções oportunistas fatais tem estimulado a pesquisa de novos agentes antimicrobianos e bioativos de origem vegetal têm sido utilizados no controle de microrganismos [PESSINI, G.L.; HOLETZ, F.B.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizadas na medicina popular. Rev Bra Farmacogn. 13: 21-24, 2003].

[007] Dentre as bactérias patogênicas, destacam-se *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*. *P. aeruginosa* é uma das principais causadoras de infecções adquiridas em ambientes hospitalares, sendo responsável por aproximadamente 10% de todas as infecções nasocomiais em todo o mundo. [CHATTERJEE, M; ANJU, C.P.; BISWAS, L.; KUMAR, V.A.; MOHAN, C.G. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. International Journal of Medical Microbiology, v306, p. 48-58, 2016]. *P. aeruginosa* apresenta isolados clínicos multirresistente que estão ligados a elevados índices de morbidade/mortalidade. A disseminação clonal tem sido responsável pelo surto de infecção desta bactéria no Brasil [NEVES, P.R.; MAMIZUKA, E.M.; LEVY, C.E.; LICONPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v47, p.409-420, 2011]. Devido a sua diversidade metabólica e a capacidade de formar biofilme, *P. aeruginosa* se caracteriza como um patógeno oportunista causador de infecções principalmente em pacientes com sistema imunológico comprometido e também pelo desequilíbrio da flora devido ao uso de antibióticos de amplo espectro. [ZHAO, W.H.; HU, Z.Q. Beta-lactamase indentified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Crit. Rev. Microbiol, v36, p. 245-258, 2010. ABDELGHANY, S.M. QUINN, D.J., INGRAM, R.J. GILMORE, B.F., DONNELLY, R.F.; TAGGART, C.C.; SCOTT, C.J. Gentamicin-loaded nanoparticles show improved antimicrobial effects towards *Pseudomonas aeruginosa* infection. International Journal of Nanomedicine, v7, p. 4053-4063].

[008] *S. epidermidis* é muito comum na microflora cutânea e acredita ser geralmente de natureza inócua, entretanto os últimos 20 anos essa bactéria tem sido responsável por uma variedade de infecções crônicas, principalmente em ambientes hospitalares [Wojtyczka, R.D.; Orlewska, K.; Kępa, M.. Biofilm Formation and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* Strains from a Hospital Environment Int. J. Environ. Res. Public Health 2014]. Trata-se de um importante patógeno oportunista, um dos agentes patogênicos mais prevalentes em infecções nosocomiais, causa infecções severas em recém-nascidos, indivíduos imunocomprometidos .A formação de biofilmes é reconhecida como seu principal fator de virulência para uma variedade de infecções crônicas, representando um grande problema na saúde pública [Freitas, A.S.; Vasconcelos, C.; Vilanova, M.; Cerca, N. Optimization of an automatic counting system for the quantification of *Staphylococcus epidermidis* cells in biofilms. Journal of Basic Microbiology, 2013].

[009] As bactérias formadoras de biofilme geralmente apresentam maior resistência aos antibióticos, maior tolerância ao sistema imunológico e melhor adaptação aos fatores ambientais [Chessa, D.; Ganau, G., Mazzarello, V. An overview of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* with a focus on developing countries. J Infect Dev Ctries, 2015].

[0010] As opções terapêuticas para o tratamento das infecções causadas por esses microrganismos são limitadas. Contudo, a resistência aos antibióticos, altas taxas de morbidade e mortalidade, é uma questão de saúde pública [NEVES, P.R.; MAMIZUKA, E.M.; LEVY, C.E.; LICONPAN, N. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v47, p.409-420, 2011]. Para enfrentar esse desafio, tem se intensificado o desenvolvimento de novos antibióticos, a utilização de diferentes combinações de antibióticos e a identificação de métodos de tratamento alternativos utilizando meios não antibióticos [CHATTERJEE, M; ANJU, C.P.; BISWAS, L.; KUMAR, V.A.; MOHAN, C.G. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. International Journal of Medical Microbiology, v306, p. 48-58, 2016].

[0011] Os extratos vegetais e outros produtos naturais estão sendo empregados como alternativas no tratamento contra diferentes patógenos e têm demonstrado eficiência no controle de uma ampla variedade de microrganismos. [CARVALHO, A.F.; SILVA, D.M.; SILVA, T.R.C; SCARCELLI, E.; MANHANI, M.R. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.) Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.16, n.3, p.521-526, 2014].

[0012] A patente de número US2010291250 e título “Use of an active ingredient that is obtained from *Cyperus esculentus* for its anti-aging cutaneous action”, descreve um método de tratamento de envelhecimento cutâneo usando pelo menos um ingrediente ativo obtido a partir desta espécie, agindo preferencialmente sobre os marcadores específicos da derme. Já a patente de número RU2197259 e título “Antidiabetic Agent” propõem a utilização do *C. esculentus* como agente profilático e curativo para diabetes mellitus. A composição utiliza o pó dos tubérculos e tem a finalidade de melhorar a eficiência do tratamento convencional em pacientes insulino- dependente e não dependente. As invenções estão relacionadas a mesma espécie em estudo, entretanto divergem no que se refere à atividade farmacológica.

[0013] A patente (CN10408357) intitulada Extraction method and use of cyperus esculentus general flavone capable of enhancing microcirculationa descreve um método de extração e a utilização de flavonas capaz de melhorar a microcirculação, com atividade anticoagulante e antibacteriana contra *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. A invenção descrita nesta patente não demonstra aplicação vantajosa sobre a bactéria *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*, evidenciando o caráter inovador do presente invento.

[0014] O aspecto inovador da invenção é a obtenção de uma composição herbácea com ação eficiente contra microrganismos, principalmente com ação contra a bactéria patogênica *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*.

[0015] A utilização de composição herbácea com ação contra bactéria patogênica *P. aeruginosa* e *S. epidermidis* oriunda da planta *C. esculentus* trata-se de uma inovação, pois até o momento não existe registros de documentos de patentes com esse propósito, além disso, tem como vantagem ser baixo de custo, fácil obtenção e já poder ser empregada na indústria.

### **BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS**

**FIGURA 1** mostra a inibição de crescimento bacteriano do extrato bruto da folha (CEL) de *C. esculentus*, da fração Clorofórmio (CLH) e da fração acetato de etila (ETH) frente às bactérias *P. aeruginosa* (A) e *S. epidermidis* (B).

**FIGURA 2** mostra a atividade antibiofilme (A) e a ação antibacteriana (B) da fração acetato de etila (ETH) frente à *P. aeruginosa*.

**FIGURA 3** mostra a atividade antibiofilme (A) e a ação antibacteriana (B) da fração acetato de etila (ETH) frente ao *S. epidermidis*.

### **DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO**

[0016] A presente invenção refere a uma composição obtida a partir da folha e demais partes da planta de *C. esculentus*, compreendendo um extrato e/ou fração com ação antibacteriana contra a *P. aeruginosa*, e outras bactérias patogênicas. Pode ser em extrato orgânico ou um extrato aquoso e suas respectivas frações e pode está sob a forma de solução, pó, grânulos, pomada, aerossol ou qualquer outro tipo de formulação aceitável pela indústria.

[0017] Para a obtenção da composição deve ser utilizado de 10 a 100g de material vegetal da planta *C. esculentus*, sendo adicionado solvente orgânico, em especial o etanol (99,5%), até a exaustão da amostra.

[0018] A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada através da técnica de disco-difusão, de acordo com as normas do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), para determinação do halo de inibição de crescimento. As bactérias utilizadas são patogênicas e consistem em cepas Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* (ATCC25921), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC35984) e *Bacillus subtilis* e cepas Gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Salmonella choleraesuis*

[0019] Foi avaliado o efeito antibacteriano do extrato bruto folha (CEL), do extrato bruto da Raiz (CER) e do extrato bruto da inflorescência (CEI). Os melhores resultados foram considerados para os extratos que apresentaram halo de inibição acima de 9mm de diâmetro.

[0020] Entre os extratos brutos testados, o CEL, até o presente, foi o que demonstrou resultados antibacterianos mais eficientes, especialmente contra a *P. aeruginosa* com halo de inibição igual ou superior a 15mm de diâmetro (Tabela 1).

**Tabela 1:** Avaliação da atividade antibacteriana do extrato bruto da folha (CEL), extrato bruto da raiz (CER), extrato bruto da inflorescência (CEI) da espécie *C. esculentus*, através do método de disco-difusão.

Bactéria	Halo de inibição (mm)		
	CEL	CER	CEI
<b>Gram-positiva</b>			
<i>S. epidermidis</i>	9,33 ± 0,57 <sup>b</sup>	5,33 ± 1,52 <sup>b,c,d,e</sup>	7,66 ± 1,52 <sup>b,c,d</sup>
<i>S. aureus</i>	9,33 ± 1,15 <sup>b</sup>	4,33 ± 1,52 <sup>c,d,e</sup>	6,00 ± 1,00 <sup>b,c,d,e</sup>
<i>B. subtilis</i>	8,33 ± 0,57 <sup>b,c</sup>	5,00 ± 2,00 <sup>c,d,e</sup>	4,66 ± 1,15 <sup>c,d,e</sup>
<b>Gram-negativa</b>			
<i>K. pneumoniae</i>	3,66 ± 0,57 <sup>d,e</sup>	3,00 ± 1,00 <sup>e</sup>	3,66 ± 1,52 <sup>d,e</sup>
<i>P. aeruginosa</i>	<b>17,66 ± 2,51<sup>a</sup></b>	4,33 ± 1,52 <sup>d,e</sup>	4,00 ± 1,00 <sup>d,e</sup>
<i>S. Choleraesuis</i>	3,33 ± 1,15 <sup>e</sup>	2,33 ± 0,57 <sup>e</sup>	3,33 ± 1,15 <sup>e</sup>

Data represent the mean ± SD of three independent experiments; values with different letters are significantly different at  $p < 0.05$

[0021] A partir do CEL foi obtida a fração Clorofórmio (CLH), fração Aquosa (AQU), fração acetato de etila (ETH) e fração etanol (ETA), de acordo com a metodologia de Harbone, 1984 [HARBONE, J.B. Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. Chapman an. ed. London, 1984], e por partição líquido-líquido utilizando cartucho SPE C18.

[0022] A fração CLH e a fração ETH apresentaram melhor desempenho na inibição do crescimento bacteriano, em especial contra a bactéria *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*, conforme mostra a Tabela 2. Os testes foram realizados em triplicatas e repetidos de 2 a 4 vezes em datas distintas.

**Tabela 2:** Avaliação da atividade antibacteriana do extrato bruto da folha (CEL), fração CLH e Fração ETH espécie *C. esculentus*, através do método de disco-difusão.

Bactérias	CLH	ETH
	<b>Halo de inibição (mm)</b>	
<b>Gram-positiva</b>		
<i>S. epidermidis</i>	≥10	≥10
<i>S. aureus</i>	≤10	≤10
<i>B. subtilis</i>	≤10	≤10
<b>Gram-negativa</b>		
<i>P. aeruginosa</i>	≥15	≥15
<i>S. choleraesuis</i>	≤10	≤10
<i>K. pneumonia</i>	≤10	≤10
<i>E.coli</i>	≤10	≤10

[0023] A Atividade antibacteriana também foi avaliada por método de microdiluição em caldo de acordo com Santos et al 2014 [ Santos, R.X.; Oliveira, D.A.; Sodré, G.A. Gosmaan, G.; Brendel, M.; Pungartnik. Antimicrobial activity os fermented *Theobroma cacao* pod husk Extract. **Genetics Molecular Research**, 13, 2014] e verificou inibição de crescimento, mais especificamente, contra a *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*, com destaque para a ação da Fração ETH (Figura 1).

[0024] Para determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) da fração ETH, menor concentração que inibe 90% do crescimento bacteriano, as concentrações utilizadas variaram entre 0,10 a 0,100 mg/mL.

[0025] Os melhores resultados relacionados à CIM variaram entre 0,10 e 0,50 mg/mL e à Concentração Bactericida Mínima (CBM), a menor concentração da fração capaz de causar a mortalidade do inóculo, foi entre 0,40 a 0,80 mg/m.

[0026] Foi evidenciado que extrato e/ou frações apresentam atividade antibacteriana, especialmente contra a *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*. Sendo que a fração ETH obteve resultados mais eficientes. O screening fitoquímico do extrato bruto e da fração ETH indicou a presença de compostos fenólicos e terpenos (Tabela 3).

**Tabela 3:** *Screening* fitoquímico do extrato bruto da folha (CEL) de *C. esculentus* e sua fração ETH.

	Extrato/Fração ativa	
	CEL	ETH
Alcaloides	-	-
Compostos Fenólicos	+	+
Saponinas	+	-
Terpenos	+	-

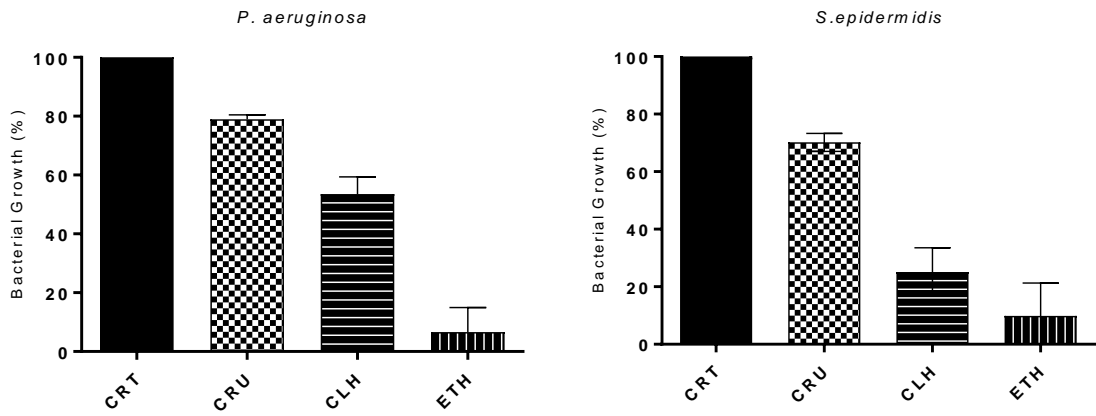
[0027] A determinação da atividade antibiofilme foi avaliada de acordo protocolo adaptado de Trentin, et al. (2011)[ Trentin, D.d.S.; Giodani, R.B.; Zimmer, K.R.; Silva, A.G.; Baumvol, I.J.; Macedo, A.J. Potencial of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. **Journal of Ethnopharmacology**, 137, 2011] , utilizando concentrações entre 0,10 e 0,50 mg/mL. Verificou-se que a fração ETH tem a capacidade de inibir a formação de biofilme, especialmente em *P. aeuriginosa* (Figura 2) e *S. epidermidis* (Figura 3).

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição oriunda de *Cyperus esculentus* L. com atividade antibacteriana, **caracterizado por** compreender uma composição a partir da planta *Cyperus esculentus* para uso como antimicrobiano, em especial como antibacteriano contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e outras bactérias patogênicas.
2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender uma composição onde o extrato vegetal é um extrato bruto aquoso obtido a partir da planta *Cyperus esculentus*.
3. Composição oriunda de *Cyperus esculentus* L. com atividade antibacteriana, **caracterizado por** compreender uma composição onde o extrato vegetal é uma fração do extrato bruto aquoso obtido a partir da planta *Cyperus esculentus*.
4. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender uma composição onde o extrato vegetal é um extrato bruto orgânico obtido a partir da planta *Cyperus esculentus*.
5. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender uma composição onde o extrato vegetal é uma fração do extrato bruto orgânico obtido a partir da planta *Cyperus esculentus*.
6. Composição oriunda de *Cyperus esculentus* L. com atividade antibacteriana, **caracterizado por** uma composição sob a forma de solução, suspensão, pó, grânulos, aerossol ou qualquer outro tipo de formulação aceitável pela indústria.
7. Composição oriunda de *Cyperus esculentus* L. com ação antibacteriana e atividade antibiofilme, **caracterizado por** uma composição com aplicabilidade na área biomédica, no campo da biotecnologia, em particular no controle antibacteriano.



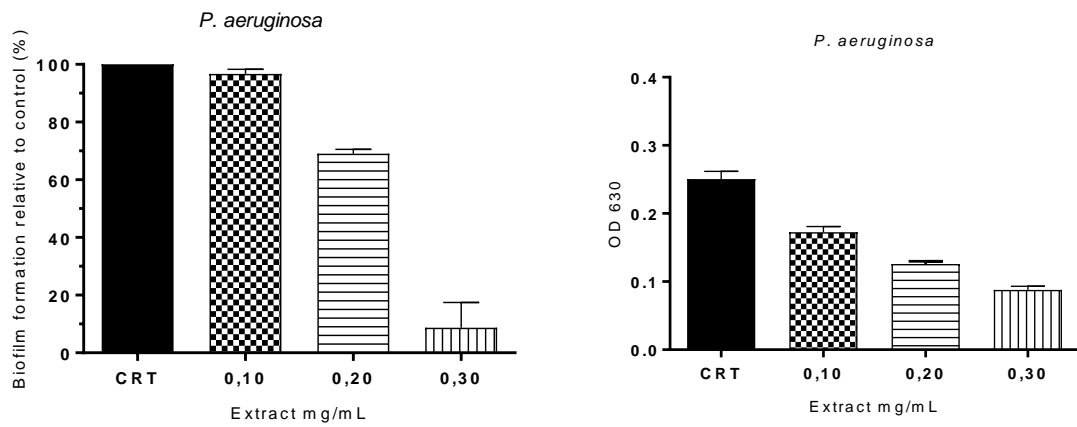
**FIG. 1.**



**A**

**B**

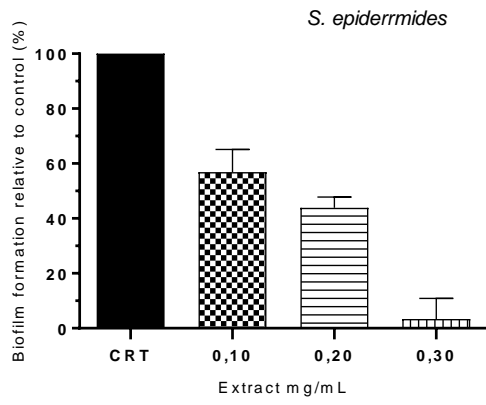
**FIG. 2.**



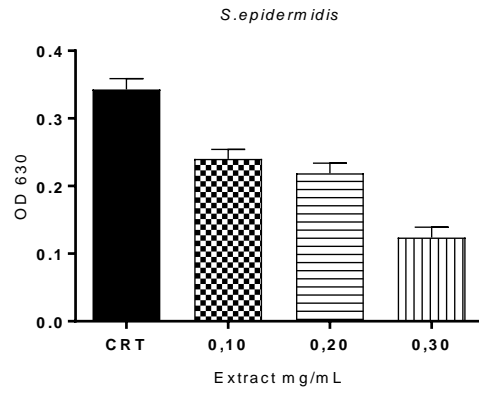
**A**

**B**

**FIG. 3.**



**A**



**B**

## RESUMO

### COMPOSIÇÃO ORIUNDA DE *CYPERUS ESCULENTUS* L. COM ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME

A presente invenção refere-se a uma composição herbácea proveniente de extratos vegetais com propriedade antimicrobiana, com aplicabilidade na indústria farmacêutica. Mais especificamente a invenção trata de uma composição com ação antibacteriana e antibiofilme obtida a partir de plantas da *Cyperus esculentus* com atividade contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus epidermidis*, e outras bactérias patogênicas. Desta forma, a invenção se refere tanto a um extrato como a seus derivados obtidos a partir de plantas da espécie *Cyperus esculentus* com ação antimicrobiana, caracterizado por um a composição sob a forma de solução, suspensão, pó, grânulos, aerossol ou qualquer outro tipo de formulação aceitável pela indústria.

## **CAPÍTULO 5**

---

*Pedido de patente protocolado no NIT da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-UESB*

## **CAPITULO 5. COMPOSIÇÃO HERBÁCEA ORIUNDA DE *Cyperus esculentus* L. COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA CONTRA FITOPATÓGENOS**

### **CAMPO DA INVENÇÃO**

[0028] A presente invenção refere-se a uma composição herbácea proveniente de extratos vegetais com propriedade antifúngica, com aplicabilidade na indústria biotecnológica e agrônômica. A composição trata-se de um produto inovador.

[0029] Mais particularmente a invenção se refere utilização de uma composição a base de *Cyperus esculentus* para combater doenças fitopatogênicas, caracterizado por uma formulação sob a forma de solução, suspensão, pó, grânulos, aerossol ou qualquer outro tipo de formulação aceitável pela indústria.

[0030] Mais especificamente a invenção trata de um biofungicida obtido a partir da espécie *C. esculentus* com ação fitopatogênica, especialmente contra os fungos *Moniliophthora perniciosa* e *Aspergillus niger*.

### **FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO E ESTADO DA TÉCNICA**

[0031] As plantas possuem diferentes mecanismos de defesa contra ataque de fitopatógenos (SILVA RA, REIS VM, BALDANI JI, OLIVARES FL. Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 49p, 2008).

[0032] Entretanto, as plantas são frequentemente afetadas por doenças, as quais interferem na sua capacidade produtiva e conseqüentemente, reduz o fornecimento de alimento para população, provocando impactos econômicos e sociais em diferentes escalas.

[0033] Dentre os fungos patogênicos que causam doenças em plantas destaca-se *M. perniciosa* (Stahel), um fungo hemibiotrófico fitopatogênico causador da doença Vassoura de Bruxa no cacau (*Theobroma cacao* L.) [AIME MC, PHILLIPS MORA W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. Mycologia 97(5): 1012-1022. 2005].

[0034] Fungos do gênero *Aspergillus* também são responsáveis por diversas doenças em plantas e produtos vegetais, sendo *Aspergillus niger* uma das espécies mais comuns e frequentes, podendo contaminar produtos agrícolas em diferentes fases, como pré-colheita, colheita, processamento e manuseio, além de produzir metabólitos secundários tóxicos [PERRONE G, SUSCA A, COZZI G, EHRLICH K, VARGA J, FRISVAD JC,

MEIJER M, NOONIM P, MAHAKARNCHANAKUL W, SAMSON RA. Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products. *Studies in Mycology* 59: 53–66. 2007].

[0035] A utilização de forma indiscriminada de defensivos agrícolas para combater doenças de plantas pode provocar diversos problemas, dentre eles, riscos à saúde humana, contaminação do meio ambiente e resistência de microrganismos patogênicos ao fitopatógeno [GHINI, R.; KIMATI, H. Resistência de fungos a fungicidas. Jaguariúna: Cadernos da Embrapa Meio Ambiente, 2000].

[0036] Atualmente alternativas que causam menos impactos ambientais e prejuízos à planta tem sido utilizadas no combate de fitopatógenos, como o uso de extratos de origem vegetal e seus metabólitos secundários isolados, sendo considerados uma fonte promissora. Vários trabalhos utilizam as propriedades antifúngicas dos compostos secundários de plantas para o controle de agentes fitopatogênicos [OLIVEIRA JUNIOR, LFG SANTOS, RB, REIS FO, MATSUMOTO ST, BISPO WMS, MACHADO LP, OLIVEIRA LFM. Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius*) sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. *Rev. bras. plantas med.* [online]. vol.15, n.1, pp. 150-157, 2013].

[0037] As composições obtidas a partir de plantas apresentam algumas vantagens em relação à produtos sintéticos, pois são compostos de baixa persistência no ambiente sendo de alta degradabilidade e o desenvolvimento da resistência pelo microrganismo patogênico a essas substâncias, que são compostas da associação de vários princípios ativos, é um processo que ocorre muito lentamente [ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. Universidade Católica Dom Bosco. *Revista Internacional de Desenvolvimento Local* 1: 43-50. 2001 ].

[0038] Pesquisas mostram o potencial da espécie *C. esculentus* para o controle antimicrobiano como já tem citado em alguns estudos [SEUKEP JÁ, FANKAM AG, DJEUSSI DE, VOUKENG IK, TANKEO SB, NOUMDEM JA, KUETE AH, KUETE V. Antibacterial activities of the methanol extracts of seven Cameroonian dietary plants against bacteria expressing MDR phenotypes. *SpringerPlus*, 2:363, 2013]. [ADENIYI T.A. et al. Investigating the Phytochemicals and Antimicrobial Properties of Three Sedge (Cyperaceae) Species *Not Sci Biol*, 6(3):276-281, 2014]. *C. esculentus* L. é uma planta herbácea, distribuída no Brasil, com características de planta invasora, infestando e causando prejuízos nas lavouras, como por exemplo, de arroz [PANOZZO LE,

AGOSTINETTO D, GALON L, MORAES PVD, PINTO JJO, NEVES R. Métodos de manejo de *Cyperus esculentus* na lavoura de arroz irrigado. Planta Daninha, Viçosa-MG, v. 27, n. 1, p. 165-174, 2009].

[0039] A espécie *C. esculentus* possui testes fitoquímicos qualitativos realizados com a presença de carboidratos, esteroides, açúcares redutores e taninos (ADENIYI et al., 2014), bem como metabólitos já caracterizados e identificados como flavonoides [JING S, WANG S, LI Q, ZHENG L, YUE L, FAN S, TAO G. Dynamic high pressure microfluidization-assisted extraction and bioactivities of *Cyperus esculentus* (*C. esculentus* L.) leaves flavonoids. Food Chem. Feb 1;192:319-27. 2016], e outros componentes como quercetina, vitamina C, vitamina E e zinco mineral [MOHAMMED Z. ALLOUH, CORRESPONDING AUTHOR HAYTHAM M. DARADKA, AND JAMALEDIN H. ABU GHADA. Influence of *Cyperus esculentus* tubers (Tiger Nut) on male rat copulatory behavior. BMC Complement Altern Med. 15: 331. 2015]. Estes resultados indicam que o *C. esculentus* pode ser uma fonte potencial de compostos bioativos.

[0040] Até o momento não foi encontrada nenhuma patente relacionada à atividade antifúngica da planta *C. esculentus* L. Entretanto, a patente número CN104083571 trata da atividade antimicrobiana de *Cyperus esculentus* contra *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* [SIQUN J; SAISAI W; JINGXUAN C; GIAN L; ZHENGXING N; FEIFEI Y; XIUFANG M. Extraction method and use of *Cyperus esculentus* general flavone capable of enhancing microcirculation].

[0041] A patente de número PT2449881E e título Composições Herbicidas decreta o processo de obtenção de bioproduto para o controle de fitopatógenos. Entretanto a invenção não apresenta ação contra o fungo *M. perniciosus* e *A. niger*.

[0042] O aspecto inovador da invenção é a obtenção de uma composição herbácea com ação eficiente contra microrganismos, principalmente com ação antifúngica contra o fungo *M. perniciosus* e *A. niger* e outros fungos patogênicos. A utilização de composição herbácea oriunda da planta *C. esculentus* com ação antifúngica contra o fungo *M. perniciosus* e *A. niger* trata-se de uma inovação e não existem registros de documentos de patentes com esse propósito.

## BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

**FIGURA 1** mostra o percentual de sobrevivência de *M. pernicioso*, após 24 horas de exposição em ETH. (●) *M. pernicioso* biotipo C; (■) *M. pernicioso*, biotipo C.

**FIGURA 2** mostra ação da ETH sobre o crescimento do fungo *A. niger*.

## DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0043] A presente invenção refere a uma composição obtida a partir da folha e demais partes da planta de *C. esculentus*, com ação antimicrobiana contra fungos fitopatogênicos, em especial *M. pernicioso* e a *A. niger*. A formulação do biofungicida é preparada com compostos extraídos da planta e pode está sob a forma de solução, pó, grânulos, aerossol ou qualquer outro tipo de formulação aceitável pela indústria.

[0044] Para a obtenção da composição deve ser utilizado de 0,2g a 1,5g de material vegetal da planta *C. esculentus*, sendo adicionada de 0,5L a 1,5L de solvente orgânico e/ou aquosos, mas especificamente etanol PA.

[0045] O extrato bruto foi ressuspendido em etanol PA e submetido à fracionamento por técnica de partição líquido-líquido, utilizando solventes orgânicos de polaridades crescentes.

[0046] As frações obtidas foram concentradas para eliminação do solvente e foram testadas para avaliar o efeito na sobrevivência de fungos fitopatogênicos.

[0047] A avaliação da atividade antifúngica foi realizada através do teste de sobrevivência com a utilização de hifas quebradas [Filho D, Pungartnik C, Cascardo J, Brendel M (2006) Broken hyphae of the basidiomycete *Crinipellis pernicioso* allow quantitative assay of toxicity. *Curr Microbiol* 52(5): 407-412]. Dois ou três discos (2-3 mm) foram retirados do micélio periférico de uma cultura de *M. pernicioso* e foram transferidos para 5 mL de meio líquido CPD. Em seguida as hifas foram agitadas e quebradas e o resultado da suspensão (1 mL) foi transferido para três placas de meio de cultura sólido (contendo 0,1-2mg/mL da composição). O número absoluto de “colônias” foram contadas depois de incubadas a 20°C por 7 dias. Os resultados foram dados como a porcentagem de sobrevivência relacionada aos controles não tratados (N / No x 100) e representam a média de pelo menos três experimentos independentes.

[0048] Para avaliar a ação da composição sobre fungos fitopatogênicos também foi utilizado a técnica de microdiluição em caldo, para determinar a Concentração mínima



inibitória (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM) das substâncias em estudo. O teste foi realizado utilizando uma solução de esporos de  $4 \times 10^6$  esporos/mL<sup>-1</sup>.

[0049] Até o momento as composições que apresentaram melhores resultado frente aos organismos testados tem efeito na faixa entre 0,1 a 2mg. A composição tem aplicabilidade contra fungos fitopatogênicos, especialmente o *M. pernicioso* e *A. niger*.

[0050] Os resultados revelaram baixo percentual de sobrevivência dos dois biótipos de *M. pernicioso*, em especial nas concentrações entre 400 e 1 mg, conforme figura 1, evidenciando a eficiência da composição no combate ao *M. pernicioso*. Também foi verificado a inibição do crescimento de *A. niger*, conforme figura 2, apresentando concentração mínima inibitória na faixa entre 1 e 1,5mg, sendo um produto eficiente no combate a fitopatógenos.

[0051] Assim, a invenção prevê a incorporação de frações orgânicas obtida a partir de *C. esculentus*, especialmente a fração acetato de etila, a composições fungicidas para o controle e/ou o combate de fungos fitopatogênicos.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição com atividade antifúngica, caracterizado por compreender a preparação de uma formulação a partir de *Cyperus esculentus* e sua utilização no combate às doenças causadas por fitopatógenos
2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender incorporação de partições orgânicas, especialmente fração acetato de etila, a composições fungicidas em concentrações que variam de 0,1 a 2mg/mL.
3. Uso das formulações fungicidas caracterizado por ter aplicabilidade no controle e/ou o combate de fitopatogênos, em especial *M. pernicioso* e *A. niger*.
4. Composição oriunda de *Cyperus esculentus* L. caracterizado por um produto com atividade antifúngica sob a forma de solução, suspensão, pó, grânulos, aerossol ou qualquer outro tipo de formulação aceitável pela indústria.

FIG. 1.

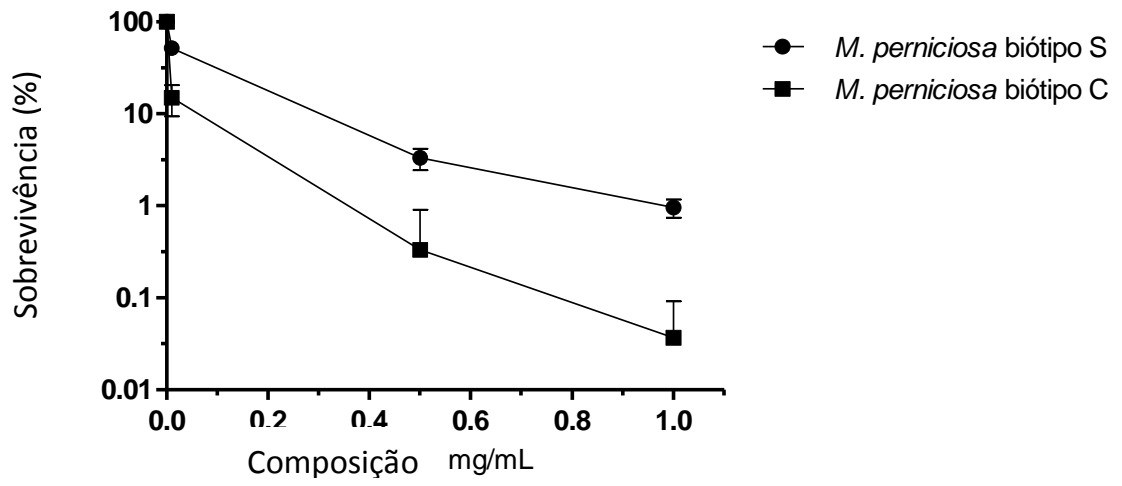
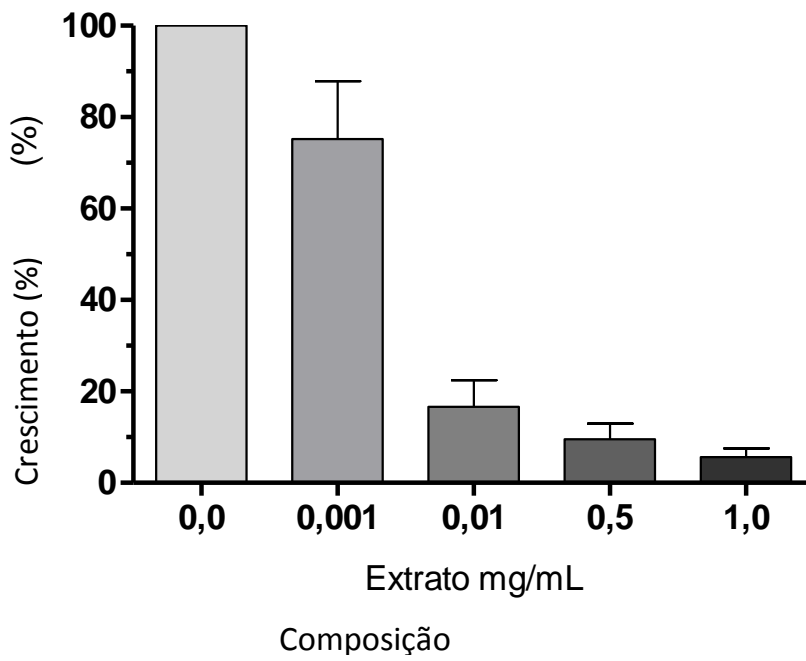


FIG. 2



## RESUMO

### COMPOSIÇÃO HERBÁCEA ORIUNDA DE *Cyperus esculentus* L. COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA CONTRA FITOPATÓGENOS

A presente invenção refere-se a uma composição herbácea proveniente de extratos vegetais com propriedade antifúngica, com aplicabilidade na indústria biotecnológica e agrônômica. A composição trata-se de um produto inovador. Mais particularmente a invenção se refere utilização de uma composição a base de *Cyperus esculentus* para combater doenças fitopatogênicas, caracterizado por uma formulação sob a forma de solução, suspensão, pó, grânulos, aerossol ou qualquer outro tipo de formulação aceitável pela indústria. Mais especificamente a invenção trata de um biofungicida obtido a partir da espécie *C. esculentus* com ação fitopatogênica, especialmente contra os fungos *Moniliophthora perniciosa* e *Aspergillus niger*.

**ANEXO**

---

**Anexo 1: Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

**INPI** INSTITUTO  
NACIONAL  
DA PROPRIEDADE  
INDUSTRIAL

09/10/2017 870170076710  
16:11  
  
29409161708571751

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2017 021672 1

**Dados do Depositante (71)**

---

Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 40738999000195

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** Rod Ilheus Itabuna K16, SN - Salobrinho

**Cidade:** Ilheus

**Estado:** BA

**CEP:** 45650-780

**País:** Brasil

**Telefone:** 7336805392

**Fax:**

**Email:** nit@uesc.br

## Anexo 1: Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

**Dados do Pedido**

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)

**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** COMPOSIÇÃO ORIUNDA DE CYPERUS ESCULENTUS L. COM ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E ANTIBIOFILME

**Resumo:** A presente invenção refere-se a uma composição herbácea proveniente de extratos vegetais com propriedade antimicrobiana, com aplicabilidade na indústria farmacêutica. Mais especificamente a invenção trata de uma composição com ação antibacteriana e antibiofilme obtida a partir de plantas da *Cyperus esculentus* com atividade contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, e outras bactérias patogênicas. Desta forma, a invenção se refere tanto a um extrato como a seus derivados obtidos a partir de plantas da espécie *Cyperus esculentus* com ação antimicrobiana, caracterizado por um a composição sob a forma de solução, suspensão, pó, grânulos, aerossol ou qualquer outro tipo de formulação aceitável pela indústria.

**Figura a publicar:** FIG 1

Telefone: (71) 361 33000  
Fax:  
Email: [invencao@brn.gov.br](mailto:invencao@brn.gov.br)

Página 2 de 2

Nome: ROSMÁRIO SANTOS NAVES  
CPF: 000000000-00  
Instituição: BRN/PI  
Qualificação Patente: Profissional de nível Superior  
Endereço: Rua 9, nº 344 - Vila das Flores  
Cidade: Vitória da Conquista  
Estado: BA  
CEP: 45010-000  
País: BRASIL  
Telefone: (71) 361 33000  
Fax:  
Email: [invencao@brn.gov.br](mailto:invencao@brn.gov.br)

Página 2 de 2

## Anexo 2: Esquema de fracionamento do extrato

