

Atividade antimicrobiana de extratos de *Coix lacryma-jobi* em acetato de etila sobre *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

Camila Camargo Gomes

Centro universitário Campo Real.
Contato: cami-camargo@hotmail.com

Durinézio José de Almeida

Universidade Estadual do Centro Oeste- Unicentro e Centro universitário Campo Real.
Contato: duzinezio@gmail.com

Resumo: O número de bactérias resistentes a antibióticos vem crescendo e se destacando como um problema de saúde pública, motivo pelo qual a demanda por novas substâncias antimicrobianas nas plantas ganha importância no ambiente científico; *Coix lacryma-jobi* (Lineu) é uma planta de origem chinesa, conhecida popularmente como lágrima de Jó, que tem efeitos antialérgicos, anti-inflamatórios, tônicos estomacais, hiperlipidemia, hiperglicêmica e antioxidante; estudos antimicrobianos com extratos etanólicos, metanólicos, ésteres e clorofórmios mostraram resultados positivos para bactérias gram-negativas e positivas. Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano de extratos da raiz, semente, caule e folha de *Coix lacryma-jobi*, utilizando solvente de acetato de etila em imersão a frio. Os extratos foram utilizados em linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados mostraram que a folha e a raiz não mostram atividade antimicrobiana e extratos de sementes e caule da planta mostram atividade antimicrobiana em ambos os microrganismos.

Palavras-chave: Antimicrobiano, *Coix lacryma-jobi*, extrato apolar, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Antimicrobial activity of *Coix lacryma-jobi*, ethyl acetate extract, on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Abstract: Abstract: The number of antibiotic-resistant bacteria has been growing and standing out as a public health problem, reason for which demand for new antimicrobial substances in plants gain importance in the scientific environment; *Coix lacryma-jobi* (Lineu) is a plant of Chinese origin, popularly known as Job's tear, that has effects anti-allergic, anti-inflammatory, stomach tonic, hyperlipidemia, hyperglycemic and antioxidant; antimicrobial studies with ethanolic, metanoic, esters and chloroform extracts have shown Positive results were obtained for gram negative and positive bacteria. This work aimed to evaluate an antimicrobial potential of extracts of the root, seed, stem and leaf of *Coix lacryma-jobi*, using ethyl acetate solvent in cold immersion. The extracts were used on strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The results shown wat leaf and root not show antimicrobial activity and extracts from seeds and plant stem show antimicrobial activity in both microorganisms.

Keywords: Antimicrobial, *Coixlacryma-jobi*, apolar extract, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Como citar este artigo:

GOMES, C. C.; ALMEIDA, D. J. Atividade antimicrobiana de extratos de *Coix lacryma-jobi* em acetato de etila sobre *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. **Luminária**, União da Vitória, v.22, n.02, p. 18 – 24, 2020.

INTRODUÇÃO

As infecções hospitalares são uma das maiores causas de morbidade e mortalidade entre pacientes hospitalizados, configurando

um sério problema de saúde pública (COSTA; SILVA, 2018). No ambiente hospitalar utensílios e o trânsito de profissionais de saúde e visitantes são importantes focos de

colonização e vetores de microrganismos patogênicos (MYNTTI, 2019).

Alguns microrganismos, como o *Staphylococcus aureus* estabelecem uma colonização assintomática, essa colonização tem grande importância clínica pois o hospedeiro assintomático é um vetor em potencial da doença (CARVALHO et al., 2016).

A colonização nasal pelo *S. aureus* é desprovida de sintomas e está bactéria pode, a partir desse sítio, alcançar outras regiões da pele e das mucosas (ALMEIDA; ARAUJO, 2018). Uma vez instalado o *S. aureus* pode causar processos infecciosos, que variam desde infecções cutâneas crônicas (relativamente benignas), até infecções sistêmicas (potencialmente fatais) (SILVESTRE et al., 2018).

A *Pseudomonas aeruginosa*, tem ocorrência comum em ambientes hospitalares, por apresentar fácil adaptação às condições de nutrição, temperatura e umidade comuns a estes ambientes; apresenta também alta capacidade de receber e transmitir fatores de resistência a antimicrobianos. Estes dois fatores combinados permitem que equipamentos e utensílios hospitalares, respiradores e nebulizadores lhe sirvam de suporte, para colonização e desenvolvimento (SILVESTRE et al., 2018).

O *S. aureus* juntamente com a *P. aeruginosa* são os principais responsáveis por pneumonias hospitalares, ocupando nos hospitais brasileiros, os primeiros lugares no “ranking” entre os microrganismos causadores destas enfermidades (COSTA; SILVA, 2018).

Nas últimas décadas o número de bactérias resistentes aos antibióticos vem crescendo e se destacando como um problema de saúde pública (FRIDKIN, 2019). Como consequência, a taxa de mortalidade hospitalar vem aumentando e a busca por novos meios terapêuticos tem sido priorizada.

Coix lacryma-jobi, espécie pertencente à família Poaceae, tem origem chinesa, e ampla distribuição no Brasil; onde é conhecida popularmente como lágrima de Jó.

Planta utilizada como alimento, devido ao seu alto teor de proteínas. Os extratos de suas sementes são popularmente utilizados no tratamento de várias doenças (DEVARAJ et al., 2020). Dentre os usos pode-se citar: Propriedades antialérgicas, anti-inflamatórias, tônico

co estomacal, hiperlipidêmica, hiperglicêmica e antioxidante (DEVARAJ et al., 2020) e no tratamento de neoplasias (CHHABRA; GUPTA, 2015).

Na medicina chinesa é utilizada como tratamento em doenças, relacionadas ao baço e rim, e é possível verificar sua indicação como diurética, analgésica, antiespasmódica e antiviral.

Embora inúmeros trabalhos, tenham avaliado a atividade antimicrobiana de extratos de lágrima de Jó contra as bactérias descritas acima, o extrato desta planta em acetato de etila (extrato apolar), ainda não havia sido testado.

Este trabalho objetivou, avaliar a capacidade do extrato em acetato de etila de *Coix lacryma-jobi* sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios do Centro Universitário Campo Real localizada na cidade de Guarapuava-PR.

Coleta e secagem do material vegetal.

A planta foi coletada em terrenos baldios no município de Guarapuava, localizado no estado do Paraná, durante o ano de 2015.

As coletas foram levadas aos laboratórios do Centro Universitário Campo Real, onde foi separado, caule (3,2kg), raiz (0,85 kg), folhas (2,5kg) e sementes (1,5 kg).

O material vegetal foi levado à estufa de ar forçado à temperatura de 40 °C e pesado, com regularidade de 6 horas, até que o material vegetal atingisse peso constante, em 4 pesagens consecutivas.

A escolha desta temperatura se deve à recomendação de que a secagem de sementes a temperatura não deve ultrapassar os 40° C. Posteriormente, foram trituradas em um moinho do tipo martelo para reduzir o volume. Em seguida, foram acondicionadas em sacos de papel e colocadas em estufa, a temperatura de 40° C, durante cinco dias.

Após este período, foram novamente trituradas em um moinho do tipo faca, para obtenção do pó das raízes.

Preparação dos extratos

A metodologia utilizada para obtenção

dos extratos foi a extração por imersão a frio.

O material previamente seco e moído, foi submetido à extração das diferentes partes que foram separadas em porções de 100 g. Posteriormente, foram colocados em frascos âmbar, 100g do material vegetal submergidos em 500 ml de acetato de etila.

O frasco foi vedado e ao longo de 28 dias foram feitas agitações ocasionais os extratos acetato de etila foram colocados em evaporador rotativo a 40 °C, para eliminação dos solventes e obtenção dos extratos brutos.

Microrganismos testados

As cepas utilizadas foram isoladas de escarro de pacientes internados no hospital de caridade Santa Tereza de Guarapuava e identificadas como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* no laboratório de infectologia da mesma instituição; estes isolados foram mantidos em ágar nutriente obedecendo às condições necessárias dos microrganismos para sobrevivência e manutenção.

Preparo do inoculo

O inoculo foi padronizado pela escala de McFarland, onde colônias individuais foram suspensas em salina até obtenção da escala padronizada 0,5 de Mc Farland.

Teste antimicrobiano.

Para o teste antimicrobiano foi usado placas de Petri com ágar Mueller Hinton; a semeadura nas placas foi realizada com 25 µL da cultura padronizada espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalsky.

Após semeadura, foram distribuídos pela placa 4 papéis de filtro de 6mm de diâmetro embebidos em éter etílico 95%.

Aos três primeiros discos foi aplicado 5 µL, 10 µL e 25 µL do extrato de *Coix lacryma-jobi*, o quarto papel de filtro foi utilizado como controle negativo e ao centro da placa foi adicionado um disco padronizado de Azitromicina (15 MCG) (controle positivo).

Os testes foram repetidos em triplicata para cada um dos extratos utilizados. As placas foram incubadas por 24 horas a 37° C em estufa de cultura microbiana.

Análise estatística dos dados

O delineamento para avaliação da atividade antimicrobiana foi inteiramente casualizado, com três tratamentos, três repetições com controle positivo e negativo. Os dados obtidos nos experimentos foram tabulados no software Excel e analisados quanto à desvio padrão, variância, média e testes T, utilizando o software Statistica.

RESULTADOS

Sobre os dados foi utilizado o teste de Levene de homogeneidade de variâncias onde $F= 6,98$ e $p = 0,005$, se mostrando homogêneos. Optou-se pelo teste T como parâmetro analítico da avaliação da diferença estatística entre os tratamentos.

Em relação ao rendimento (tabela1) verifica-se que o extrato de folha apresenta o maior rendimento com 2,41%, e o da semente foi o extrato de menor rendimento com 0,21%.

Os testes antimicrobianos demonstraram que extratos de folha e de raiz não apresentam efeito sobre as cepas. Os extratos de caule, e semente apresentaram demonstraram

Tabela 1. Rendimento do extrato apolar de *Coix lacryma-jobi*

| Folha | Caule | Semente | Raiz |
|--------|--------|---------|--------|
| 0,0241 | 0,0056 | 0,0021 | 0,0034 |

atividade em ambas as cepas.

Os diâmetros médios dos halos de inibição obtidos nas diferentes concentrações (5;10 e 25 µL) foram comparados pelo teste T com o controle negativo (éter) e positivo (Azitromicina) e apresentaram diferenças significativas (valores de $p \leq 0,001$).

Os dados apresentaram regressão positiva ($R^2= 0,9742 \pm 0,02$), com uma função linear ($y = 0,0688x + 0,0131$) e correlação de 98% ($\pm 2,4$) entre a concentração do extrato e o diâmetro do alo de inibição, esta função foi testada e corresponde ao comportamento demonstrado pela variável concentração sobre o halo de inibição em ambas as cepas (Figura 1 e 2).

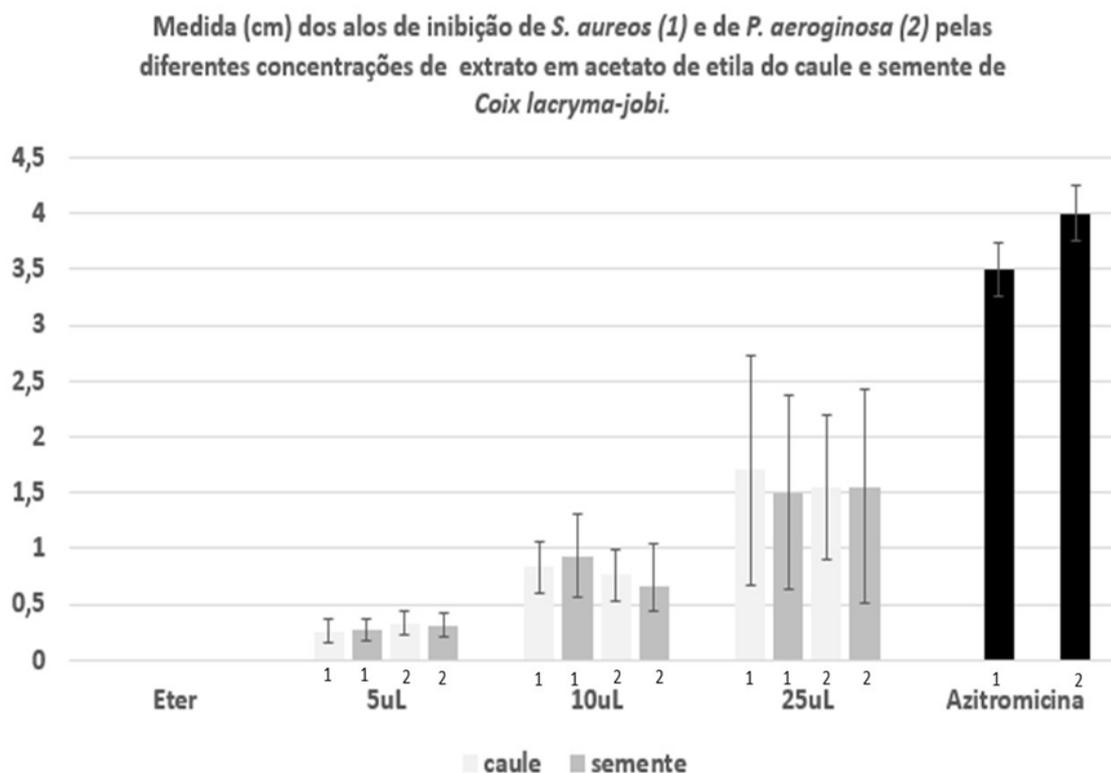


Figura 1. Gráfico demonstrando os valores médios de diâmetro do halo de inibição e seus desvios padrões para *S. áureos* (número 1 abaixo da coluna) e para *P. aeruginosa* (nº 2 abaixo da coluna), obtidos nas concentrações de 5;10 e 25 µL dos extratos em acetato de etila, do caule, cinza claro, e da semente, cinza escuro, além dos diâmetros médios demonstrados pelo controle negativo (éter) e pelo controle positivo (Azitromicina) em preto.

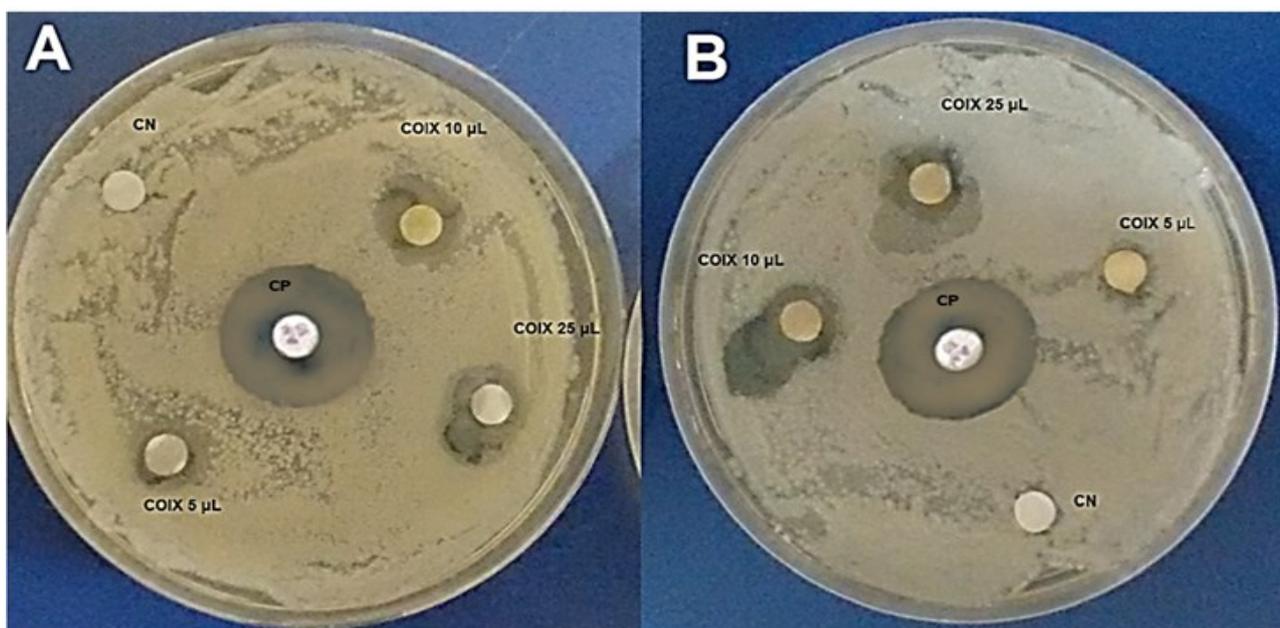


Figura 2. Foto de placas de petri usadas no experimento, demonstrando o posicionamento dos discos e os halos de inibição; “A” extrato de semente de *Coixlacryma-jobi* contra *Staphylococcus aureus*. “B” extrato de semente de *Coixlacryma-jobi* contra *Pseudomonas aeruginosa*. CN, controle negativo; CP controle positivo.

Coix lacryma-jobi apresenta distribuição tecido diferencial de compostos apolares, demonstrado pelo rendimento diferencial entre as folhas, raízes, caule e sementes. E este resultado corrobora o observado em outros trabalhos (DEVI et al., 2015; DININGRAT 2020; ROSENBERGER et al., 2020).

Dentre os órgãos vegetais avaliados, a folha apresentou a maior concentração de compostos extraíveis (óleo/ massa seca vegetal) por acetato de etila. Esta observação corrobora os dados obtidos em trabalhos com extração etanoica (FENG et al., 2018; ROSENBERGER et al., 2020) e contradiz o obtido em trabalhos com clorofórmio (DAS et al., 2017; SILVA et al., 2020).

Neste experimento, o extrato das folhas não apresentou atividade antimicrobiana, estes resultados parecem contradizer os obtidos por Silva et al. (2020) que utilizando clorofórmio, obteve um extrato das folhas da planta com uma ampla gama atividade antibacteriana. Uma possível explicação para esta contradição é a concentração utilizada por Silva et al. (2020) de 800 µL, 32 vezes maior que a maior concentração usada neste trabalho.

Rosenberger et al. (2020) verificaram que os extratos obtidos com clorofórmio (folhas) exibiam atividade antibacteriana contra *S. epidermis*, *S. aureus*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* com concentração mínima inibitória de 12,5 µL e o extrato etanólico das folhas e também das sementes proporcionou atividade antifúngica contra *F. graminearum* quando na concentração de 15 µL.

Segundo Olok (2017) o etanol, é capaz de dissolução de flavonoides, ácidos arácnicos, taninos, flavonoides, terpenoides e saponinas já o clorofórmio é indicado para flavonoides, saponinas e o acetato de etila para flavonoides, saponinas e alcaloides, portanto esperava-se que os resultados fossem superiores aos obtidos em clorofórmio e inferiores aos obtidos em etanol.

Uma possível resposta para a diferença de resultados entre o este trabalho e o demais, é o fator de diluição usado ao extrator, desta maneira na composição dos extratos obtidos por Rosenberger et al. (2020) e por

Silva et al. (2020) e provável que estejam compostos polares (solúveis em água) adicionados ao extrato.

Os resultados da triagem fitoquímica do estrado hidro-etanoico das folhas da espécie, indicaram a presença de alcalóides, carboidratos, saponinas, glicosídeos, flavonóides, fenóis, taninos e esteróides como os principais constituintes que podem ser responsáveis por atividade antibacteriana (PATEL et al., 2017), a diferença de compostos extraíveis é provavelmente a causa das diferenças demonstradas entre estes trabalhos e o presente.

Neste experimento as sementes e o caule, foram os órgãos que apresentaram compostos com atividade antimicrobiana. A semente de *Coix lacryma-jobi* L. contém 50 a 79% de amido, 16 a 19% de proteínas, 2 a 7% de óleo fixo, lipídios; 5,67% de glicolípido, 1,83% de fosfolípido e esteróis e ácidos graxos (PATEL et al., 2017).

O extrato de sementes obtido em clorofórmio foi submetido a triagem antibacteriana a 800 µL / disco e revelou atividade antibacteriana contra *B. cereus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *V. cholera* e *K. pneumoniae* (DAS et al., 2017). Os resultados apresentaram atividade contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* em todas as concentrações testadas. A atividade do extrato vegetal contra bactérias Gram-positivos e Gram negativas é uma indicação do amplo espectro de atividade e, portanto, um indicativo de que os extratos podem ser usados como fonte de substâncias antibióticas (DOUGHARI et al., 2008). Devi et al. (2015) relataram que a atividade antibacteriana contra *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* apresentaram eficiência máxima em o extrato de clorofórmio seguido pelo extrato de éter de petróleo, extrato, extrato de hexano e extrato de metanol. Em outro relatório, atividade antimicrobiana contra *E. coli* foi considerado muito mais proeminente em termos de extrato de etanol (CHHABRA; GUPTA, 2015), como já descrito acima o extrato obtido em etanol tem uma baixa especificidade e alta concentração de compostos, isso demonstra que vários dos compostos existentes na planta tem capacidade antimicrobiana e que devem ser estudadas individualmente e em sinergismo com outros

O óleo de semente contém 5 ingredientes de diglicerídeo e 11 triglicerídeos nas seguintes porcentagens de massa: 1,3-dioleína 0,40-0,58%, 1-linoleína-3-oleína 0,91-1,31%, 1,2-dioleína 0,24-0,35%, 1-oleína -2-linoleína 0,66-0,95%, 1,2-dilinoleína 0,33-0,47%, trilinoleína 4,87-6,99%, 1-oleína-2,3-dilinoleína 13,00-18,69%, 1-palmitina-2,3-dilinoleína 5,25 - 7,54%, 1,3-dioleína-2-linoleína 13,23-19,02%, 1-palmitina-2-linoleína-3-oleína 10,26-14,75%, 1,3-dipalmitina-2-linoleína 2,28-3,28%, trioleína 14,44- 20,76%, 1-palmitina-2,3-dioleína 8,06-11,58%, 1-oleína-2-linoleína-3-estearina 1,37-1,97%, 1,3-dipalmitina-2-oleína 1,52-2,19% e 1,2 -dioleína-3-estearina 1,29-1,86%. (LI, 2020).

O extrato obtido da raiz em nosso experimento não demonstrou atividade inibitória das cepas utilizadas.

A composição fitoquímica do óleo da raiz extraída em hidro etanol foi descrita como: Ácido dodecanóico, ácido tetradecanóico, éster 2,3-di-hidroxipropílico, 1,3-dioctanoína, N-metoxi-N-metil-3,4-di-hidro-2H-tiopiran-6-carboxamida, propanamida, 5-Amino-1-(quinolina -8-il) -1,2,3-triazol-4-carboxamida e piridina e destes compostos o ácido dodecanóico apresentou atividade inibitória contra bactérias gram-positivas e gram-negativas na concentração mínima de 31 µL (DININGRAT, 2020).

Novamente observa-se que os valores excedem os utilizados neste experimento, a escolha das dosagens neste experimento, formam condicionadas aos valores mínimos inibitórios observados por Rosenberger et al. (2020) em seu trabalho com clorofórmio. No entanto é possível inferir a necessidade de novos experimentos com concentrações maiores que as aqui testadas; isso é corroborado pela correlação positiva (concentração/ halo de inibição) observada onde podemos presumir maior atividade em concentrações maiores. Uma abordagem de quantificação e caracterização fotoquímica do extrato em acetato de etila também são necessárias e testes de toxicidade e mutagenicidade devem ser os próximos passos para efetiva utilização destes extratos como agentes antimicrobianos.

CONCLUSÃO

O extrato em acetato e etila de *C. lacryma-jobi* apresenta maior rendimento em folha, apesar de sua atividade inibitória ser maior em extratos de semente e caule em relações as outras partes da planta. A atividade inibitória pode ser comprovada, o que caracteriza que ao extrato pode ser utilizado como uma promissora fonte de fármacos antimicrobianos.

REFERENCIAS

- ALMEIDA, A.C.G.de; ARAÚJO, J.M.de. **Análise microbiológica da qualidade do ar em ambiente hospitalar na região oeste do Paraná**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
- CARVALHO, M.A.N. et al. Caracterização epidemiológica e molecular de *Staphylococcus aureus* isolado em Manaus- Amazonas. 2016.
- CHHABRA D.; GUPTA R.J. Formulation and phytochemical evaluation of nutritional product containing Job's tears (*Coix lacryma-jobi* L.). **J Pharmacogn Phytochem**, v.4, n.3, p.291-298, 2015.
- COSTA, M.; SILVA, W.N. Investigação dos principais micro-organismos responsáveis por infecções nosocomiais em utis neonatais: uma revisão integrativa. **Revista Eletrônica da Faculdade de Ceres**, v. 7, n. 1, p. 01-27, 2018.
- DAS, S. et al. Phytochemical screening, antibacterial and anthelmintic activities of leaf and seed extracts of *Coix lacryma-jobi* L. **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 5, n. 8, p. 360-364, 2017.
- DEVARAJ, R.D.; JEEPIPALLI, S.PK; XU, B. Phytochemistry and health promoting effects of Job's tears (*Coix lacryma-jobi*)-A critical review. **Food Bioscience**, v. 34, p. 1005-1037, 2020.
- DEVI K.S.; DAMAYANTI, M.; VELMURUGAN, D.; SINGH, N.R. Analysis of kidney stones by PXRD and evaluation of the antiurolithic potential of *Coix lacryma jobi*. **Int J Sci Res Publ**, v.5, n.7, p. 1-5, 2015.
- DININGRAT, D.S. et al. Phytochemical Screening and Antibacterial Activity

- Coix lacryma-jobi* Oil. **Journal of Plant Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 100-106, 2020.
- DOUGHARI J.H.; MANZARA, S. In vitro antibacterial activity of crude leaf extracts of *Mangifera indica* Linn. **Afr J Microbiol Res**, v.2, p. 67-72, 2008.
- FENG, X.et al. Extraction of Flavonoids from Leaves of *Coix lacryma-jobi* L. **Medicinal Plant**, v. 9, n. 1, p. 9-12, 2018.
- GEBASHE, F. *et al.* Ethnobotanical survey and antibacterial screening of medicinal grasses in KwaZulu-Natal Province, South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 122, p. 467-474, 2019.
- JABBOROVA, D.; DAVRANOV, K.; EGAMBERDIEVA, D. Antibacterial, Antifungal, and Antiviral Properties of Medical Plants. In: **Medically Important Plant Biomes: Source of Secondary Metabolites**. Springer, Singapore, 2019. p. 51-65.
- KE-JUN, H. et al. The Content of Each Part in *Coix* *Coix* by HPLC. **Chemical Engineering Design Communications**, v. 7, p. 42, 2016.
- LI, D. **Coix seed oil containing 16 glycerides, and pharmaceutical preparation and use thereof**. U.S. Patent n. 10,596,218, 24 mar. 2020.
- MENTARI, G.S. Inventarisasi senyawa antibakteri pada tumbuhan hanjeli (*Coix lacryma-jobi* L.) Dengan metode kromatografi gas (gc-ms). 2018. Tese de Doutorado. UNIMED.MYNTTI, M.F. **Antimicrobial composition**. U.S. Patent Application n. 16/237,709, 27 jun. 2019.
- OLOKE, J.; ODELADE, K.; OLADEJI, O. Characterization and antimicrobial analysis of flavonoids in *vernonia amygdalina*: a common chewing stick in south-western Nigeria. **Bulletin of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, p. 149, 2017.
- PATEL, B. et al. A Review: *Coix lacryma jobi* L. **Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 9, n. 4, p. 248-252, 2017.
- ROSENBERGER, M.G. et al. Atividade antimicrobiana de extrato de *Coix Lacryma-jobi* SOBRE *Xanthomonas axonopodis* PV. *Manihotis* e *Fusarium graminearum*. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 13, n. 1, 2020.
- SILVESTRE, O.P.; RANGEL, M.P.; BONI, S.M. Microrganismos isolados de pontas de cateteres venosos e perfil de suscetibilidade antimicrobiana. **Revista Saúde & Comunidade**, v. 1, n. 01, p. 3-11, 2018.

Recebido em: 15/07/2020.

Aceito em: 24/09/2020.