AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E ANTIMICROBIANA DAS SEMENTES DE PERSEA AMERICANA (LAURACEAE)

Greice Rafaele Alves, Marcella do Carmo Barroso de Siqueira, Ana Paula Paterno Pacheco, Alexandre Bella Cruz, Rivaldo Niero

Área: Fitoquímica, Biotecnologia e Farmacologia de Plantas Medicinais

Introdução: Persea americana Mill. (P. americana) conhecida popularmente como abacate, possui três variedades conhecidas, P. americana var. drymifolia, P. americana var. americana e P. americana var. guatemalensis (1). Essa espécie contém uma variedade de nutrientes essenciais e abundantes fitoquímicos que auxiliam no tratamento de doenças. Já os frutos dispõem de carotenoides, minerais, compostos fenólicos, vitaminas, ácidos graxos, alcaloides, álcoois alifáticos, entre outros (2; 3; 4). Estudos demonstram que o abacate pode reduzir a hipercolesterolemia, atuar no tratamento da hipertensão, diabetes, e como inseticida, fungicida e antimicrobiano, podendo ser utilizada no tratamento de distúrbios gástricos, devido à sua atividade anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana (5; 2; 4). Nas últimas décadas, a resistência antimicrobiana expandiu rapidamente por todo o mundo, se espalhando de um país para o outro, caracterizando-se como uma ameaça global de saúde pública e econômica. Bactérias multirresistentes são endêmicas mundialmente, o que se deve, entre outros fatores, ao uso generalizado, mal uso e uso excessivo de antibióticos (6). As infecções fúngicas, na maioria dos casos, são superficiais, afetando o cabelo, pele e unhas, no entanto, algumas espécies são capazes de causar doenças com risco de vida. Geralmente, as infecções fúngicas são limitadas aos locais iniciais da infecção em indivíduos imunocompetentes, por outro lado, se os fungos se disseminarem dos locais iniciais de infecção para a corrente sanguínea, podem se disseminar para qualquer órgão, podendo causar infecções fatais, as quais são responsáveis por mais de um milhão de mortes em todo o mundo por ano (7).

Objetivos: Preparar um EB mediante maceração em solução metanólica durante sete dias e obter frações por partição líquido-líquido com solventes de polaridades crescentes; isolar, por meio de métodos cromatográficos, como cromatografia em coluna aberta e cromatografia flash, os principais metabólitos presentes e identificar os componentes isolados, por RMN de 1H e 13C; realizar triagem de avaliação antimicrobiana contra diferentes micro-organismos patogênicos por meio do método de microdiluição em caldo.

Metodologia: As sementes de P. americana Mill. foram secas em estufa a 40°C e livres de cascas, pulverizadas em liquidificador, e extraídas por maceração estática em metanol à T.A, na proporção três partes de solvente para uma parte de sementes, durante sete dias. Após filtração, o solvente foi removido por evaporação sob pressão reduzida em rota evaporador e pesados em balança analítica. O extrato metanólico concentrado, foi resuspendido e submetido a partição líquido-líquido, utilizando hexano, clorofórmio e acetato de etila para a obtenção das respectivas frações semipurificadas, rendendo 5,8, 0,5 e 0,9g, respectivamente. Todas as frações foram concentradas em

rotaevaporador à pressão reduzida (8; 9; 10). Posteriormente, as frações passaram por um processo de purificação através de cromatografia em coluna. Os compostos isolados foram identificados por métodos espectroscópicos como RMN-1H e 13C. A CIM foi determinada usando a técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as normas CSLI M100-S28 (2018) e CSLI M27-A4 (2017), com pequenas modificações. Em uma placa de microtitulação de 96 poços, as amostras de P. americana (40 mg/mL) foram submetidas à diluição dupla, para atingir as concentrações entre 1000 e 1,95 µg/mL. Posteriormente, 50 µL do inóculo microbiano foi adicionado a cada poço da placa (menos no controle negativo), de forma que, para as bactérias, resultou na concentração equivalente de 5 X 105 células/mL e para os fungos resultou em 5 X 103 a 2,5 X 104 células/mL. A placa foi selada com filme PVC e incubada em estufa a 37ºC por 18-24 horas para as bactérias, 30ºC por 24-48 horas para o fungo leveduriforme e a temperatura ambiente por 7 a 10 dias para os fungos filamentosos. Após o período de incubação, 50 µL de revelador (cloreto de trifeniltetrazólio para as bactérias e resazurina para o fungo) foram adicionados a cada poço, a fim de realizar a inspeção visual do crescimento dos micro-organismos.

Resultados: Inicialmente, a fração de hexano a foi submetida a CC utilizando sílica gel como fase estacionária, e uma eluição em gradiente de hexano:acetona (0¿100) rendendo 94 subfrações, as quais foram agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico, observado por CCD (Coluna 1). A subfração 73-92 eluida no gradiente 75:25, foi recromatografada por CC, utilizando o mesmo sistema de eluição acima citado, rendendo 196 subfrações, também agrupadas de acordo com o perfil de CCD (Coluna 2). Nesse processo, quatro subfrações apresentaram-se puras, sendo denominadas de PAH 99-100 (25 mg), PAH 108-114 (43 mg), PAH 137-142 (354 mg) e PAH 161-169 (31 mg). Da mesma forma, a subfração 154-160 oriunda da coluna 2, foi recromatografada por CF, utilizando o sistema de eluição hexano:acetona (7:3), rendendo 97 subfrações. Após análise por CCD, foram observadas duas subfrações com bom grau de pureza, sendo denominadas de PAH 58-62 e PAH 63-96. Da coluna da fração de hexano (Coluna 1), a subfração 46-65 foi recromatografada por CF, utilizando o mesmo sistema de eluição citado acima, e rendendo 122 subfrações. Através do perfil por CCD apenas a subfração denominada de PAH 17-18 (58 mg), apresentava-se com bom grau de pureza. Por outro lado, a subfração 10-16 foi submetida a uma CF, utilizando uma mistura de hexano:acetona (7:3) como fase móvel, rendendo 82 subfrações; entre essas, a subfração denominada de PAH 11-21 (52 mg) apresentou-se com grau de pureza suficiente para análises espectroscópicas. Os compostos PAH 161-169, PAH 58-62 e PAH 63-96, após análises espectroscópicas e com base de dados da literatura, sugeriram ser a mesma substância, e denominada de 1,2,4-trihidroxi-n-heptadec-16-ino (11). Por outro lado, os compostos PAH 99-100, PAH 108-114 e PAH 137-142, após análises espectroscópicas, foram denominados de 1-acetoxi-2,4-dihidroxi-n-heptadec-16-eno, 1-acetoxi-2,4-dihidroxi-n-heptadec-16-ino e 1,2,4-trihidroxi-n-heptadec-16-eno, respectivamente (13; 11). Em relação ao composto PAH 17-18 (2,4-diacetoxi-1-hidroxi-n-heptadec-16-eno), após análise de RMN, demonstrou sinais característicos de uma possível mistura dos compostos PAH 99-100 e PAH

108-114 isolado da coluna 2 e, de acordo com os valores descritos por LEE et al. (3). Da fração de diclorometano foi isolado apenas o composto PAD 27-39, que foi obtido na forma de um sólido branco amorfo após sucessivas lavagens utilizando uma mistura de hexano:acetona como solvente. Após análises espectroscópicas e seus dados comparados com a literatura mostraram que se trata do composto PAH 137-142 isolado na fração de hexano e denominado de 1,2,4-trihidroxi-n-heptadec-16-eno. Da fração de acetato de etila, após sucessivas colunas cromatográficas, foi isolado o composto PA-AE 6-11, após análise de RMN os dados espectrométricos sugeriram uma estrutura de um flavonoide similar a (+)-catequina. Após o processo de purificação, foi realizado o teste da CIM, com o intuito de avaliar a CIM do extrato metanolico bruto (EMB) e suas respectivas frações semipurificadas de hexano, diclorometano e acetato de etila, e do composto isolado PAD 27-39 contra os micro-organismos estudados. Em relação à bactéria E. coli e o fungo filamentoso A. niger, nenhuma das amostras apresentaram atividade antimicrobiana, mesmo na concentração máxima testada. Por outro lado, para a bactéria S. aureus, a fração de acetato de etila apresentou atividade antimicrobiana na concentração de 250 µg/mL. Em contrapartida, para C. albicans, a fração de diclorometano apresentou atividade antimicrobiana na concentração de 125 µg/mL, e o composto PAD 27-39 na concentração de 31,25 µg/mL. Para o fungo filamentoso E. flocosum, o composto PAD 27-39 apresentou atividade antimicrobiana na concentração de 3,90 µg/mL, a fração de hexano (CIM 15,62 µg/mL), o EMB (CIM 31,25 µg/mL) e a fração de diclorometano (CIM 250 µg/mL). A fração de diclorometano e o composto PAD 27-39 mostraram-se mais efetivas para M. canis com valor de CIM de 3,90 µg/mL. A fração de hexano apresentou uma CIM de 7,81 µg/mL, e o EMB (CIM 31,25 µg/mL). Para M. gypseum, o composto PAD 27-39 apresentou atividade antimicrobiana na concentração de 3,90 µg/mL, fração de hexano (CIM 15,62 µg/mL), fração de diclorometano (CIM 31,25 µg/mL) e para o EMB CIM de 125 µg/mL. Contra T. mentagrophytes, o composto PAD 27-39 se mostrou efetivo na CIM 3,90 µg/mL, fração hexano e a fração de diclorometano (CIM 7,81 µg/mL), e para o EMB (CIM 31,25 µg/mL). Por fim, para T. rubrum para o composto PAD 27-39, a concentração inibitória mínima foi de 3,90 µg/mL, para a fração de hexano (CIM 15,62 µg/mL), EMB (CIM 62,50 µg/mL) e para a fração de diclorometano (CIM 125 µg/mL).

Considerações finais: Os resultados obtidos demonstraram que através de técnicas cromatográficas foi possível isolar e identificar nove compostos, os quais alguns apresentaram ser a mesma substância após a elucidação estrutural. Da fração de hexano foram isolados e identificados os compostos 2R,4R-diacetoxi-1-hidroxi-n-heptadec-16-eno, 1,2,4-trihidroxi-n-heptadec-16-eno, 1,2R,4R-trihidroxi-n-heptadec-16-ino, 1-acetoxi-2R,4R-dihidroxi-n-heptadec-16-eno e 1-acetoxi-2R, 4R-dihidroxi-n-heptadec-16-ino. Da fração de acetato de etila foi isolado e identificado (+)-catequina.

Financiamento ou apoio: CNPq; UNIEDU (Artigo 170); FAPESC; Vice-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação/Univali.

Referências

1) ZARZOSA, A. O.; MAGANÃ, M. B.; RODRÍGUEZ, J. J. G.; ALVAREZ, L. J. F.; MÁRQUEZ, M. L.; GUERRERO, B.

Z.; GARCIGLIA, R. S.; GÓMEZ, R. L.; MEZA, J. E. L. Bioactive molecules from native Mexican avocado fruit (Persea americana var. drymifolia): A review. Plant Foods for Human Nutrition, v. 76, p. 133-142, 2021. 2) DABAS, D. et al. Avocado (Persea americana) seed as a source of bioactive phytochemicals. Current Pharmaceutical Design, v. 19, p. 6133-6140, 2013. 3) LEE, T. H. et al. H. Heptadecanols from the leaves of Persea americana Var. americana. Food Chemistry, v. 132, p. 921-924, 2012. 4) TABESHPOUR, J.; RAZAVI, B, M.; HOSSEINZADEH, H. Effects of Avocado (Persea americana) on metabolic syndrome: A comprehensive systematic review. Phytotherapy Research, v. 31, n. 6, p. 819-837, 2017. 5) ATHAYDES, B. R. et al. Avocado seeds (Persea americana Mill.) prevents indomethacin-induced gastric ulcer in mice. Food Research International, v. 119, p. 751-760, 2019. 6) CHRISTAKI, E.; MARCOU, M.; TOFARIDES, A. Antimicrobial resistance in bacteria: Mechanisms, evolution, and persistence. Journal of Molecular Evolution, v. 88, n. 1, p. 26-40, 2020. 7) STRICKLAND, A. B.; SHI, M. Mechanisms of fungal dissemination. Cellular and Molecular Life Sciences, v. 78, p. 3219-3238, 2021. 8) CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Química Nova, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998. 9) HOSTETTMANN, K. Sample Preparation and Purification. In: Preparative chromatography techniques: Applications in natural product isolation. New York, 2. ed., p.4-14, 1997. 10) HOSTETTMANN, K.; GUPTA M. P.; MARSTON, A. QUEIROZ E. F. Handbook of strategies for the isolation of bioactive natural products. SECAB and CYTED, Bogotá, 2008, 120p. 11) OBERLIES, N. et al. Cytotoxic and insecticidal constituents of the unripe fruit of Persea americana. Journal of Natural Products, v. 61, n. 6, p. 781-785, 1998. 12) DOMERGUE, F.; HELMS, G. L.; PRUSKY, D.; BROWSE, J. Antifungal compounds from idioblast cells isolated from avocado fruits. Phytochemistry, n. 54, p. 183-189, 2000.