
Ciências Biológicas Integral

Pedro Felipe de Moraes Paulo

Utilização da HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) para identificação do elemento antibacteriano extraído via hexano de *Aristolochia gigantea*

Pedro Felipe de Morais Paulo

**Utilização da HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) para
identificação do elemento antibacteriano extraído via
hexano de *Aristolochia gigantea***

Orientador: Prof. Dr. Ederio D. Bidoia

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas.

Rio Claro

2012

589.9
P331u

Paulo, Pedro Felipe de Moraes

Utilização da HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) para identificação do elemento antibacteriano extraído via hexano de *Aristolochia gigantea* / Pedro Felipe de Moraes Paulo. - Rio Claro : [s.n.], 2012

45 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura e bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Edério Dino Bidoia

1. Bacteriologia. 2. Elemento bactericida - Extração. 3. Caracterização cromatográfica. 4. Cromatografia. 5. Antibiótico. 6. Antibiograma. 7. Acetonitrila. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP



Dedico este trabalho a
minha amada família,
como demonstração
de gratidão por todos
os momentos em que
apoiaram minhas
decisões, ajudaram
com minhas dúvidas e
me ampararam sem
nunca hesitar.

Muito obrigado!



AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo o que ele já colocou de bom no meu caminho;

Um abraço muito forte e especial para Felipe (Socó), Richard (Frodo), Matheus (Pivete), Bruno (Siri), Leandro (Betânia), Evandro (Hanson), Fernanda (Fêr), Priscilla (Pri), Talitta (Tá), Viviane (Vivi) e Mariana (Dengue) e todos os outros que formaram o bando de amigos mais queridos que eu pudesse ter desejado.

Aos meus amigos da universidade e turma da minha sala. Tantos anos de convivência não podem ser esquecidos pelo simples fato de que cada um de tomou seu próprio rumo. As experiências que compartilhamos e aprendemos juntos durante nossa jornada acadêmica ficarão marcadas para sempre: foram boas e ruins, empolgantes e desesperadoras, alegres e tristes, mas sempre com uma pitada de companheirismo. E isso faz parte do convívio saudável durante um período bem agitado que foram esses últimos anos, que com certeza nos fortaleceram e ajudaram nosso crescimento.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edério, que com paciência e dedicação guiou meus estudos para os melhores resultados possíveis, tornando desse desafio uma aprendizagem a cada dia de testes.

Ao pessoal dos laboratórios do Departamento de Bioquímica que me ajudaram muito, principalmente os técnicos que sempre estiveram dispostos a me auxiliar em praticamente tudo. Também a estudante de intercâmbio Alex que chegou em boa hora para me dar uma mãozinha com os experimentos. E por fim a todos os funcionários da UNESP que de uma maneira ou de outra cruzaram meu caminho ou pelo simples fato de manterem esta universidade um lugar muito agradável de se estar.

RESUMO

A ciência, principalmente a área da Farmacologia, vem ao longo dos anos desenvolvendo medicamentos eficazes e seguros para o tratamento médico de infecções bacterianas e seu sucesso reduz cada vez mais as mortalidades causadas por estes e outros microrganismos. Logo, a busca por novos compostos moleculares para o uso terapêutico é de grande importância para ampliar a gama de substâncias eficientes, buscando-se também menos efeitos colaterais, que podem ser disponibilizadas no mercado. Visando encontrar estes novos componentes, recorre-se às informações presentes em diversas áreas, principalmente na Etnobotânica, ciência que explora, verifica e armazena o conhecimento popular adquirido pelo homem através da sua interação com as plantas, sobre suas propriedades benéficas ou não, e usos mais comuns. A família Aristolochiales é uma das mais significativas no Brasil, chega a possuir 475 espécies. Este trabalho busca caracterizar o(s) composto(s) bactericidas presentes em *A. gigantea* através de extrações em hexano e acetonitrila como solventes, utilizando a HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) para obter novas informações mais detalhadas destes. Testes de antibiograma averiguaram a eficiência das amostras durante os experimentos para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

Palavras-Chaves: *Aristolochia gigantea*. Antibiótico. Hexano. Acetonitrila. Extração. HPLC. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	07
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Primeira experimentação	12
3.1.1. Coleta do material vegetal	12
3.1.2. Extração e filtração do material bruto	12
3.1.3. Antibiograma	13
3.1.3.1. Bactérias	13
3.1.3.2. Meios de cultura	14
3.1.3.3. Inoculação das placas de Petri	14
3.1.4. Primeiro Teste	15
3.1.5. Concentração do material bruto	16
3.1.6. Segundo Teste	16
3.1.7. Terceiro Teste	17
3.2. Segunda experimentação	17
3.2.1. Coleta do material vegetal	18
3.2.2. Extração e filtração do material bruto	18
3.2.3. Quarto Teste	19
3.2.4. Concentração do material bruto	19
3.2.5. Quinto teste	20
3.2.6. Sexto Teste	21
3.3. Terceira experimentação	22
3.3.1. Cromatografia em coluna	22
3.3.2. Testes com HPLC	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1. Antibiogramas	25
4.2. Coluna cromatográfica	27
4.3. HPLC	27
5. CONCLUSÕES	29
6. REFERÊNCIAS	30
7. APÊNDICES	31

7.1.	Apêndice A – Tabelas de resultados	32
7.2.	Apêndice B – Tabelas de resultados	33
7.3.	Apêndice C – Tabelas de resultados	34
7.4.	Apêndice D – Fotografias do trabalho	35
7.5.	Apêndice E – Fotografias do trabalho	36
7.6.	Apêndice F – Fotografias do trabalho	37
7.7.	Apêndice G – Fotografias do trabalho	38
7.8.	Apêndice H – Fotografias do trabalho	39
7.9.	Apêndice I – Resultados da análise em espectrofotômetro	40
7.10.	Apêndice J – Resultados da análise em espectrofotômetro	41
7.11.	Apêndice K – Resultados da análise em espectrofotômetro	42
7.12.	Apêndice L – Relatórios do testes em HPLC	43
7.13.	Apêndice M – Relatórios do testes em HPLC	44
7.14.	Apêndice N – Relatórios do testes em HPLC	45
7.15.	Apêndice O – Relatórios do testes em HPLC	46
7.16.	Apêndice P – Tabela de materiais e equipamentos	47

1.0 INTRODUÇÃO

A ciência, principalmente a área da Farmacologia, vem ao longo dos anos desenvolvendo medicamentos eficazes e seguros para o tratamento médico de infecções bacterianas e seu sucesso diminui cada vez mais as mortalidades causadas por estes e outros microrganismos. Entretanto, novos agentes microbianos são produzidos, pois muitos já perderam sua eficiência devido ao também surgimento de microrganismos resistentes à suas propriedades quimioterápicas (RANG, 2004).

Duas teorias podem explicar o surgimento de organismos resistentes: A primeira – Teoria Genética – propõe que numa população de bactérias existam alguns indivíduos que por mutações genéticas apresentem naturalmente maior resistência (mesmo sem o antibiótico) do que as demais. Estas seriam eliminadas pelo medicamento, deixando apenas as mais resistentes se multipliquem. Segunda – Teoria Fenotípica – salienta que a resistência só pode ser adquirida na presença do antibiótico e a transmissão dessa informação não seria transmitida geneticamente (LACAZ, 1975).

Logo, a busca por novos compostos moleculares para o uso terapêutico é de grande importância para ampliar a gama de substâncias eficientes, buscando-se também menos efeitos colaterais, que podem ser disponibilizadas no mercado. Existem vários processos para isto, entre eles a modificação de moléculas provenientes de fontes naturais e/ou sintéticas, produção de moléculas novas e extração, isolamento e purificação de componentes retirados de fontes naturais (Di STASI, 1996).

Visando encontrar estes novos componentes, recorre-se às informações presentes em diversas áreas, principalmente na Etnobotânica, ciência que explora, verifica e armazena o conhecimento popular adquirido pelo homem através da sua interação com as plantas, sobre suas propriedades benéficas ou não, e usos mais comuns. Um trabalho que envolve diversos profissionais da ciência, que procura por espécies vegetais de potencial importância para que assim seja possível a proteção e conservação destes exemplares (SCHULTES, 1995). Sabe-se que o uso de plantas acompanha a humanidade muito mesmo antes das escritas rudimentares dos homens pré-históricos, o que mostra a grande e importância da relação do homem com o ambiente.

A Fitoterapia no Brasil é uma prática comum praticada pelos indígenas nativos antes mesmo da colonização, essa técnica hoje em dia é atribuída a pessoas que buscam meios

alternativos de medicamentos, populações onde não há acesso a medicamentos e/ou os tratamentos são caros, ou sequer algum tipo de serviço médico. A OMS (Organização Mundial da Saúde) reconhece a importância dessa prática, até mesmo para países desenvolvidos (REZENDE et al, 2002). Milhares de espécies vegetais foram catalogadas como portadoras de alguma propriedade de cura, entretanto pesquisas mais detalhadas devem ser realizadas a fim de esclarecer o correto manejo para o preparo do medicamento, seja como chá ou emplastos, pois em alguns casos a planta também pode apresentar fatores toxicológicos.

Sendo assim, quanto maior for a diversidade disponível de plantas, maior é a chance de serem encontrados potenciais fitoterápicos a ser pesquisados, o que transforma o Brasil num grande foco de pesquisas relacionadas a medicamentos. O Brasil possui cerca de 50 mil espécies de plantas identificadas, cerca de 20% do total de vegetais conhecidos pela humanidade. Ou seja, o país com a maior biodiversidade terrestre (MARTINS, 2009). Com seus biomas distintos distribuídos pelo território, nossa flora torna-se um patrimônio a ser protegido e explorado com consciência.

A família Aristolochiales é uma das mais significativas no Brasil, chega a possuir 475 espécies e foi descrita por Antoine Laurent Jussieu. São trepadeiras de caule com casca espessa e sulcada, folhagem densa e brilhante, flores solitárias. Seu nome foi atribuído ao fato de facilitarem o parto e estão entre as mais antigas plantas a serem reconhecidas como medicinais. As plantas desta família são conhecidas popularmente por papo-de-peru, milhomens, cipó de mil homens, jarra-açu, mata homes entre outras (HOEHNE, 1940-1968; Di STASI, 2002).

Dentre seus gêneros mais conhecidos (*Thottea* e *Asarum*) o *Aristolochia* é o mais significativo no que tange as propriedades medicinais de suas aproximadamente 60 espécies. Muitos componentes já foram pesquisados e identificados dentro desse gênero, entre eles os Ácidos Aristolóquicos, terpenóides, alcaloides, sesquiterpenolactonas, ligana, compostos como β -cariofileno, α -copaeno, β -elemeno, δ -elemeno e α -humuleno. O ácido aristolóquico inclui elementos que causam infertilidade em propriedades antiestrogênica, anti-implantacional, antiespermatogênica; além de antifídico. Seus outros compostos atuam como: redutor da pressão arterial, relaxante muscular, analgésico, antitérmico, anti-inflamatório, antisséptica, cicatrizante, antifúngica e a mais relevante para este trabalho, a antibacteriana (Di STASI, 2002).

A importância sobre os cuidados e manejos de plantas medicinais, pesquisas e posteriormente repasse das informações para a população é corroborada pelos dados toxicológicos obtidos através de pesquisas, que mostram o efeito de certos compostos com atividades: hepatotóxicas, nefrotóxica, aberrações cromossômicas, carcinogênicas, mutagênicas e abortivas (Di STASI, 2002).

Buscando caracterizar o elemento antibacteriano de *Aristolochia gigantea* Mart. & Zucc. é preciso extrair os compostos da planta. Villas Boas (2005) em seu trabalho concluiu que seus extratos obtidos através do caule da planta possuem maior atividade do que os extratos de folhas e flores. Após essa etapa, um fracionamento do composto é realizado através de técnicas cromatográficas e cada uma das frações é avaliada por testes de antibiograma.

A Cromatografia teve seu início em 1987, quando uma composição de petróleo foi fracionada em terra Fuller por David Talbot Day, que passou a trabalhar em possíveis aplicações para o método. Muitos outros trabalhos de grande importância foram realizados a partir da separação de substâncias desde então (como a separação da clorofila por Tswett). Esta técnica consiste na separação, por meios físicos e químicos, de um composto ou amostra através de fases sólidas/líquidas ou líquidas/gasosas, dependendo da propriedade do composto. A vantagem da **HPLC** (High Pressure Liquid Chromatography) é que esta trabalha com pressões muito maiores do que a ambiente e é uma técnica de *ultra microanálise*, ou seja, pode detectar massas de componentes em quantidades ínfimas (menos de 10^{-8} g), de maneira precisa (CIOLA, 2003).

A **HPLC** tem a capacidade de separar e realizar análises quantitativas de alta precisão de diversos compostos em pouco tempo, com sensibilidade e eficiência. Ao invés de se utilizar uma coluna de vidro e sílica para a fase sólida, como era feita na Cromatografia Tradicional, essa utiliza colunas preenchidas com compostos porosos, normalmente microesferas, compactados que tornam a separação muito mais detalhada e dependendo da composição, possibilitando o fracionamento de compostos que antes não podiam ser separados, pois formavam pares iônicos com o recheio, como corantes polares, isômeros e outros (COLLINS, 1997).

Técnicas em laboratório foram desenvolvidas para avaliar “in vitro” a eficiência antimicrobiana dos antibióticos assim que estes foram descobertos; percebeu-se que para bactérias da mesma espécie, mas de amostras diferentes, o mesmo antibiótico atuava de

maneira distinta para ambas, sendo mais ou menos resistentes. Logo, a caracterização da sensibilidade e resistência de uma bactéria a diferentes tipos de agentes antibióticos é denominada Antibiograma (LACAZ, 1975).

Avalia-se a Atividade Microbiana através da quantidade mínima do agente antibacteriano necessária para impedir o crescimento do organismo em teste, este valor é denominado **concentração mínima inibitória** ou **MIC** (Minimum Inhibitory Concentration). Caso as condições de cultivos sejam padronizadas, é possível avaliar diferentes agentes microbianos e selecionar o mais eficaz contra um organismo patogênico. Para isso, condições como pH, aeração, composição do meio de cultura e temperatura, por exemplo, devem ser mantidas sobre controle (MADIGAN, 2010).

Uma das técnicas mais utilizadas para esta verificação é a *difusão em disco*. O organismo a ser averiguado é inoculado em uma placa de Petri contendo um meio sólido de cultura. Em seguida, discos de papel filtros contendo concentrações conhecidas dos antibióticos são colocados sobre a cultura da placa. O agente difunde-se da cultura para o ágar da placa durante a incubação. Ao redor do disco surge uma área onde houve a ausência do crescimento do microrganismo, determinada *zona de inibição*, caso o antibiótico tenha surtido efeito.

Escherichia coli é uma bactéria Gram-Negativa e anaeróbia facultativa, comumente isolada em laboratórios para testes. Em humanos causa infecções como meningites, septicemias, pneumonias, infecções urinárias e intestinais. Faz naturalmente parte da flora intestinal de humanos e animais, entretanto algumas cepas patogênicas que podem causar desde simples diarreias até diarreias fatais devido à grave desidratação (MURRAY, 1995; SAVIOLLI, 2010).

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-Positiva, cresce melhor em ambientes anaeróbios, mas poder ser aeróbia facultativa. Esta espécie é documentada como um patógeno oportunista em humanos, causadoras das maiores causas de morbidade e mortalidade; suas infecções podem ocorrer em diversos tecidos do corpo humano e incluem: pneumonia, osteomielite, miocárdicas, pericárdicas, meningites, do trato urogenital, sistema nervoso central e órgãos intra-abdominais, entre outras, além de também estar associada a intoxicações alimentares (MURRAY, 1995).

2.0 **OBJETIVOS**

Este trabalho visou reproduzir pesquisas previamente realizadas sobre os compostos antibacterianos extraídos de folhas e do caule da espécie *Aristolochia gigantea*, possibilitando refinar os resultados mediante a aplicação do método de High Pressure Liquid Chromatography (**HPLC**) e verificar possíveis novos dados para a identificação desses compostos.

Para tal, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foram submetidos a antibiogramas contendo extrato da planta. E os compostos presentes no extrato bruto extraído com hexano, ou acetonitrila, foram detectados por **HPLC**.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Primeira Experimentação

3.1.1 Coleta do Material Vegetal

Partes do caule de *A. gigantea* foram coletados do Jardim Experimental da UNESP de Rio Claro utilizando-se uma tesoura de poda, com o devido cuidado para não serem cortados os caules principais que mantêm a planta. Os pedaços foram repicados para atingirem um tamanho de aproximadamente cinco a sete centímetros para facilitar os processos de secagem e moagem. Em seguida, os pedaços foram secos durante sete dias dentro de uma estufa no Departamento de Botânica (Instituto de Biociências, Rio Claro), com o fluxo de ar ligado, o que acelerou o processo de secagem dos caules, a temperatura aproximada de 30°C.



Imagem 1. *Aristolochia gigantea*, flor e folhas

Estes pedaços secos foram triturados com o auxílio de um moedor [Manesco & Renieria, Modelo: Willey 1980] até a obtenção de material finamente particulado da amostra de caule, devidamente armazenado em um frasco de vidro fechado, até o momento de ser utilizado nos experimentos.

3.1.2 Extração e filtração do material bruto

Pesou-se (Apêndice D - Imagem 2), com o auxílio de uma balança de precisão [Shimadzu, Modelo: BL-3200H], aproximadamente 37 g do pó de caule que foi colocado dentro de um frasco de vidro graduado de 500 ml (SCHOTT) com tampa juntamente com 150 ml de hexano (Apêndice D – Imagem 3) [Reagentes Analíticos IMPEX, Tipo: Hexano PA PM 86,16]. Foi preparado um total de 10 frascos, mantendo a proporção de 1:4 (37 g pó/ 150 ml solvente). Optou-se o hexano, composto apolar, de acordo com os resultados obtidos em estudos anteriores (Petrone, 2002 e Villas Boas, 2005) que concluíram ser o melhor solvente para extrair as substâncias que contém propriedades bactericidas do material vegetal.

Os frascos de vidro Schott contendo a proporção 1:4 (37 g pó/ 150 ml solvente) foram deixadas em agitação a 200 rpm em uma mesa de agitação [Catel, Modelo: CFW08] durante

10 dias (Apêndice D – Imagem 4). Após este período, as amostras foram filtradas num funil de Bücher contendo um disco de papel filtro comum em seu interior, além do auxílio de uma bomba a vácuo [QUIMIS, Modelo: Q-355B2], conectada a um kitasato acoplado com o funil (Apêndice D – Imagem 5). Com este processo foram obtidos 350 ml da mistura de material bruto em hexano (**B1**), chamado de “Bruto”, pois não foi fracionado, amostra essa que foi armazenada em um frasco de vidro.

Como neste trabalho visou o uso de HPLC para análise dos componentes antimicrobianos presentes em *A. gigantea* foi realizado um teste com acetonitrila [J.T. Baker, Modelo: FW 41.05 9017.03], pois este solvente de polaridade média é o comumente utilizado no HPLC. Assim, foi adicionada a acetonitrila a um tubo de ensaio contendo uma pequena amostra de **B1** e verificou-se que este diluía-se naquele solvente.

3.1.3 Antibiograma

Realizou-se um teste de antibiograma para verificar a possibilidade de haver atividade antimicrobiana neste material bruto (**B1**). Sendo assim, procedeu-se a realização das etapas básicas de preparação dos discos e placas de Petri (LABORCLIN LTDA, 2011 e Bauer et al, 1966) contendo as bactérias a serem utilizadas no decorrer do trabalho. Portanto, todos os testes de antibiogramas realizados a partir daqui foram preparados da mesma maneira.

3.1.3.1 Bactérias

Para os testes de antibiograma foram utilizadas as bactérias Gram-positiva *Staphylococcus aureus* [ATCC 6583], e outra Gram-negativa *Escherichia coli* [CCT 1361], ambas responsáveis por infecções em seres humanos. Estas bactérias foram cultivadas e mantidas em meio ágar nutriente (**NA**) em tubos inclinados e após o crescimento, mantidas refrigeradas como estoque.

3.1.3.2 Meios de Cultura

A etapa seguinte foi preparar os meios de cultura Brain Heart Infusion (**BHI**) [HIMEDIA, Tipo: M210-500G] e Muller-Hinton (**MH**) [HIMEDIA, Tipo: M173-500G], a partir das instruções contidas em suas embalagens:

- Meio Nutriente (**NA**): 0,3 g extrato de carne + 0,5 g peptona + 2,0 g ágar em 100 ml de água destilada;
- Brain Heart Infusion (**BHI**): 3,7 g de BHI + 2,0 g ágar em 100 ml de água destilada;
- Ágar Mueller-Hinton (**MH**): 9,45 g de Mueller-Hinton + 9,00 g ágar em 400 ml de água destilada.

Placas de Petri, tubos de cultura e frascos de vidro Schott contendo os meios, discos de papel e água destilada foram devidamente autoclavados [Phoenix, Modelo: AV-30].

Dois tubos de cultura contendo o meio **BHI** inclinado após serem autoclavados foram inoculados cada um com uma das bactérias (*E. coli* ou *S. aureus*), coletando-se uma pequena amostra destas com o auxílio de uma alça metálica esterilizada em bico de Bunsen, provenientes do cultivo em meio **NA**. Cada um dos tubos foi incubado mantido em estufa [Biothec, Modelo: BT-62] durante 24 h a 35°C para o crescimento da cultura de bactérias. Esse procedimento sempre foi realizado antes de cada inoculação nas placas de Petri dos testes de antibiograma e tanto nesta etapa (chamada “repique”) quanto à de inoculação das placas de Petri foram realizadas em capela de fluxo laminar [Filterflux, Modelo SBIIA1-808/4]. Evitando-se assim qualquer tipo de contaminação por microrganismos do ambiente (Apêndice D – Imagem 6).

3.1.3.3 Inoculação das placas de Petri

Após o período de 24 h de cultivo em meio **BHI** preparou-se uma suspensão das bactérias em água destilada, cada uma em um tubo diferente, até que cada suspensão atingisse uma turvação entre 0,5 a 1,0 dentro da escala de Mac Farland (LABORCLIN LTDA, 2011). As bactérias foram a seguir transferidas para placas de Petri contendo meio **MH**, distribuído uniformemente até ser formada uma fina camada no fundo da placa, com o auxílio de um SWAB, espalhando-se a suspensão de bactérias por toda a superfície.

3.1.4 Primeiro Teste:

No total foram quatro placas de Petri: duas inoculadas por *E. coli* e duas inoculadas por *S. aureus*. Em seguida foram dispostos os discos de 6 mm de diâmetros impregnados com as amostras do produto bruto em cada placa, com o auxílio de uma pinça esterilizada (Apêndice D – Imagem 7):

- Um disco contendo apenas hexano para verificar se o solvente produziria algum efeito inibitório sobre o crescimento das bactérias (símbolo: **H**);
- Dois discos foram preparados contendo amostras de **B1** diluídas em hexano (símbolos: **B1a** e **B1b**) e foi preparado;
- Um disco contendo amostra **B1** diluída em acetonitrila (símbolo: **A**).

Os discos foram preparados gotejando-se duas gotas de cada amostra por disco, cada gotejamento repetido três vezes com intervalos de uma hora cada, aguardando-se a evaporação do solvente fixando o extrato vegetal bruto. Adicionou-se ao centro de cada placa um disco contendo o antibiótico gentamicina 10 µg/ml (símbolo: **G**) [DME, Tipo: GEN 10] como controle, para estipular um padrão do tamanho dos halos de inibição gerados pelo material bruto extraído de *A. gigantea*.

- Esquema das placas do Primeiro Teste (Figura 1; Apêndice E – Imagens 8 e 9):

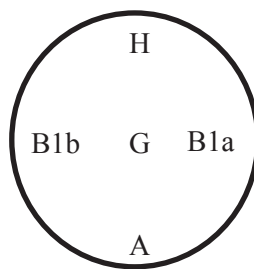


Figura 1. Esquema da Placa de Petri contendo os discos impregnados com cada uma das substâncias. Duas placas para *E. coli* e duas para *S. aureus*.

Estas placas incubadas durante 24 h a 35°C para o crescimento das bactérias. Caso houvesse algum resultado positivo os halos inibição de crescimento, ao redor dos discos foram medidos com o auxílio de uma régua e comparados com aqueles produzidos pela

gentamicina. Caso o extrato estivesse muito diluído foi realizado um procedimento para concentrar o extrato **B1**.

3.1.5 Concentração do material bruto

Concentrou-se a amostra líquida de **B1** em um béquer num banho-maria [Hemoquímica, Modelo: HM1003] a aproximadamente 55°C por 30 min, dentro de capela com o exaustor ligado (Apêndice E – Imagem 10). O béquer foi pesado antes do procedimento (107,5 g) e depois dele (110,66 g) para assim se obter a quantidade de material bruto obtido após a concentração (3,16 g). Esta amostra foi mantida dentro de capela para as próximas etapas (Apêndice E – Imagem 11).

Esta concentração do material vegetal foi realizada para potencializar os efeitos da substância bactericida presente na amostra, visto que a própria gentamicina comercial está concentrada e purificada nos discos, apresentando um halo de aproximadamente 2,0 cm. Os efeitos desse procedimento podem ser vistos pelo resultado do próximo teste.

3.1.6 Segundo Teste:

Em duas placas de Petri (mesmo procedimento padrão), cada uma contendo *E. coli* e *S. aureus* e com o disco padrão de gentamicina (**G**), foram acrescentados os seguintes discos (Apêndice E – Imagem 12):

- Um disco impregnado com acetonitrila (**A**) para verificar se esta possui ou não efeito inibitório sobre o crescimento das bactérias;
- Um disco contendo a pasta bruta concentrada do material **B1** colocada diretamente sobre o disco (**C**);
- Dois discos contendo o material **B1** diluído em acetonitrila (**D**).

- Esquema das placas para o Segundo Teste (Figura 2; Apêndice E – Imagem 13, Apêndice F – Imagens 14, 15 e 16):

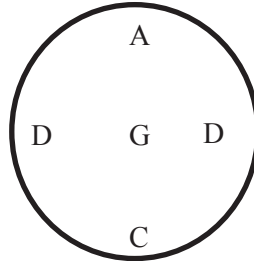


Figura 2. Esquema da Placa de Petri contendo os discos impregnados com cada uma das substâncias. Uma placa para *E. coli* e uma para *S. aureus*.

Após as 24 h de crescimento a 35°C dentro da incubadora, devido aos resultados negativos, foi realizado um terceiro teste para verificar o devido funcionamento dos discos. Nele, dois discos puros foram imersos juntamente com dois discos de gentamicina em tubos de cultura, um contendo água e outro álcool (1 ml cada), e agitados com o auxílio de um Agitador de Tubos [PHOENEX, Modelo: AP-56] para diluir o antibiótico dos discos padrões para os discos puros.

3.1.7 Terceiro Teste:

Preparadas duas placas de Petri (procedimento padrão) cada uma contendo *E. coli* e *S. aureus*. Os discos puros foram deixados imersos juntamente com os discos contendo gentamicina durante 5 h; após esse período foram deixados para secar durante 24 h dentro da Capela de Fluxo Laminar até secarem naturalmente.

Os resultados foram positivos (Apêndice A – Tabela 4) demonstrando assim que os discos estavam funcionando normalmente.

3.2 Segunda Experimentação

Foi realizada uma nova coleta no Jardim Experimental da UNESP de Rio Claro. Desta vez, além do hexano, a acetonitrila foi utilizada como solvente do material bruto.

3.2.1 Coleta do Material

Caules e folhas de *A. gigantea* foram coletados com o auxílio de uma tesoura de poda. Os materiais foram secos ao ar livre protegidos contra chuva durante sete dias. A seguir as amostras foram moídas separadamente e armazenadas assim como foi realizada a primeira coleta (Apêndice F – Imagem 15).

3.2.2 Extração e filtração do material bruto

Foram preparados:

- Dois frascos de vidro de 500 ml, contendo cada um 37 g de pó de caule para 200 ml de hexano;
- Dois frascos de 500 ml, um contendo 37 g do pó de caule com 200 ml de acetonitrila e outro com 14 g de pó de caule para 100 ml de acetonitrila;
- Dois frascos contendo 21 g de pó de folha ambas, com 100 ml de hexano em um e o outro com 100 ml de acetonitrila.

Estes frascos de vidro (Apêndice F – Imagem 17) foram deixadas em agitação por 10 dias a 220 rpm.

A filtração foi realizada da mesma maneira que a primeira. Um kitasato acoplado a uma bomba à vácuo suportando um funil de Bücher que continha um disco de folha de papel filtro, umedecido com o solvente correspondente a cada filtração para que menos material bruto fosse retido no filtro. Obteve-se: 140 ml de extrato caule/hexano; 150 ml de extrato caule/acetonitrila; 25 ml de extrato folha/hexano; 50 ml de extrato folha/acetonitrila. Cada uma destas amostras fará parte do conteúdo **B2**, para diferenciar do material extraído na “Primeira experimentação”.

3.2.3 Quarto Teste:

Preparou-se duas placas de Petri, cada uma contendo uma das bactérias. Foram aprontados dois discos para cada uma das amostras (caule/hexano, caule/acetonitrila, folha/hexano, folha/acetonitrila), sendo imersos dentro de tubos de cultura contendo cada uma delas, totalizando oito discos com amostras da **B2**. Preparou-se ainda discos com gentamicina, como referência. Utilizou-se também a amostra **B1** bruta diluída em hexano. Logo, cada placa recebeu:

- Um disco contendo a amostra caule/hexano (**CH**);
- Um disco contendo a amostra caule/acetonitrila (**CA**);
- Um disco contendo a amostra folha/hexano (**FH**);
- Um disco contendo a amostra folha/acetonitrila (**FA**);
- Um disco contendo a amostra gentamicina/água (**GA**);
- Um disco contendo a amostra gentamicina/álcool (**GAI**);
- Um disco contendo padrão de gentamicina (**G**).

- Esquema das placas do Quarto Teste (Figura 3):

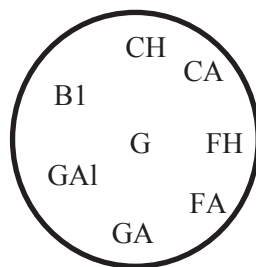


Figura 3. Esquema da Placa de Petri contendo os discos impregnados com cada uma das substâncias. Uma placa para *E. coli* e uma para *S. aureus*.

3.2.4 **Concentração do material bruto**

Dos volumes finais obtidos de cada uma das quatro amostras (caule/hexano, caule/acetonitrila, folha/hexano, folha/acetonitrila) separou-se 50% do volume para ser feita a

concentração, os outros 50% restantes foram reservados. Cada amostra foi colocada em béquer dentro de um banho-maria a uma temperatura aproximada de 50°C até consistência de uma pasta no fundo de cada béquer. O tempo variou para cada amostra devido a quantidade de solvente.

A amostra **B1**, anteriormente concentrada foi colocada em uma placa de Petri e deixada numa estufa a aproximadamente 30°C, durante uma hora, para ser ainda mais concentrada.

3.2.5 Quinto teste:

Para este teste, foram inoculadas duas placas de Petri, uma com *E. coli* e outra com *S. aureus*, reativadas por repicagem em tubos contendo o meio **BHI**. Os discos foram preparados de diferentes maneiras: oito discos foram mergulhados nas pastas formadas devido a concentração do material proveniente da segunda coleta; sendo dois discos para cada uma das amostras (caule/hexano, caule/acetonitrila, folha/hexano, folha/acetonitrila). Outros oito discos foram submetidos ao procedimento de gotejamento das amostras não concentradas, cada um com duas gotas a cada hora de intervalo, por quatro vezes. Quatro discos foram colocados na superfície da amostra **B1** concentrada para absorvê-la sendo dois após a primeira concentração e dois após a segunda concentração. Cada placa de Petri recebeu os discos:

- Um de controle de gentamicina (**G**);
- Um contendo a amostra **B1** concentrada (**B**);
- Um contendo a amostra **B1** concentrada pela segunda vez (**B+**);
- Quatro cada um contendo uma das amostras da segunda extração, preparados pelo processo de gotejamento (caule/hexano **CH**, caule/acetonitrila **CA**, folha/hexano **FH**, folha/acetonitrila **FA**);
- Quatro cada um contendo uma das amostras da segunda extração, porém **concentradas** (caule/hexano **CH+**, caule/acetonitrila **CA+**, folha/hexano **FH+**, folha/acetonitrila **FA+**).

- Esquemas das placas para o Quinto Teste (Figura 4; Apêndice F – Imagens 18 e 19):

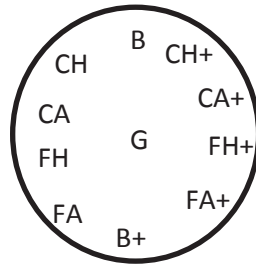


Figura 4. Esquema da Placa de Petri contendo os discos impregnados com cada uma das substâncias. Uma placa para *E. coli* e uma para *S. aureus*.

Mesmo havendo resultado positivo na placa de *S. aureus*, devido a algum erro de técnica, as bactérias não se desenvolveram de maneira homogênea (no caso da *S. aureus*) ou nem mesmo foram inoculadas, havendo falta de qualquer crescimento (ocorrido com a *E. coli*). Por este motivo, um novo teste (Sexto teste) foi realizado com as mesmas amostras do Quinto Teste, além de um novo meio **MH** das placas de Petri, pois o anterior havia se esgotado.

3.2.6 Sexto teste:

Para este teste foi levantada a hipótese da água destilada (utilizada para fazer a suspensão de bactérias que precede a inoculação das placas de Petri através do SWAB), estar rompendo a parede celular das bactérias por osmose, processo conhecido como hidrólise. Por este motivo, além da suspensão em água destilada também foi efetuada a suspensão em meio de cultura **BH líquido**, ou seja, uma salina que manteria a concentração salina do meio com a concentração do interior das bactérias.

Portanto quatro placas de Petri foram inoculadas, duas com *E. coli* e duas com *S. aureus*, e dentro de cada par, uma foi pela suspensão em água destilada (**H₂OD**) e a outra por salina do meio **BH**.

Além disso, os discos contendo as amostras foram pesados antes e depois de contê-las para averiguar a quantidade de material retida por eles, após 15 min da aplicação (Apêndice B – Tabela 7). Por fim, cada uma das quatro placas recebeu:

- Um disco contendo acetonitrila (para controle da verificação de sua influência sobre o crescimento das bactérias) (**A**);
- Um disco contendo hexano (mesmo motivo descrito acima) (**H**);
- Um disco contendo gentamicina (padrão) (**G**);
- Quatro discos, cada um contendo uma das amostras líquidas (caule/hexano **CH**, caule/acetonitrila **CA**, folha/hexano **FH**, folha/acetonitrila **FA**);
- Quatro discos, cada um contendo uma das amostras concentradas (caule/hexano **CH+**, caule/acetonitrila **CA+**, folha/hexano **FH+**, folha/acetonitrila **FA+**).

-Esquema das placas do Sexto Teste (Apêndice G – Imagens 20, 21, 22 e 23):

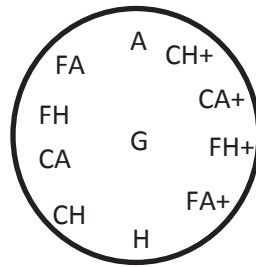


Figura 5. Esquema da Placa de Petri contendo os discos impregnados com cada uma das substâncias. Duas placas para *E. coli* e duas para *S. aureus*.

3.3 Terceira Experimentação

3.3.1 Cromatografia em coluna

Para a realização da separação por coluna cromatográfica, mais material vegetal precisou ser extraído, resultando numa terceira coleta de caules no Jardim Experimental da UNESP. Estes foram deixados para secar naturalmente em temperatura ambiente por dez dias. Foram moídos obtendo-se 245 g de pó desses caules.

Foram preparados seis frascos de vidro graduados contendo 40 g do pó para 200 ml de hexano. Deixados em agitação a 210 rpm durante sete dias. Retirado a solução após esse período, a massa vegetal ainda contida nos frascos foi pressionada contra uma peneira metálica podendo assim ser extraído uma maior quantidade de solução bruta. Solução esta que foi filtrada da mesma maneira que as anteriores, utilizando-se um funil de Büchen contendo

uma camada de papel filtro, sobre um kitasato ligado a uma bomba a vácuo. Com este procedimento, foram obtidos 450 ml de material bruto, que foi concentrado em banho-maria até o volume de 200 ml. Este material passará a ser identificado como **B3**.

A coluna de vidro foi montada com a utilização de uma bureta de 5 cm de diâmetro com suas extremidades cortadas por um técnico do laboratório. Duas rolhas de borracha tampavam as extremidades da bureta e continham um orifício cada uma para entrada e saída de líquidos através de canalículos de vidro. Conectada através de uma mangueira de borracha ao topo da bureta, encontra-se um reservatório contendo os 200 ml de amostra bruta em hexano. A base da coluna foi revestida com duas camadas de uma fina trama de linha sintética, para segurar a mistura de sílica e hexano (Apêndice G – Imagem 24).

Esta mistura foi preparada adicionando-se hexano e sílica em pó a um béquer até que uma pasta fosse formada, para depois ser assentada cuidadosamente dentro da coluna de vidro. Essa camada de sílica compactada é a fase sólida da coluna, onde as partículas diminutas que a compõem vão reter as diferentes moléculas da amostra de acordo com seu peso e tamanho; as mais leves e menores passam primeiro, sendo as primeiras amostras a serem coletadas, enquanto as maiores e mais pesadas demoram a descer, sendo as últimas a serem coletadas. O fluxo da amostra é mantido pela fase líquida, que nesse caso é o hexano.

Após a montagem da coluna, as torneiras do sistema foram abertas e deu-se início ao gotejamento da amostra que lentamente começou a ser separada pela camada compactada de sílica gel. Passado algum tempo, foram coletadas em tubos de ensaio as primeiras amostras que já apresentavam uma coloração amarelada, distinta do hexano puro que é transparente; procedimento devidamente cronometrado, anotando-se o início e o tempo final da coleta durante o fracionamento total da amostra. Durante todo o procedimento a fase fixa da coluna foi mantida sempre úmida, emersa em líquido (seja da amostra ou de hexano) pois caso contrário, caso ela secasse, estaria sujeita a rachaduras e aberturas onde a amostra correria mais facilmente, inutilizando totalmente a eficiência da coluna.

Após o término do experimento, a coluna de vidro foi desmontada e seu conteúdo foi retirado cuidadosamente de dentro: um cilindro de sílica gel endurecido contendo as diferentes camadas coloridas da separação da amostra (Apêndice G – Imagem 25). Cada região foi coletada com o auxílio de uma espátula e reservadas em tubos de ensaio diferentes. Para futuros testes, será utilizada a região mais avermelhada da coluna, pois com estudos e resultados de trabalhos anteriores (VASCONCELOS, 2008 e NERY, 2011) está coloração

está associada a taninos: substâncias desse grupo apresentam anéis benzênicos e em geral possuem efeitos bactericidas, seja por inibição de enzimas fundamentais as bactérias, modificações na estrutura e funcionalidade da membrana celular ou a complexação com íons metálicos também fundamentais para a manutenção das bactérias.

3.3.2 Testes com HPLC

Os testes em HPLC foram realizados na sessão técnica de uma empresa especializada nesse tipo de equipamento com o auxílio de um técnico do local. Primeiramente as amostras de **B1**, caule/acetoneitrila de **B2**, e região vermelha de **B3** foram escolhidas para a realização dos experimentos. Apenas a amostra caule/acetoneitrila foi escolhida dentre as outras de **B2** por ter apresentado os melhores resultados. A amostra de **B1**, que foi extraída via hexano e concentrada posteriormente, foi resuspendida com acetoneitrila por ser um dos compostos padrões a ser utilizados na HPLC, para o qual os equipamentos já haviam sido preparados. Isso vale para a sílica da região vermelha coletada de **B3**, também resuspendida com acetoneitrila. Todas as amostras foram resuspendidas e diluídas um pouco mais em acetoneitrila mantendo-se a mesma concentração para as três (proporção 1:6 – vegetal:eluyente), para facilitar sua “corrida” pelo equipamento de HPLC (Apêndice H – Imagem 26).

Primeiramente foi realizado o teste com o Espectrofotômetro (Mapada, Modelo: UV-6100PCS). Este equipamento produz luz em comprimentos de onda específicos, e detecta se há absorbância de luz numa determinada amostra (Apêndice H – Imagem 27). Uma das fontes de luz (uma lâmpada de Deutério ou Xenônio) emite radiação eletromagnética na região **UV** do espectro, e uma segunda fonte de luz (lâmpada de Tungstênio) emite luz com comprimentos dentro da região visível de um espectro. A absorbância de luz determina se algum outro composto – que não o “branco” (amostra padrão de absorbância zero: nesse caso será acetoneitrila) está presente na amostra (ONO, 2000).

Alguns mililitros da amostra de **B1** foram filtrados através de um filtro de seringa e despejados então dentro de uma cubeta de quartzo, devidamente limpa para que não haja influência na leitura. A cubeta foi introduzida dentro do equipamento para que a leitura do material fosse realizada pelos comprimentos de onda de 190λ até 600λ . O procedimento foi realizado igualmente para a amostra caule/acetoneitrila **B2** e região vermelha **B3**.

Depois do teste no Espectrofotômetro, as amostras foram coletadas separadamente com o auxílio de uma seringa de injeção no Cromatógrafo (YL, Modelo: Allcrom YL 9100), 50 µl cada, e uma por vez foi injetada (Apêndice H – Imagem 28) no HPLC devidamente padronizado para este tipo de experimento (padrões estes que podem ser visualizados no Apêndice L – Relatório de testes em HPLC). O cromatógrafo estava equipado com um detector PDA, o que tornou capaz a produção em gráficos 3D (Apêndices N e O – Relatório dos testes em HPLC). Cada amostra foi deixada para eluir pela coluna durante 20 min. Os gráficos e resultados foram salvos em PDF em um *pendrive*.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Antibiógramas

Os resultados do Primeiro Teste foram todos negativos para a presença de halo tanto para *E. coli* tanto para *S. aureus*, em todas as amostras (Apêndice A – Tabela 2). Apenas a gentamicina apresentou média de halos de 1,8 cm. Um resultado negativo era esperado para hexano indicando que ele não afetou o crescimento das bactérias, inibindo-as, sendo assim qualquer halo proveniente causado pelos discos será resultado do(s) componente(s) antibiótico(s).

O Segundo Teste demonstrou que a concentração do material vegetal foi um procedimento eficaz para potencializar a ação inibitória do composto bactericida presente na amostra vegetal. Um disco contendo o material **B1** concentrado apresentou um halo inibitório de 0,7 cm para *S. aureus* (Apêndice A – Tabela 3) enquanto os discos contendo material diluído resultaram em 0,0 cm de halo. A gentamicina seguiu apresentando um halo médio de 2,0 cm, tamanho dentro de padrões laboratoriais para *S. aureus* (LABORCLIN, 2011).

Os resultados positivos para a inibição obtida através do Terceiro Teste demonstram que os discos de papel estavam funcionando corretamente, eliminando esse fator que foi dado como possível devido a alguns resultados negativos obtidos nos dois testes anteriores (Apêndice A – Tabela 4).

No Quinto Teste podemos verificar uma forte resposta inibitória das amostras dos extratos vegetais (Apêndice B – Tabela 6). Todas as amostras concentradas apresentaram um valor significativo, com exceção da amostra folha/hexano que foi nula. Aqui vale ressaltar o

valor obtido para caule/acetoneitrila concentrado, chegando a se equiparar com o valor da gentamicina industrial, de onde pode-se sugerir um grande potencial bactericida por parte da planta, uma vez que as amostras são não purificadas e não concentradas na mesma qualidade em que se encontravam os discos de gentamicina.

Os valores obtidos no Sexto Teste ressaltam trabalhos anteriores que apontam o caule de *A. gigantea* como a estrutura da planta com maior eficiência antibiótica, onde se localiza a maior concentração deste composto. Apenas os discos contendo extratos dos caules em acetoneitrila e hexano apresentaram resultados inibitórios (Apêndice C – Tabela 8).

Todos esses testes e experimentações realizados durante os meses de trabalho serviram para a compilação de dados, a grande maioria referente aos halos de inibição produzidos pelas amostras extraídas do material vegetal de *A. gigantea*. Todos os dados estão presentes nos Apêndices deste trabalho, sendo que estes números foram reunidos em uma única tabela que melhor demonstra a comparação respostas das bactérias a diferente métodos e amostras de material. **Nota:** Bruto 2 correspondem as amostras obtidas da segunda extração realizada, correspondente ao material utilizado no Quarto, Quinto e Sexto Testes.

No Quinto Teste, devido à morte das bactérias ou algum possível erro de técnica, não houve crescimento de *E. coli* na placa de Petri, ante que nem mesmo o antibiótico gentamicina produziu halo e visivelmente a placa estava “limpa” (Apêndice F – Imagem 19).

Tabela 1 – Compilação de resultados relevantes dos testes realizados em antibiogramas contra *E. coli* e *S. aureus*

Halo (diâmetro em cm)	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	Quinto Teste	Sexto Teste	Quinto Teste	Sexto Teste
Bruto 1 caule/hexano	-	0,0	1,0	-
Bruto 2 caule/hexano	-	0,0	1,2	1,0
Bruto 2 caule/acetoneitrila	-	0,0	2,3	1,6
Bruto 2 folha/hexano	-	0,0	0	0
Bruto 2 folha/acetoneitrila	-	0,0	0,9	0
Gentamicina	-	2,0	2,0	2

Legenda: (-) simboliza ausência de dados

Verificam-se vários possíveis dados a serem debatidos, dentre eles a baixa eficiência do provável componente bactericida em *E. coli*, onde nenhum ou um valor não significativo de halo foi obtido nos testes a partir do material vegetal.

As amostras de folhas apresentaram nenhum ou baixo resultado quando comparados aos valores obtidos com os caules.

Comparada com o hexano, as amostras extraídas com acetonitrila apresentaram melhores resultados de halo. Uma vez que ela possui polaridade média pode ter extraído compostos que o hexano, mais apolar, não extraiu.

O princípio ativo presente no Bruto 2 de caule extraído com acetonitrila permitiu obter um valor de halo semelhante ao antibiótico gentamicina comercial purificado. Mostrando que há um potencial muito grande de pesquisa sobre este efeito bactericida de *A. gigantea* em bactérias Gram-Positivas como o *S. aureus*, um dos principais causadores de infecções na atualidade.

4.2 Coluna cromatográfica

O experimento da coluna cromatográfica teve de ser interrompido por conta de um pequeno problema, não possibilitando a coleta das frações separadas a amostra **B3** (Apêndice G – Imagem 24). Mas, seu material não foi desperdiçado e as diferentes camadas de cores, que correspondiam a diferentes compostos, foram armazenadas. Dentre elas a camada mais avermelhada onde provavelmente se encontra o composto antibactericida, possivelmente pertencente ao grupo dos taninos.

4.3 HPLC

Os gráficos obtidos pelo Espectrofotômetro (Apêndices I, J e K) não podem nos dizer muita coisa visto que a análise foi realizada com amostras vegetais brutas, não fracionadas ou purificadas, resultando num amontoado de substâncias que absorveram a luz do equipamento, o que pode ser visto na faixa de comprimento de onda de 200 a 300 nm.

Os resultados obtidos pelo método de HPLC exemplificam a diferença entre extrações com hexano e com acetonitrila. O Gráfico 1 (Apêndice L) foi resultado da análise da amostra

de caule extraída com acetonitrila (**B2**), o Gráfico 2 (Apêndice M) da amostra de caule extraída com hexano (**B1**) e o Gráfico 3 (Apêndice L) da região vermelha recolhida da coluna de sílica que fracionou a amostra de caule **B3**. Comparando-se os três podemos verificar que em todos foram detectadas praticamente os mesmos picos, ou seja, as mesmas substâncias porem em diferentes concentrações (altura x largura do pico). No gráfico de **B2** podemos ver que as substâncias mais leves, picos entre 2 e 3 min, foram mais significativas enquanto para **B1**, substâncias retidas por mais tempo na coluna, mais pesadas deram os maiores picos. A amostra de **B3** também apresenta maior relevância nos mesmos picos que **B1** justamente por ter sido extraída da mesma maneira: utilizando-se hexano como solvente.

De acordo com os resultados dos halos nos antibiogramas deste trabalho, pode-se inferir que a substância bactericida é representada por um dos três primeiros picos no gráfico 1 (acetonitrila) uma vez que eles simbolizam as substâncias que mais se caracterizam nessa amostra. Entretanto as amostras extraídas por hexano, que apresentaram resultados menores de halos, também apresentaram os mesmos picos no mesmo intervalo de tempo também em menor escala, assim como os halos, fortalecendo essa dedução. Entretanto os trabalhos anteriores a este apresentaram amostras extraídas por hexano com excelentes resultados de inibição; logo, os outros 2 picos significativos apresentado após os 4 min (gráficos 2 e 3) não podem ser descartados pois também podem caracterizar o componente bactericida da planta.

5.0 CONCLUSÕES

- Mais estudos devem ser dirigidos às propriedades bactericidas de *A. gigantea*, pois de acordo com os dados obtidos nesse trabalho esta planta possui um bom potencial inibidor do crescimento de bactérias Gram-Positivas, chegando a ser um dos resultados tão eficiente quanto o antibiótico padrão gentamicina.

- A acetonitrila mostrou-se mais eficiente na extração do(s) composto(s) desejado(s) quando comparado aos resultados obtidos através do hexano. Além disso, facilita as pesquisas em HPLC por ser um solvente padrão para os equipamentos, não havendo a necessidade de se tratar ou dissolver a amostra vegetal em outra substância.

- Corroboraram-se os resultados de trabalhos anteriores que apontaram o caule da planta como a estrutura vegetal que mais concentra o(s) composto(s) bactericida(s) quando comparado às folhas de *A. gigantea*.

- A HPLC foi eficiente para a determinação de certas propriedades das amostras e comparação entre os diferentes métodos de extração. Para estudos futuros sugere-se a utilização da técnica de espectrometria de massa acoplada a cromatografia para auxiliar na caracterização dos componentes bactericidas.

6.0 **REFERÊNCIAS**

BAUER, A. W.; KIRBY, M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American journal of Clinical Pathology**. **Seattle**, v. 45, n.4, 1966. p.493-496

CIOLA, R.; **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC**. 1ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA, 2003, 179 p.

COLLINS, G.L.B, BONATO, P.S.; **Introdução a métodos cromatográficos**. 7ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997, 279 p.

Di STASI, L. C. et al **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2ed. São Paulo: Editora UNESP, 2002, 204 p.

DI STASI, L. C. et al. **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência**. São Paulo: Editora UNESP, 1996. 230 p.

HOEHNE, F. C.; **Flora brasílica, fasc.6 (v.15, II) Aristolochiaceas**. São Paulo: Secretaria da Agricultura, 1940-1968.

LACAZ, C. S. **Antibióticos**, 3ed. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1975. 509p.

LABORCLIN LTDA. **Manual para antibiograma: difusão em Disco (Kirby & Bauer)**, 2011. Disponível em http://www.interlabdist.com.br/dados/noticias/pdf_190.pdf. Acessado em: 30/09/2012

MADIGAN, M. T. et al; **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MARTINS, A. C. (org); [prefácio de Marcos Sá Corrêa]. **Flora Brasileira: história, arte & ciência**. Rio de Janeiro: Casa da Palavra, 2009, 167 p.

MURRAY, P. R. et al. **Manual of clinical microbiology**. 6ed. Washington DC, EUA: ASM Press, 1995. 1482 p.

NERY, M.B.P. **Estudo da atividade biológica do extrato hidroalcoólico obtido da *Aristolochia gigantea***. Trabalho de Conclusão de Concurso Instituto de Biociências, UNESP, Campus Rio Claro, 2011. 42 p.

ONO, L.K. **Princípios e Utilizações do Espectrofotômetro e do Espectrofluorímetro**. USP – Instituto de Física – FAP 425 – Introdução à Espectroscopia, 2000.

PETRONE, R.R.C.S.B.; BIDOIA, E.D. **Atividade Antibacteriana dos Extratos do Caule e Folhas de *Aristolochia gigantea* Mart. e Zucc.** In: XV RAIB. Arquivos do Instituto Biológico, v.69, supl., 2002. p.1,

RANG, H. P. et al **Farmacologia**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 703p

REZENDE, H.A.; COCCO, M.I.M. **A utilização de fitoterapia no cotidiano de uma população rural**. Rev. Esc. Enferm. USP 2002. 36(3): 282-8. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/reeusp/v36n3/v36n3a10.pdf> Acessado em: 01/04/2012

SAVIOLLI, J. Y.; **Pesquisa e caracterização de *Escherichia coli* patogênica (*E. coli* produtora de toxina Shiga – STEC; *E. coli* aviária patogênica – APEC) de fragatas (*Fregata magnificens*) da Costa do Estado de São Paulo**, dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo; São Paulo, 2010. 83 p. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-10082010-143759/pt-br.php>
Acessado em: 01/04/2012

SCHULTES, R. E.; von REIS, S. **Ethnobotany: evolution of a discipline**. Portland, Or: Dioscorides Press, 1995 reimpresso em: 1997, 414 p.

VASCONCELOS, A. M.; **Isolamento do princípio ativo da *Aristolochia gigantea* na fração hexano com propriedades bactericidas através da cromatografia em coluna**. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2008. 39p.

VILLAS BOAS, I.M., **Uso dos extratos de folhas, caules e flores de *Aristolochia gigantea* Mart. e Zucc. para a inibição de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus***. Trabalho de Conclusão de Concurso Instituto de Biociências, UNESP, Campus Rio Claro, 2005. 28p.

APÊNDICE A – Tabelas de resultados

Tabela 2 – Resultado do Primeiro Teste, referente a atividade antimicrobiana dos diferentes extratos comparado com gentamicina sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Halo (diâmetro em cm)	<i>E. coli</i> 1	<i>E. coli</i> 2	<i>S. aureus</i> 1	<i>S. aureus</i> 2
Hexano (H)	0,0	0,0	0,0	0,0
Bruto 1 (B1b)	0,0	0,0	0,0	0,0
Bruto 1 (B1a)	0,0	0,0	0,0	0,0
Acetonitrila (A)	0,0	0,0	0,0	0,0
Gentamicina (G)	1,5	1,8	2,0	2,0

Tabela 3 - Resultado do Segundo Teste, referente a atividade antimicrobiana dos diferentes extratos comparado com gentamicina sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Halo (diâmetro em cm)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
B1 diluído (D)	0,0	0,0
B1 concentrado (C)	0,0	0,7
Acetonitrila (A)	0,0	0,0
Gentamicina (G)	2,0	2,0

Tabela 4 - Resultado do Terceiro Teste, referente a atividade antimicrobiana dos diferentes extratos comparado com gentamicina sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Halo (diâmetro em cm)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
H ₂ O	2,00	0,00
Álcool	1,00	1,00

Tabela 5 - Resultado do Quarto Teste, referente a atividade antimicrobiana dos diferentes extratos comparado com gentamicina sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Halo (diâmetro em cm)	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Caule/hexano (CH)	0,0	0,0
Caule/acetoneitrila (CA)	0,0	0,0
Folha/hexano (FH)	0,0	0,0
Folha/acetoneitrila (FA)	0,0	2,2
Gentamicina em água (GA)	1,50	0,00
Gentamicina em álcool (GAL)	1,00	1,00
B1 em hexano (BH)	0,00	0,00
Gentamicina (G)	1,50	0,7

APÊNDICE B – Tabelas de resultados

Tabela 6 - Resultado do Quinto Teste, referente a atividade antimicrobiana dos diferentes extratos comparado com gentamicina sobre *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

Halo (diâmetro em cm)	<i>E. coli</i>	<i>S. Aureus</i>
Gentamicina	0,00	2,00
Bruto 1 (B)	0,00	1,00
Caule/hexano concentrado (CH+)	0,00	1,20
Caule/acetonitrila concentrado (CA+)	0,00	2,30
Folha/hexano concentrado (FH+)	0,00	0,00
Folha/acetonitrila concentrado (FA+)	0,00	0,90
Bruto 1 mais concentrado (B+)	0,00	1,00
Folha/acetonitrila (FA)	0,00	0,00
Folha/hexano (FH)	0,00	0,00
Caule/acetonitrila (CA)	0,00	2,20
Caule/hexano (CH)	0,00	1,00

Tabela 7 - Valores da pesagem dos discos do Sexto Teste

Massa (g)		Antes	Depois
Caule/hexano	A	0,0149	0,0153
	B	0,0154	0,0161
Caule/acetonitrila	A	0,0143	0,0161
	B	0,0138	0,0162
Folha/hexano	A	0,0140	0,0159
	B	0,0153	0,0175
Folha/acetonitrila	A	0,0153	0,0177
	B	0,0160	0,0184
Acetonitrila	A	0,0147	0,0166
	B	0,0150	0,0192
Hexano	A	0,0160	0,0219
	B	0,0157	0,0162

APÊNDICE C – Tabelas de resultados

Tabela 8 - Resultado do Sexto Teste, referente a atividade antimicrobiana dos diferentes extratos comparado com gentamicina sobre <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>				
Halo (diâmetro em cm)	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
	H₂OD	BH	H₂OD	BH
Caule/hexano	0,00	0,00	0,00	0,00
Caule/acetoneitrila	0,00	0,00	1,50	0,00
Folha/hexano	0,00	0,00	0,00	0,00
Folha/acetoneitrila	0,00	0,00	0,00	0,00
Caule/hexano Concentrado	0,00	0,00	1,00	0,00
Caule/acetoneitrila Concentrado	0,00	0,00	1,60	0,00
Folha/hexano Concentrado	0,00	0,00	0,00	0,00
Folha/acetoneitrila Concentrado	0,00	0,00	0,00	0,00
Acetoneitrila	0,00	0,00	0,00	0,00
Hexano	0,00	0,00	0,00	0,00
Gentamicina	1,80	2,00	2,00	1,8

APÊNDICE D – Fotografias do trabalho



Imagem 2 – Pesagem do pó a ser colocado em frascos SCHOTT.



Imagem 5 – Sistema de Filtração: bomba a vácuo, kitasato, funil de Bücher, papel filtro e frascos de armazenamento.



Imagem 3 – Frascos SCHOTT de 500ml contendo o material vegetal juntamente com hexano como eluente.

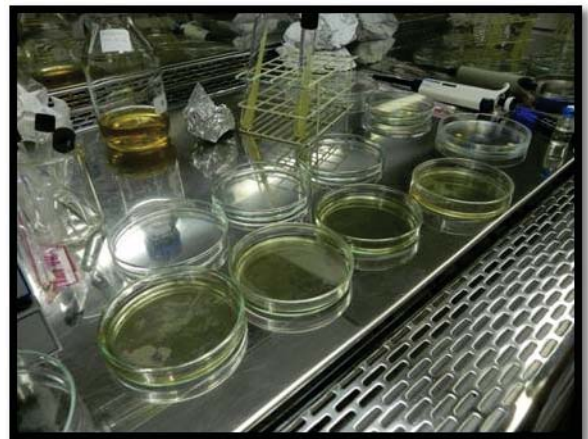


Imagem 6 – Inoculação das placas de Petri dentro de uma Cabine de Segurança Biológica.



Imagem 4 – Frascos SCHOTT submetidos a Mesa de Agitação.

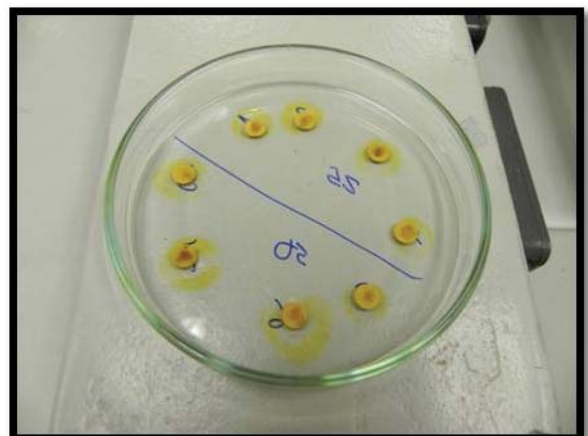


Imagem 7 – Discos do Primeiro Teste contendo amostra líquida de **B1**.

APÊNDICE E – Fotografias do trabalho



Imagem 8 – Resultado do Primeiro Teste para *S. aureus*.



Imagem 11 – B1 após ser concentrado.



Imagem 9 – Resultado do Primeiro Teste para *E. coli*.



Imagem 12 – Discos do Segundo Teste.

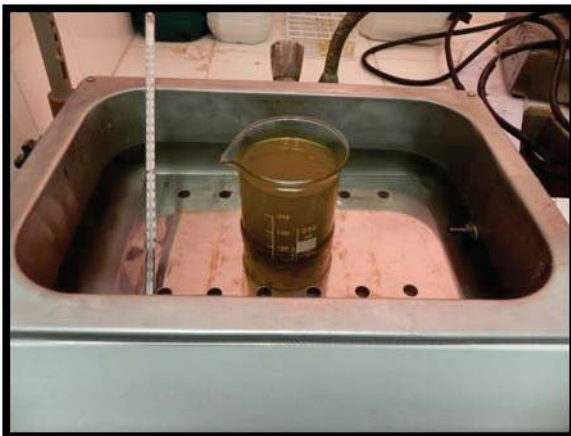


Imagem 10 – Concentração de B1 em banho-maria.

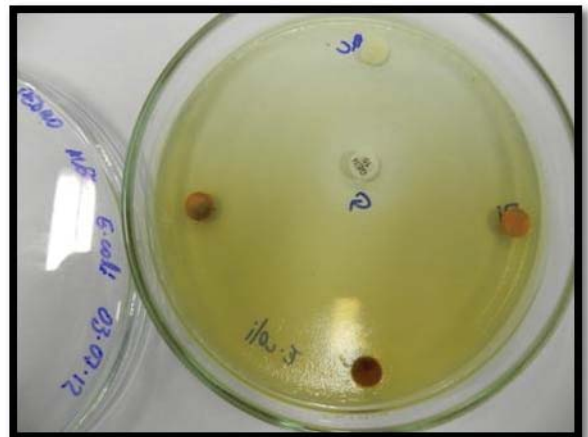


Imagem 13 – Resultado do Segundo Teste para *E. coli*.

APÊNDICE F – Fotografias do trabalho

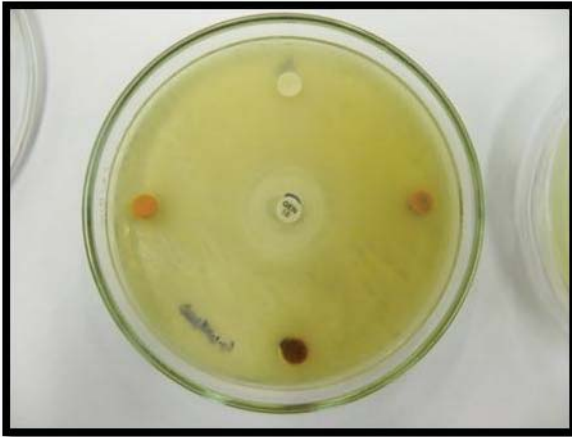


Imagem 14 – Resultado do Segundo Teste para *S. aureus*.



Imagem 17 – Frascos SCHOTT contendo as amostras de caule e folha em hexano e acetonitrila.

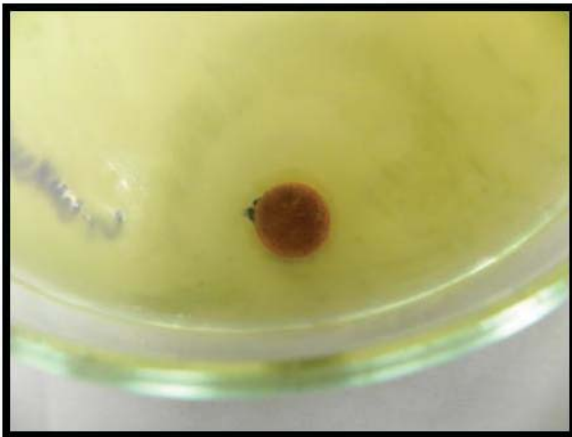


Imagem 15 – Aproximação no disco de B1 concentrado que apresentou um pequeno halo de inibição.

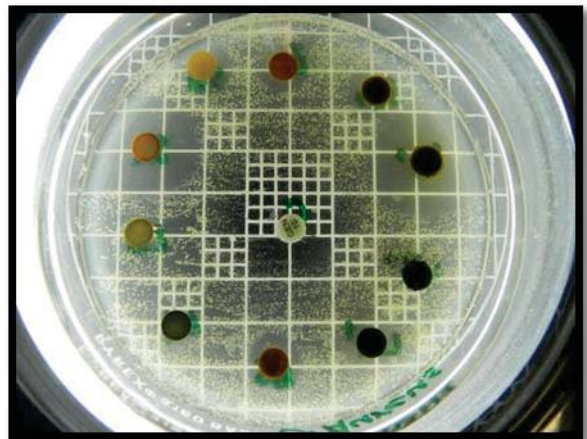


Imagem 18 – Resultado do Quinto Teste para *S. aureus*.

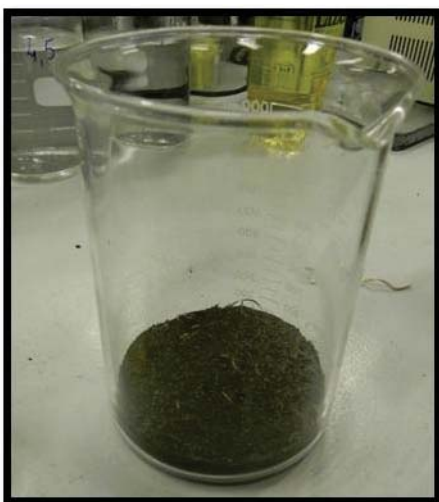


Imagem 16 – Pó proveniente da moagem das folhas de *A. gigantea*.

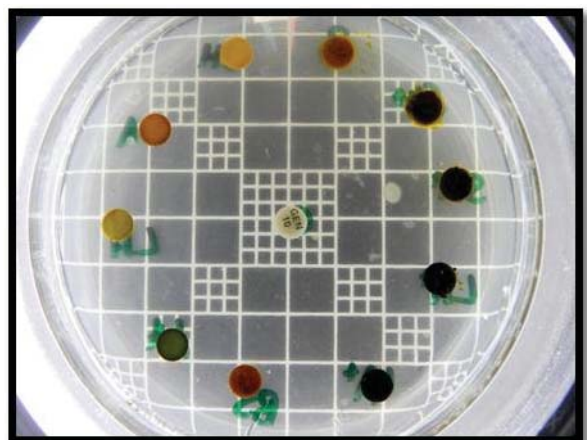


Imagem 19 – Resultado do Quinto Teste para *E. coli*.

APÊNDICE G – Fotografias do trabalho

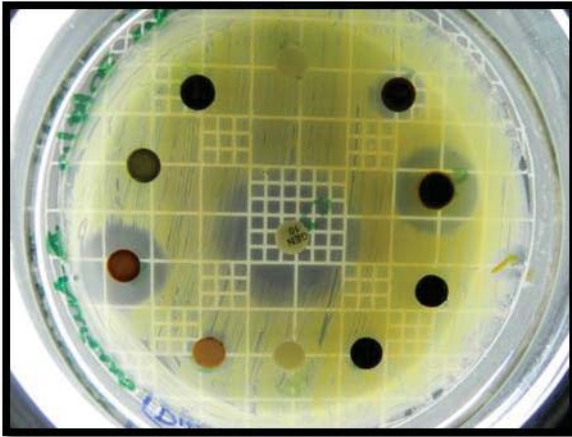


Imagem 20 – Resultado do Sexto Teste para *S. aureus* em água destilada.

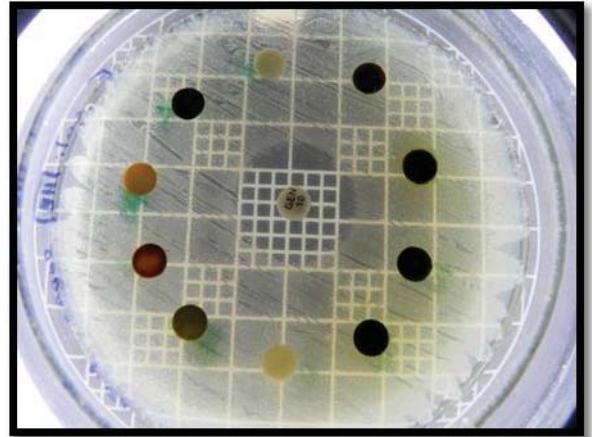


Imagem 23 – Resultado do Sexto Teste para *E. coli* em salina de **HB**.

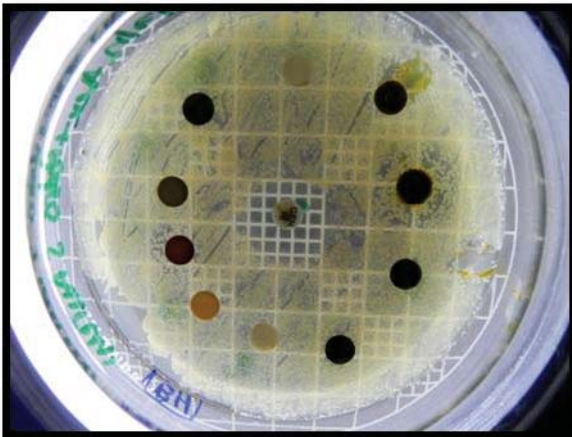


Imagem 21 – Resultado do Sexto Teste para *S. aureus* em salina de **HB**.



Imagem 24 – Coluna cromatográfica antes do experimento.

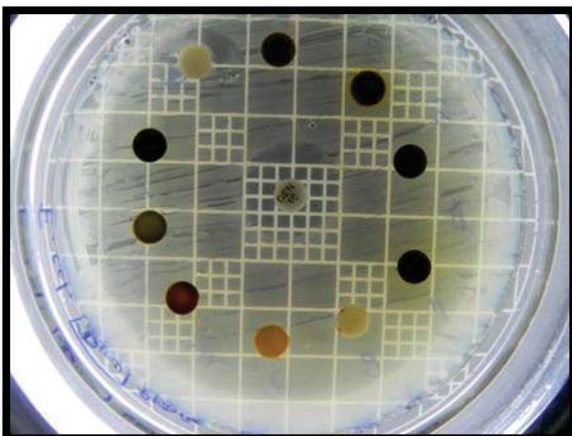


Imagem 22 – Resultado do Sexto Teste para *E. coli* em água destilada

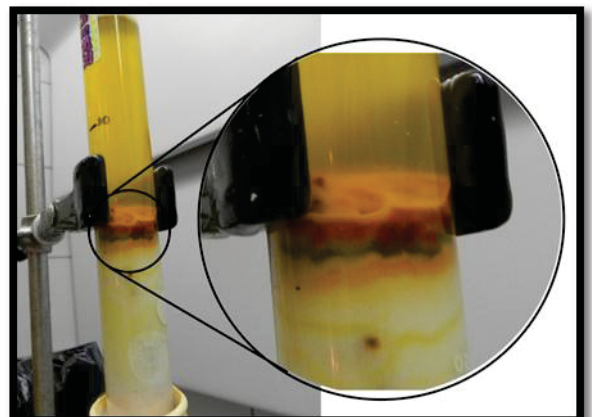


Imagem 25 – Camadas da amostra separadas pela sílica gel compactada.

APÊNDICE H – Fotografias fo trabalho



Imagem 26 – Equipamento de HPLC
(Cromatógrafo)



Imagem 27 – Equipamento de
Espectrofotometria



Imagem 28 – Amostra sendo injetada no
HPLC

Amostra Caule Aceto B2



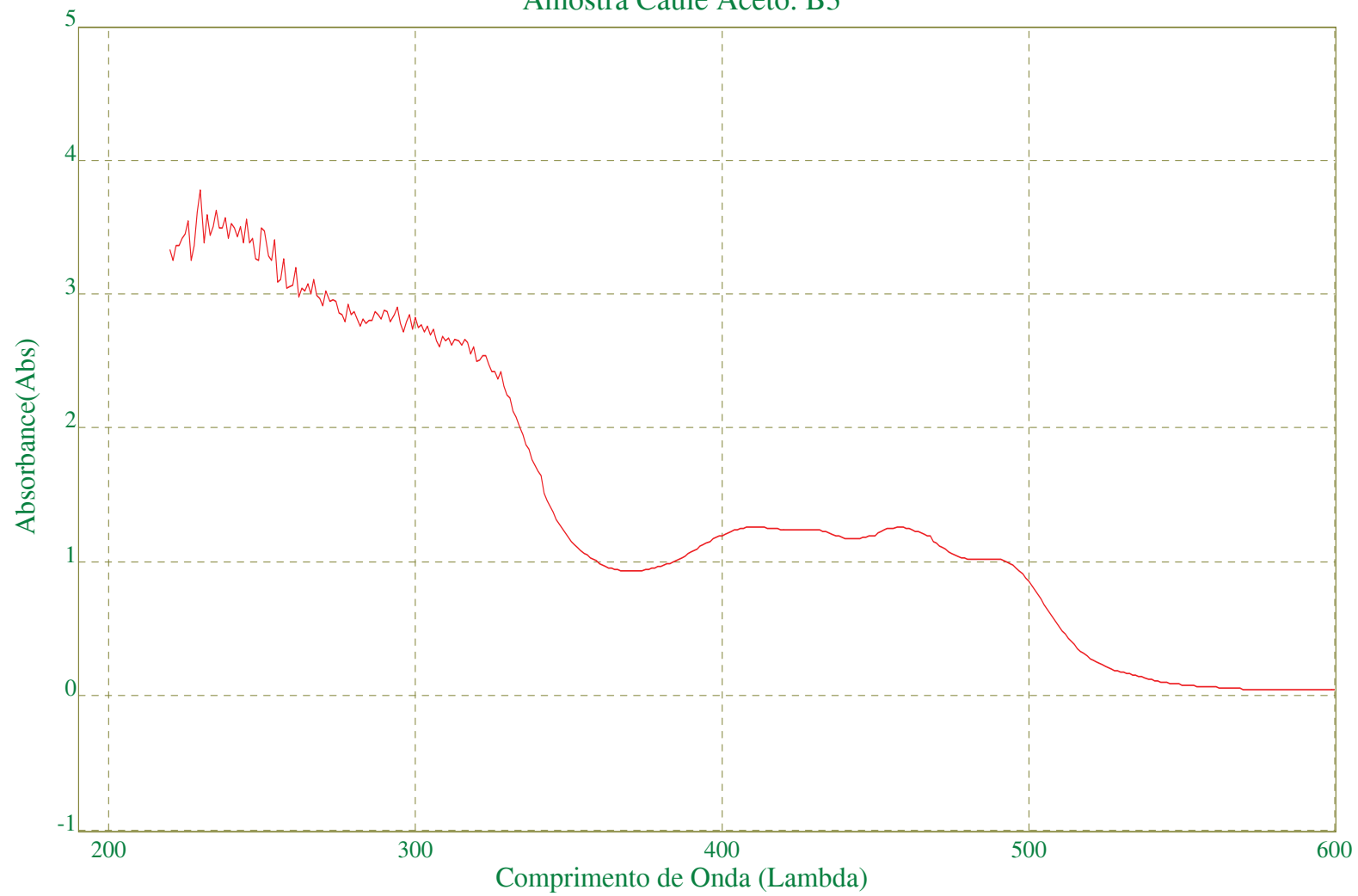
Scan Range:220.0-600.0nm

Scan Step: 1.0nm

Scan Filter: 10

Scan Time: October 01 14:27:29 2012

Amostra Caule Aceto. B3



Scan Range:220.0-600.0nm

Scan Step: 1.0nm

Scan Filter: 10

Scan Time: October 01 14:01:27 2012

Amostra Coluna Reg Vermelha



Scan Range:220.0-600.0nm

Scan Step: 1.0nm

Scan Filter: 10

Scan Time: October 01 15:09:09 2012

Utilização de HPLC para identificação do eluto antibacteriano extraído via hexano de *Aristolochia gigantea*

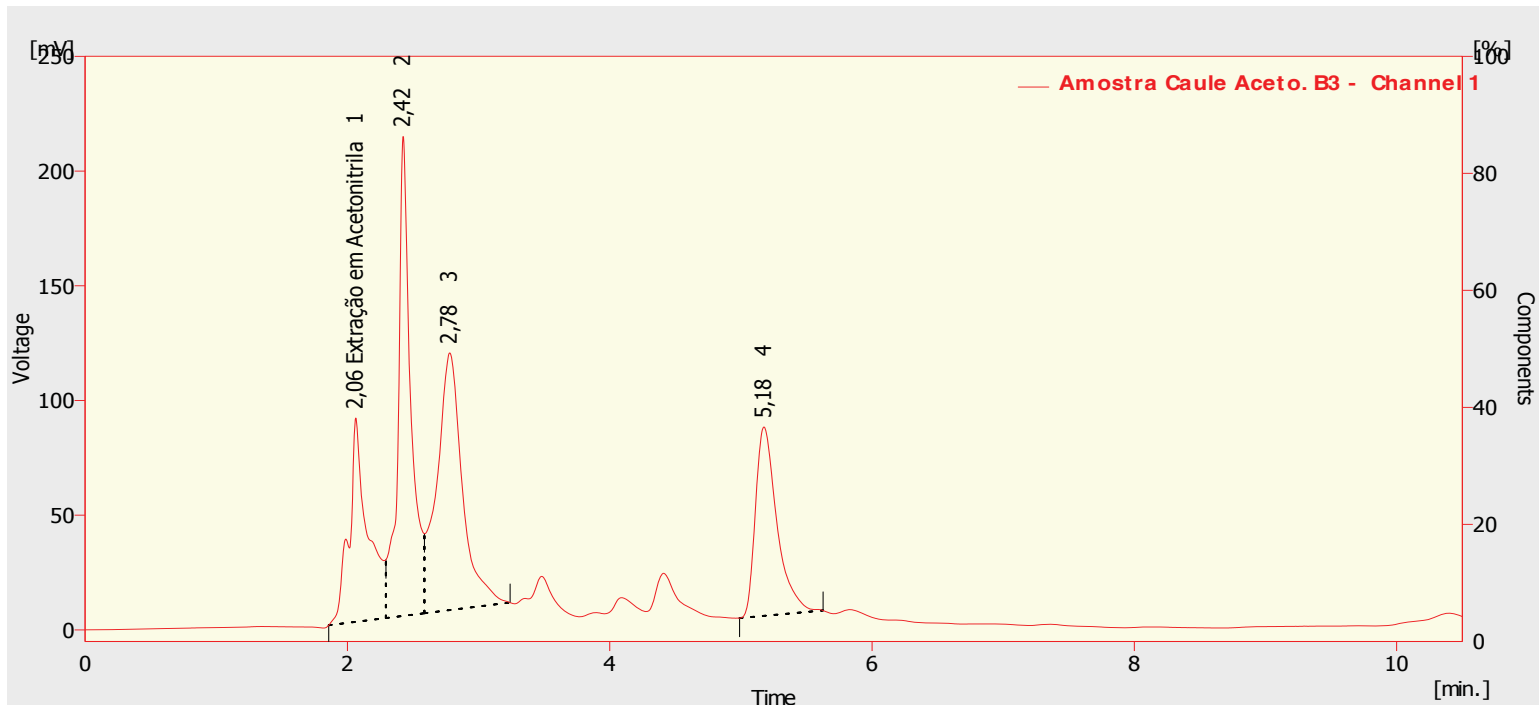
01/10/2012

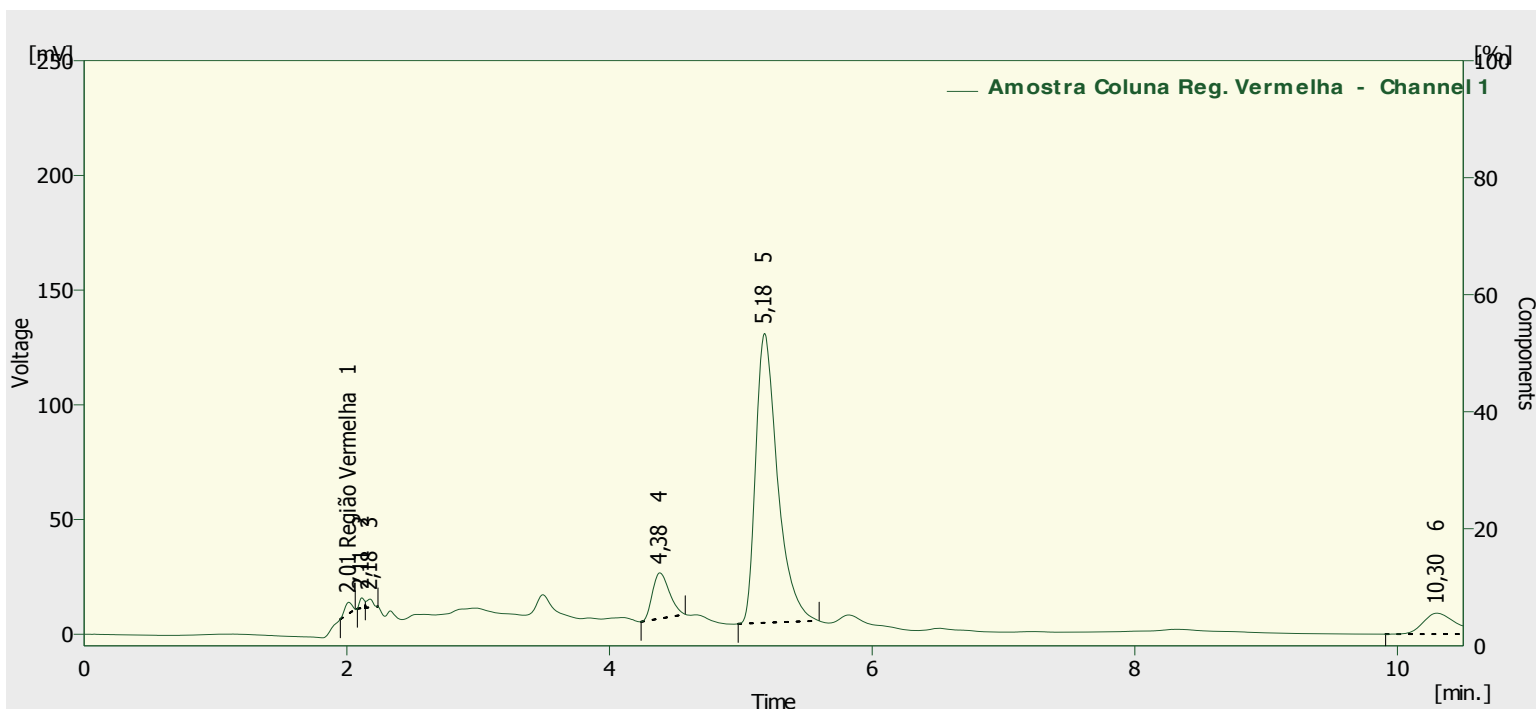
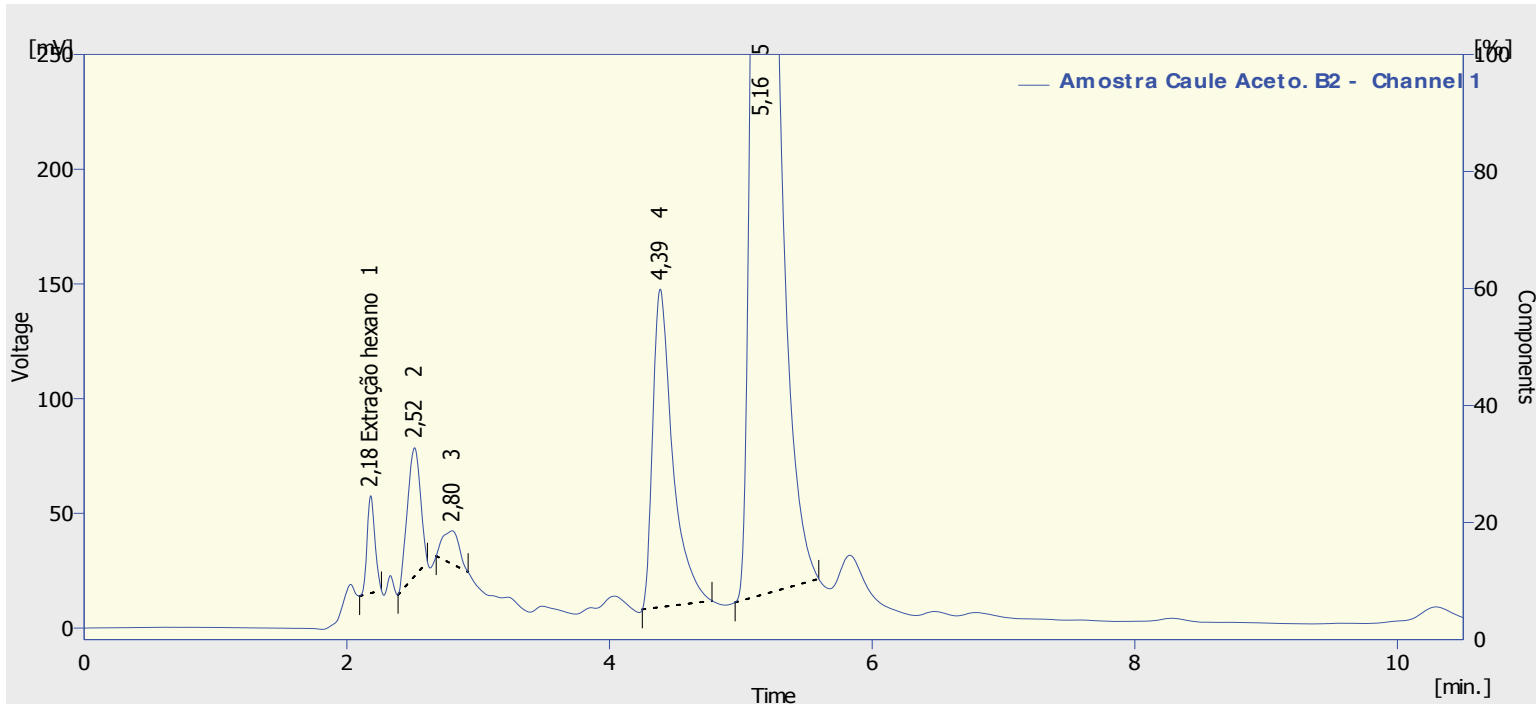
Pedro Felipe de Morais Paulo

Printed Version Info:

Printed Version : 01/10/2012 16:01:00 Printed Date : 01/10/2012 16:08:20
Report Style : C:\YLClarity\Common\Chromatogram.sty By : Pedro
Calibration File : None

Method : A Gigantea By : HEBRON
Description : Gigantea
Created : 31/08/2006 10:43 Modified : 01/10/2012 16:01
Column : Luna 5µ C18 250x4,6 mm Detection : 254 nm
Mobile Phase : 80% Acetonitrila 20% Agua Temperature : 35
Flow Rate : 1.000 ml/min Pressure : 1391 PSI
Note :





Result Table (ESTD - Amostra Caule Aceto. B3 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Peak Purity [-]	Compound Name
1	2,063	883,154	88,883	18,5	18,1	0,10	970	Extração em Acetonitrila
2	2,423	1414,792	208,936	29,7	42,4	0,09	973	
3	2,780	1532,816	112,126	32,1	22,8	0,19	991	
4	5,177	939,320	82,316	19,7	16,7	0,17	987	
	Total	4770,082	492,261	100,0	100,0			

Result Table (Uncal - Amostra Caule Aceto. B2 - Channel 1)

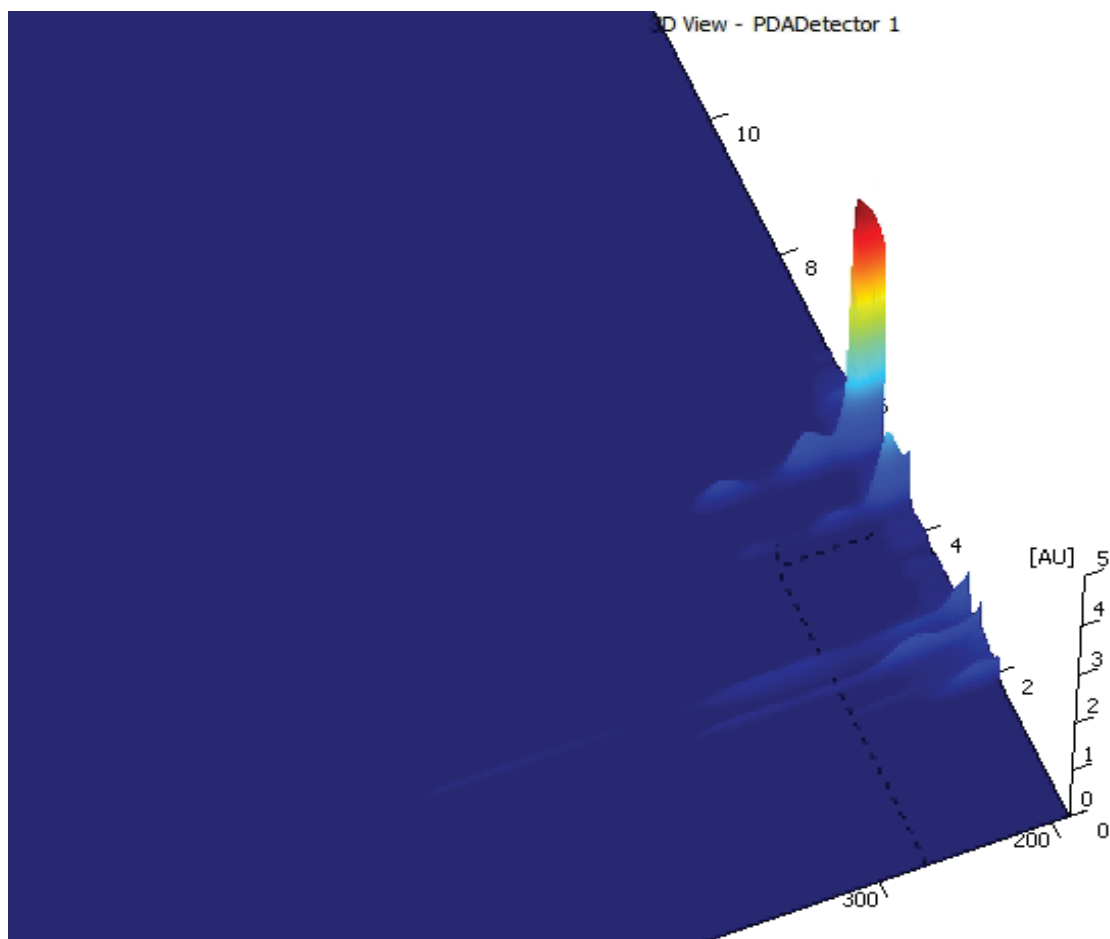
	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Peak Purity [-]	Compound Name
1	2,180	173,635	42,485	1,5	4,2	0,07	940	Extração hexano
2	2,517	385,672	55,900	3,4	5,5	0,12	992	
3	2,803	124,929	14,541	1,1	1,4	0,16	985	

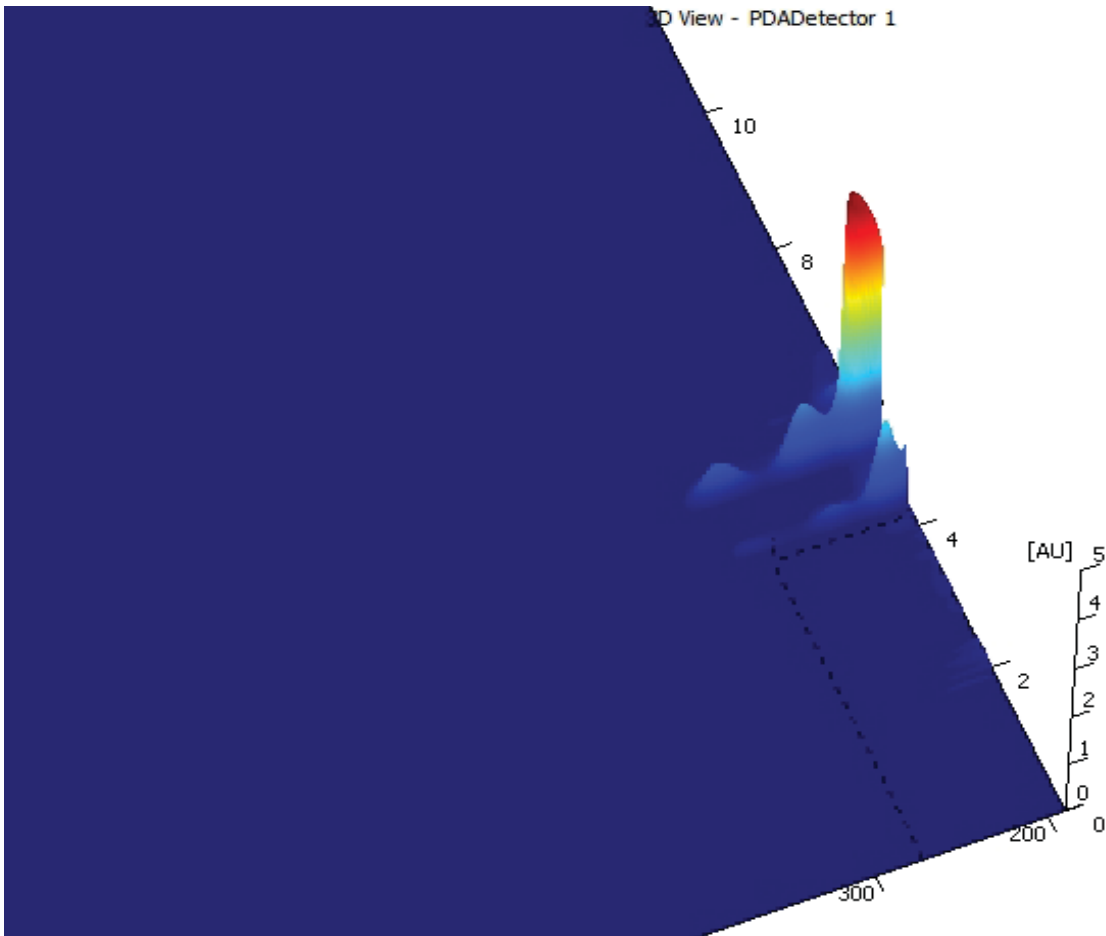
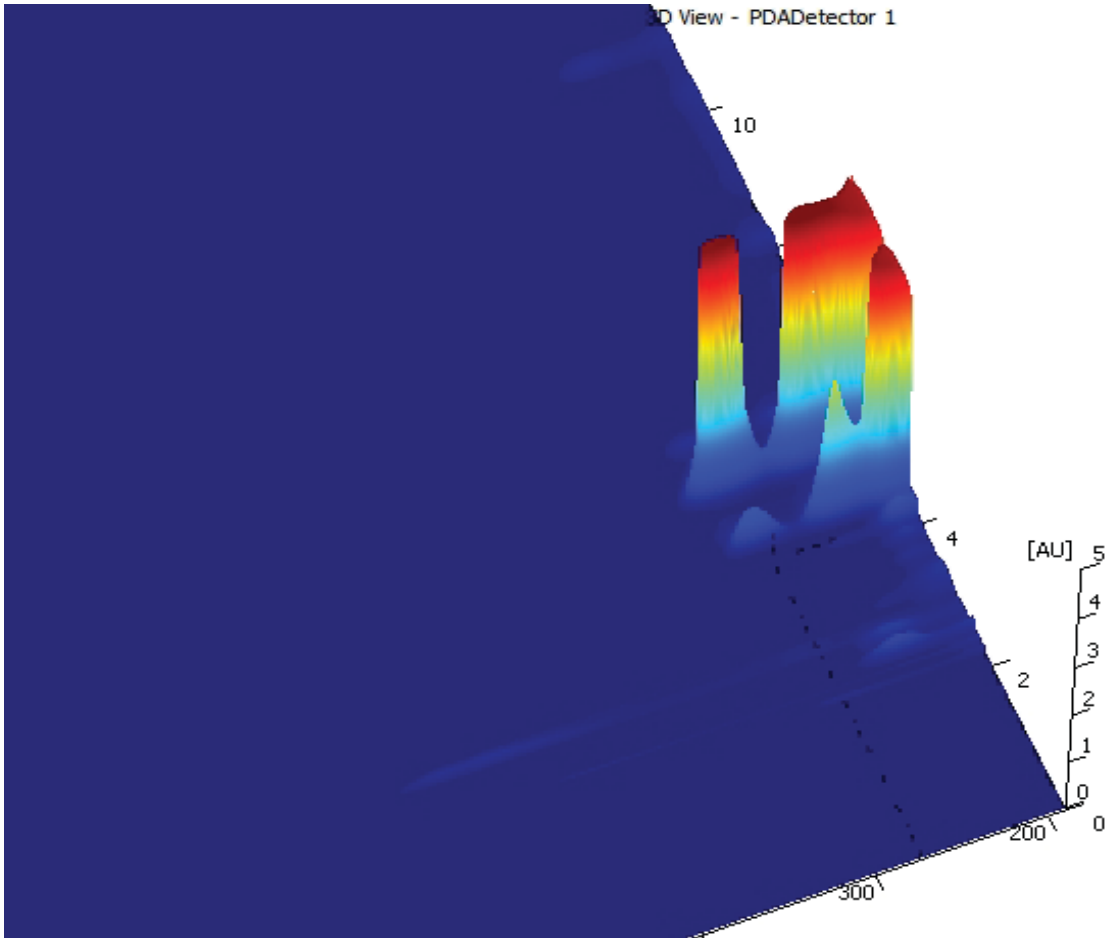
Result Table (Uncal - Amostra Caule Aceto. B2 - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Peak Purity [-]	Compound Name
4	4,387	1461,072	138,643	12,9	13,8	0,15	909	
5	5,157	8066,844	692,115	71,1	68,7	0,18	839	
6	10,983	1129,712	63,956	10,0	6,3	0,27	963	
	Total	11341,864	1007,640	100,0	100,0			

Result Table (Uncal - Amostra Coluna Reg. Vermelha - Channel 1)

	Reten. Time [min]	Area [mV.s]	Height [mV]	Area [%]	Height [%]	W05 [min]	Peak Purity [-]	Compound Name
1	2,013	18,373	4,962	0,5	2,1	0,07	994	Região Vermelha
2	2,113	10,956	4,548	0,3	1,9	0,05	999	
3	2,177	12,431	3,573	0,3	1,5	0,06	1000	
4	4,383	178,203	19,953	4,8	8,3	0,15	999	
5	5,180	1461,939	126,159	39,0	52,3	0,18	971	
6	10,300	182,681	9,173	4,9	3,8	0,28	944	
7	10,940	53,662	2,804	1,4	1,2	0,39	965	
8	11,373	102,473	3,786	2,7	1,6	0,43	992	
9	12,363	1694,109	64,571	45,2	26,8	0,38	999	
10	13,670	34,395	1,547	0,9	0,6	0,37	948	
	Total	3749,223	241,076	100,0	100,0			





APÊNDICE P – Tabela de materiais e equipamentos

Material	Marca	Modelo/Tipo
Acetonitrila 1	J.T. Baker	FW 41.05 9017.03
Agitador de tubos	PHOENIX	AP-56
Autoclave vertical	Phoenix	AV - 30
<i>Bacillus subtilis</i>	-	CCT2576
Balança de precisão	Shimadzu	BL-3200H
Banho Maria	Hemoquímica	HM1003
Bomba	QUIMIS	Q-355B2
Capela de fluxo laminar	Filterflux	SBIIA1-808/4
<i>Escherichia coli</i>	-	CCT1361
Incubadora B.O.D.	Biothec	BT-62
Gentamicina	DME	GEN 10
Heart Brain Infusion (HBI)	HIMEDIA	M210-500G
Hexano	Reagentes Analíticos IMPEX	Hexano PA / PM 86,16
Mesa de agitação	Catel	CFW08
Moedor	Manesco & Renieri	Willey 1980
Muller-Hinton (MH) 1	HIMEDIA	M173-500G
Muller-Hinton (MN) 2	HIMEDIA	M 391
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	ATCC 6583

**Utilização da HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) para
identificação do elemento antibacteriano extraído via
hexano de *Aristolochia gigantea***

Orientador: Prof. Dr. Edério D. Bidoia

Pedro Felipe de Morais Paulo

Rio Claro, ____ de Outubro de 2012

TERMO DE AUTORIZAÇÃO

Nome do autor: _____

CPF: _____ Telefone: [] _____

E-mail do autor: _____

Autoriza a divulgação deste endereço eletrônico na Biblioteca Digital C@pelo? [] Sim [] Não

Título: _____

Palavras-chave: _____

Unidade: _____

Campus: _____

Curso de Graduação: _____

Orientador: _____

Co-orientador: _____

Banca: _____

Data da defesa: ____/____/____

[] **AUTORIZO** a Universidade Estadual Paulista (UNESP), a publicar em ambiente digital institucional, sem ressarcimento dos direitos autorais, o texto integral da obra acima citada, em formato PDF, a título de divulgação da produção científica gerada pela Universidade.

Assinatura do(a) autor(a)

_____/_____/_____
Data

TRAMITAÇÃO NA UNESP

DE ACORDO COM A PORTARIA UNESP Nº 03/09, O CONSELHO DE CURSO É SOBERANO PARA DECIDIR OS CRITÉRIOS DE QUALIDADE PARA ENVIAR OU NÃO OS TCCs DEFENDIDOS NO CURSO, PARA DIVULGAÇÃO NA BIBLIOTECA DIGITAL C@PELO.

Conselho de Curso de Graduação

Nome do coordenador(a)

Assinatura

Recebido em: ____/____/____

Liberado em: ____/____/____

Biblioteca da Unidade

Recebido em: ____/____/____

Liberado em: ____/____/____

CGB - Biblioteca Digital C@pelo

Recebido em: ____/____/____

Obs: Preencher este Termo em uma via assinada e enviar à Biblioteca da Unidade, juntamente com o arquivo eletrônico em formato PDF.

O ARQUIVO PDF NÃO DEVE CONTER SENHA DE PROTEÇÃO