

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Avaliação do potencial antimicrobiano do licor pirolenhoso de *Dendrocalamus asper* (Schult & Schult) Backer

Luciana Jankowsky

Tese apresentada para obtenção do título de Doutora em Ciências, Programa: Recursos Florestais. Opção em: Tecnologia de Produtos Florestais

Piracicaba
2019

Luciana Jankowsky
Farmacêutica

Avaliação do potencial antimicrobiano do licor pirolenhoso de *Dendrocalamus asper* (Schult & Schult) Backer

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ OTÁVIO BRITO**

Tese apresentada para obtenção do título Doutora em Ciências, Programa: Recursos Florestais. Opção em: Tecnologia de Produtos Florestais

Piracicaba
2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Jankowsky, Luciana

Avaliação do potencial antimicrobiano do licor pirolenhoso de *Dendrocalamus asper* (Schult & Schult) Backer / Luciana Jankowsky. – versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. -- Piracicaba, 2019.

126 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Cromatografia gasosa 2. Microscopia eletrônica de varredura 3. *Escherichia coli* 4. *Staphylococcus aureus* I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família e meus amigos, pelo apoio emocional e incondicional.

Especialmente dedico ao meu pai, Ivaldo Pontes Jankowsky, pelo carinho, suporte, orientação, paciência e amor!

Sem o amor de vocês eu não teria conseguido concluir essa jornada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, aos Budas e todos os Seres de Luz, pelo amor e foco com que me conduziram neste caminho abençoado.

Ao Prof. Dr. José Otávio Brito, pela paciência, oportunidade de realização destes trabalhos e orientação.

Aos meus pais, pelo suporte emocional e amor incondicional.

A minha irmã, Mayra, pelo amor, amizade, paciência e compreensão.

A minha irmã Vitória e meu sobrinho Otto, por trazerem alegria e amor na minha vida.

Aos queridos amigos e amigas Ligia Cortellazzi, Letícia Cortellazzi, Laurisa Cortellazzi, Antonio Marcelo Campos, Ivan Chagas, Daniel Belluco, Mariana Belluco, Carolina Pompermayer, Daniel Grossi, Marina Lourenço, Saly Takeshita, Paula Surdi, Flávia Pacheco pelo apoio incondicional, nos melhores e piores momentos, pelas risadas compartilhadas, abraços divididos e conselhos amorosos.

As pessoas maravilhosas Daniela, Bruna, Flávio, Giovanni, Maria Penha, Stella, Maria Prado, Marta e Vera, que com paciência e carinho me incentivaram nessa etapa final deste trabalho.

Ao Udmilson, Maiara, Alex Canale pelo apoio, amizade e muita paciência durante a execução das práticas de trabalho.

A Profa. Dra. Simone Possedente de Lira, cuja orientação e suporte permitiu que esse trabalho fosse concluído.

Ao Prof. Dr. Francisco A. O. Tanaka, pela amizade, ensinamentos e apoio. Nossa amizade me permitiu um aprendizado além do acadêmico.

As amigas e amigos Flávia Sartori, Flávia Brito, Ananias, Camila Sarto, Maria Bermudez, Geisa e Giovana, do Departamento de Ciências Florestais, pela ajuda e companheirismo.

Ao amigo Ricardo Ferreira, que me abriu minhas perspectivas para novos caminhos, antes desconhecidos, na escrita.

Ao Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais (IPEF), pelo suporte ao desenvolvimento deste trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, processos 2016/14058-9 e 2014/15760-3.

A Claudilânia de Sousa Lima, funcionária do IPEF e amiga, que sempre esteve com um sorriso no rosto e um acolhimento nos momentos que precisei de ajuda.

A Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), pelo fornecimento do bambu e todo apoio para que este trabalho fosse realizado.

Aos funcionários do Laboratório de Química, Celulose e Energia e Laboratório de Química de Produtos Naturais, Esalq/USP, pela imprescindível ajuda.

Ao Prof. Dr. Luiz Humberto Gomes, Felipe Gabriel Andrino, Gislaine Reis e Diana Fortkamp pela amizade e imprescindível ajuda.

Ao Serviço de Pós-Graduação da ESALQ/USP, que sempre me auxiliou nas inúmeras dúvidas que tive ao longo da tese, com muita paciência e profissionalismo.

Ao Dr. Carlos Costa e ao Dr. Leandro Martins Lanzoni, do Laboratório de Ciência de Superfícies, Laboratório Nacional de Nanotecnologia, do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (LNNano/ CNPEM), pela inestimável ajuda e aprendizado neste trabalho.

A Dra. Ingrid Barcelos e ao Dr. Raul de Oliveira Freitas, do Laboratório Nacional de Luz Síncrona (LNLS), pela inestimável ajuda e aprendizado neste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Florestais, opção em Tecnologia de Produtos Florestais, pela oportunidade.

À todas as pessoas que ao longo destes anos, contribuíram, muitas vezes de forma anônima, para a concretização deste trabalho.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

EPÍGRAFE

*“Don’t only practice your art,
But force your way into its secrets,
For it and knowlegde
Can rise men in to the divine.”
Ludwing van Beehtoven*

“Eu acredito sinceramente que a única maneira que nós podemos criar paz mundial é através não só da educação das nossas mentes, mas também dos nossos corações e nossas almas”.
Malala Yousafzai

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1. PIRÓLISE E LICOR PIROLENHOSO.....	17
2.2. BAMBU <i>DENDROCALAMUS ASPER</i> (SCHULT & SCHULT) BACKER COMO FONTE DE BIOMASSA PARA PRODUÇÃO DE LICOR PIROLENHOSO.....	20
2.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SOBRE AS BACTÉRIAS <i>ESCHERICHIA COLI</i> E <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	23
2.4. SISTEMAS CONSERVANTES.....	27
3. OBJETIVOS	29
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1. OBTENÇÃO DO BAMBU.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE.....	33
4.3. OBTENÇÃO DOS LICORES PIROLENHOSOS INTEGRAIS ATRAVÉS DO PROCESSO DE PIRÓLISE.....	34
4.4. CÁLCULO DE RENDIMENTO DOS LICORES PIROLENHOSOS INTEGRAIS.....	36
4.5. FRACIONAMENTO POR PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	36
4.6. CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA.....	37
4.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	38
4.7.1. <i>Teste de Difusão de Disco</i>	38
4.7.1.1. Aplicação das Amostras de Licores Pirolenhosos Integrais.....	38
4.7.2. <i>Aplicação das Frações Metanólicas e Hexânicas obtidas dos Licores Pirolenhosos Integrais</i>	39
4.7.3. <i>Aplicação da Fração Metanólica do Licor Pirolenhoso obtido a 350°C</i>	Erro! Indicador não definido.
4.8. ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	40
4.9. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1. TEOR DE UMIDADE DAS PARTÍCULAS DE <i>DENDROCALAMUS ASPER</i> (SCHULT & SCHULT) BACKER.....	43
5.2. RENDIMENTO DAS PIRÓLISES E CARACTERÍSTICAS DOS LICORES PIROLENHOSOS INTEGRAIS.....	43
5.3. CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA E FRACIONAMENTO LÍQUIDO-LÍQUIDO DOS LICORES PIROLENHOSOS BRUTOS.....	47
5.4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS LICORES PIROLENHOSOS E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES METANÓLICAS E HEXÂNICAS.....	50
5.5. ANÁLISE DE CG/EM, MEV E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA FRAÇÃO METANÓLICA DO LICOR PIROLENHOSO OBTIDO A 350°C.....	53
5.5.1. <i>Análise por CG/EM</i>	53
5.5.2. <i>Atividade Antimicrobiana por Teste de Difusão de Disco</i>	56
5.5.3. <i>Análise por MEV</i>	58
5.5.4. <i>Análise do Perfil de Atividade Antimicrobiana com Foco em Sistemas Conservantes</i>	60
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	63

6.1. PROSPECTIVAS TECNOLÓGICAS PARA O EMPREGO DA FRAÇÃO METANÓLICA DO LICOR PIROLENHOSO OBTIDO A 350°C	63
7. CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	69
APÊNDICES.....	77

RESUMO

**Avaliação do potencial antimicrobiano do licor pirolenhoso de *Dendrocalamus asper*
(Schult & Schult) Backer**

Considerando que o licor pirolenhoso obtido de diferentes tipos de biomassa possui atividades antivirais, o principal objetivo da presente pesquisa foi avaliar a ação antimicrobiana do licor pirolenhoso obtido na pirólise do bambu (*Dendrocalamus asper*), e de suas frações metanólica e hexânica, em relação às bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. O licor pirolenhoso foi recuperado da pirólise em mufla laboratorial, nas temperaturas de 250°C, 350°C e 550°C, os quais foram submetidos a separação líquido-líquido com metanol e hexano gerando as frações metanólica e hexânica. Os licores pirolenhos integrais (na dose de 5,0 mg por disco) e suas respectivas frações metanólica e hexânica (na dose de 0,125mg por disco), foram aplicadas no ensaio de difusão em disco com as bactérias *E. coli* e *S. aureus*; sendo que nesse ensaio a fração metanólica do licor obtido a 350°C (FMeOH350) apresentou melhor eficiência e consistência nos resultados e foi selecionada para continuidade da pesquisa. Através da análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa foi possível identificar qualitativamente 92 compostos químicos na fração FMeOH350. Essa fração foi aplicada no ensaio de difusão com as bactérias *E. coli* e *S. aureus* nas doses de 0,125 mg, 0,500 mg, 0,750 mg e 1,000 mg. O tratamento com a fração metanólica obtida a 350°C inibiu o crescimento celular das bactérias, na região ao redor da aplicação das amostras (halo de inibição), e causou uma variedade de deformações morfológicas em tamanho e deformidades nas paredes celulares das bactérias, comprovadas por aplicação da microscopia eletrônica de varredura, estabelecendo um perfil de atividade antimicrobiana. Esses resultados estão em acordo com a Política Nacional de Incentivos ao Cultivo e Manejo Sustentável do Bambu, bem como traz benefícios para a sociedade e o ambiente como um todo, demonstrando a possibilidade de agregar valor a um subproduto da pirólise.

Palavras-chave: Cromatofia gasosa; Microscopia eletrônica de varredura; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Antimicrobial activity evaluation of *Dendrocalamus asper* (Schult & Schult) Backer pyroligneous liquor

Considering that the pyroligneous liquor obtained from various types of biomass has antiviral activity, the main objective of the present study was to evaluate the antimicrobial action of the pyroligneous liquor obtained in the pyrolysis of bamboo (*Dendrocalamus asper*) and its methanolic and hexanic fractions, in relation to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria. The pyroligneous liquor was recovered by laboratorial bamboo pyrolysis at temperatures of 250°C, 350°C and 550°C, which were then fractioned by liquid-liquid separation with methanol and hexane. The three integral pyroligneous liquor (dosage of 5,0 mg per disc) and its respective methanolic and hexanic fractions (dosage of 0,125 mg per disc) were used in the diffusion disc assay of *E. coli* and *S. aureus*; and the result was the methanolic fraction obtained at 350°C (MeOHF350) showing the better efficiency and results consistence, being selected for the research continuity. Through gas chromatography coupled to mass spectrometry it was possible to qualitatively identify 92 chemical compounds in this methanolic fraction. The MeOHF350 fraction was used in the diffusion disc assay of *E. coli* and *S. aureus* at dosages of 0.125, 0.500, 0.750 and 1.000 mg. Treatment with the methanolic fraction obtained at 350°C inhibited cellular growth, in the region around of samples application (inhibition halo), caused a variety of morphological variations in size as well as deformities in the bacterial cell walls, proved through scanning electron microscopy, establishing an antimicrobial activity profile. This finding supports the National Policy for Incentives for Sustainable Management and Cultivation of Bamboo (PNMCB) and has benefits to the society and environment as a whole, demonstrating the possibility of adding value to a byproduct of pyrolysis.

Keywords: Gas chromatography; Scanning electron microscopy; *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ÁREAS DE BIOMAS DO BRASIL, SEGUNDO O IBGE EM 2009 (SNIF, 2016).....	15
FIGURA 2. MAPA DOS BIOMAS DO BRASIL, DE ACORDO COM O IBGE (SNIF, 2016).....	15
FIGURA 3. ESTRUTURA MORFOLÓGICA GERAL DE BACTÉRIAS (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).....	23
FIGURA 4. PAREDES CELULARES DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVA E GRAM-NEGATIVA (EPAND ET AL., 2016).....	24
FIGURA 5. FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES REALIZADAS PARA ANÁLISE DOS LICORES PIROLENHOSOS DE <i>D. ASPER</i> NAS TEMPERATURAS DE 250°C, 350°C E 550°C.....	31
FIGURA 6. <i>D. ASPER</i> COLETADO NA UNIDADE DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO (UPD) DA AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS (APTA), NO MUNICÍPIO DE TATUÍ – SÃO PAULO. A: TOUCHEIRA COM A NOME CIENTÍFICO DA ESPÉCIE DE BAMBU, CERTIFICANDO A IDENTIFICAÇÃO CORRETA DESTA. B: TOUCHEIRA DE BAMBU UTILIZADA PARA O ESTUDO.	32
FIGURA 7. PROCESSAMENTO MECÂNICO DO BAMBU: (A) COLMOS SECCIONADOS EM CAMPO; (B) TALISCAS PROCESSADAS COM CASCA; (C) DESENGROSSO DAS TALISCAS; (D) TALISCAS; (E) CAVACOS. FONTE: BRITO, 2018.....	33
FIGURA 8. BALANÇA ID200 ESPECÍFICA PARA DETERMINAR O TEOR DE UMIDADE EM MATERIAL PARTICULADO. A. BALANÇA ID200. B. MESMO APARELHO, ONDE A SETA PRETA INDICA O LOCAL ONDE O MATERIAL PARTICULADO É INTRODUIDO E, A SETA BRANCA, O SISTEMA DE AQUECIMENTO DA BALANÇA.....	34
FIGURA 9. MUFLA LABORATORIA ACOPLADA AO SISTEMA DE CONDENSADORES DE VIDRO E BALÃO VOLUMÉTRICO, UTILIZADOS DURANTE A PIRÓLISE E OBTENÇÃO DOS LICORES PIROLENHOSOS. A: SETA DESTACANDO A MUFLA LABORATORIAL ONDE O CILINDRO CONTENDO BAMBU É SUBMETIDO A AQUECIMENTO; SETA FURTIVA DESTACANDO O SISTEMA ELETRÔNICO DE CONTROLE DE RAMPA DE AQUECIMENTO DA MUFLA. B: SETA FURTIVA EVIDENCIANDO O SISTEMA DE CONDENSADORES PARA OS GASES VOLÁTEIS; SETA EM LOZANGO DEMONSTRANDO O BALÃO VOLUMÉTRICO ONDE O LICOR PIROLENHOSO FOI COLETADO.	35
FIGURA 10. FLUXOGRAMA DO FRACIONAMENTO DOS LPI1, LPI2 E LP3 POR PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO. A: FRAÇÃO METANÓLICA (LMEOH250) E HEXÂNICA (FHEX250). B: FRAÇÃO METANÓLICA (LMEOH350) E HEXÂNICA (FHEX350). C: FRAÇÃO METANÓLICA (LMEOH550) E HEXÂNICA (FHEX550).	37
FIGURA 11. FLUXOGRAMA DO TESTE DE DIFUSÃO DE DISCO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS AMOSTRAS.....	39
FIGURA 12. FLUXOGRAMA DO PREPARO DAS AMOSTRAS DE LICOR PIROLENHOSO DE <i>D. ASPER</i> PARA LEITURA EM MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA.....	41
FIGURA 13. RELAÇÃO ENTRE A CONVERSÃO (%) COM AS DIFERENTES TEMPERATURAS (°C) DE PIRÓLISE LENTA DA BIOMASSA DE BAMBU <i>D. ASPER</i>	45
FIGURA 14. SEPARAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO REALIZADA PARA CADA LPI. A: FUNIL DE SEPARAÇÃO CONTENDO METANOL E HEXANO. B: FRAÇÕES FMEOH1 E FHEX1. C: FMEOH2 E FHEX2. D: FMEOH3 E FHEX3.	48
FIGURA 15. CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA, ELUÍDA EM METANOL/DICLOROMETANO/HEXAO (1/2:8:1/2). SETA AZUL ESCURA: COMPOSTOS QUÍMICOS VISÍVEIS A 254 NM. SETA ABERTA ROXA: COMPOSTOS QUÍMICOS VISÍVEIS A 365 NM. A: APLICAÇÃO DE (1) LPI250, (2) FMEOH250 E (3) FHEX250. B: APLICAÇÃO DE (1) LPI350, (2) FMEOH350 E (3) FHEX350. C: APLICAÇÃO DE (1) LPI550, (2) FMEOH550 E (3) FHEX550. AS LEGENDAS AA, BA E CA REPRESENTAM REGIÃO DA APLICAÇÃO DA AMOSTRA, MUITO POLAR. AS LEGENDAS AB, BB E CB REPRESENTAM REGIÃO DE POLARIDADE INTERMEDIÁRIA. AS LEGENDAS AC, BC E CC REPRESENTAM REGIÃO DE APOLAR.....	49

FIGURA 16. RELAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (HALO DE INIBIÇÃO) DOS LICORES PIROLENHOSOS INTEGRAIS (LPI) EM RELAÇÃO AS BACTÉRIAS <i>E. COLI</i> E <i>S. AUREUS</i> E EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DA PIRÓLISE.	51
FIGURA 17. RELAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (HALO DE INIBIÇÃO) DA FRAÇÃO METANÓLICA DOS LICORES PIROLENHOSOS (FMEOH) EM RELAÇÃO ÀS BACTÉRIAS <i>E. COLI</i> E <i>S. AUREUS</i> E EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DA PIRÓLISE.	52
FIGURA 18. RELAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (HALO DE INIBIÇÃO) DA FRAÇÃO HEXÂNICA DOS LICORES PIROLENHOSOS (FHEX) EM RELAÇÃO ÀS BACTÉRIAS <i>E. COLI</i> E <i>S. AUREUS</i> E EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DA PIRÓLISE.	52
FIGURA 19. CROMATOGRAMA DOS COMPOSTOS QUÍMICOS IDENTIFICADOS ATRAVÉS DA ANÁLISE POR CG/EM DA FMEOH₂ DO BAMBU <i>D. ASPER</i>.	54
FIGURA 20. ANÁLISE DA REGRESSÃO LINEAR RELACIONANDO AS CONCENTRAÇÕES DA FRAÇÃO METANÓLICA (MG/μL) COM AS MÉDIAS DE INIBIÇÃO DE HALO (MM).	57
FIGURA 21. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA: <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>. 3A: BACTÉRIAS SEM TRATAMENTO; COCOS MOSTRAM FORMA ESFÉRICA E TAMANHOS NORMAIS (SETAS). 3B: BACTÉRIAS SUBMETIDAS A TRATAMENTO COM A FRAÇÃO METANÓLICA, COM MORFOLOGIA OVAL DE COCCUS (SETA EM ELIPSE); UMA LINHA SECCIONAL EM UMA CÉLULA DE TAMANHO E FORMA ANORMAIS (SETA); RUGOSIDADE NA PAREDE CELULAR DO COCCUS (SETA ABERTA); E UMA SUBSTÂNCIA EXTRACELULAR (SETA FURTIVA). (BARRAS = 0,5 μ)	59
FIGURA 22. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA: <i>ESCHERICHIA COLI</i>. 4A: BACTÉRIAS SEM TRATAMENTO MOSTRANDO FORMA DE BASTONETE E TAMANHO NORMAL (SETA). 4B, 4C E 4D: BACTÉRIAS SUBMETIDAS A TRATAMENTO COM A FRAÇÃO METANÓLICA. 4B: DEFORMAÇÕES NA BACTÉRIA, CUJA MORFOLOGIA NORMAL DA HASTE É MODIFICADA, MOSTRANDO CURVAS (SETA). 4C: PRESENÇA DE SEÇÕES LONGITUDINAIS NA BACTÉRIA BEM COMO RUGOSIDADE NA EXTENSÃO TOTAL DA PAREDE CELULAR (SETA ABERTA). 4D: FLEXÃO NO PROLONGAMENTO FINAL DA BACTÉRIA (SETA EM ELIPSE). (BARRAS = 1,0 μ).	59
FIGURA 23. DADOS DE PATENTES, COMPOSIÇÕES ANTIBACTERIANAS E ALEGAÇÕES RELACIONADAS À ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS PIROLENHOSOS (SOUZA ET AL., 2018).	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. FENÔMENOS E PRODUTOS DA CONVERSÃO DA MADEIRA PARA CARVÃO VEGETAL (BRITO, 1990).....	18
TABELA 2. DADOS COMPARATIVOS DO TEOR DE UMIDADE (%), MEDIDO PELOS MÉTODOS GRAVIMÉTRICO (SECAGEM A 103°C) E SECAGEM EM BALANÇA.....	43
TABELA 3. CARACTERÍSTICA ORGANOLÉPTICAS DOS LICORES PIROLENHOSOS OBTIDOS NAS TEMPERATURAS DE 250°C, 350°C E 550°C.....	44
TABELA 4. TABELA DE RENDIMENTOS DAS PIRÓLISES DO BAMBU <i>D. ASPER</i>.	44
TABELA 5. PODER CALORÍFICO E TEOR DE CINZAS DO BAMBU <i>D. ASPER</i> PIROLISADO A TEMPERATURAS DE 250°C, 350°C E 550°C.	46
TABELA 6. MÉDIAS DOS DIÂMETROS DO HALO DE INIBIÇÃO, EM MM, OBTIDOS NO ENSAIO DE DIFUSÃO EM DISCO COM <i>E. COLI</i>, PARA OS LICORES PIROLENHOSOS INTEGRAIS (LPIS) E SUAS RESPECTIVAS FRAÇÕES METANÓLICA (FMEOH) E HEXÂNICA (FHEX).....	50
TABELA 7. MÉDIAS DOS DIÂMETROS DO HALO DE INIBIÇÃO, EM MM, OBTIDOS NO ENSAIO DE DIFUSÃO EM DISCO COM <i>S. AUREUS</i>, PARA OS LICORES PIROLENHOSOS INTEGRAIS (LPIS) E SUAS RESPECTIVAS FRAÇÕES METANÓLICA (FMEOH) E HEXÂNICA (FHEX).....	51
TABELA 8. COMPOSTOS QUÍMICOS PRESENTES EM DIFERENTES ESPÉCIES DE BAMBU, INCLUINDO O <i>D. ASPER</i>, E OS COMPOSTOS CUJA ANÁLISE QUALITATIVA INDICAM POSSÍVEL PRESENÇA NA FRAÇÃO FMEOH350.....	55
TABELA 9. MÉDIA DOS DIÂMETROS DE HALO DE INIBIÇÃO, ONDE HÁ AUSÊNCIA DE CRESCIMENTO BACTERIANO, EM MILÍMETROS (MM), APÓS TRATAMENTO COM A FRAÇÃO METANÓLICA E AMPICILINA.	56
TABELA 10. DEFINIÇÕES DE CATEGORIAS PARA INTERPRETAR O PONTO DE BREAKPOINT DO DIÂMETRO HALO DE INIBIÇÃO (MM) DA FMEOH2 E DA AMPICILINA NAS BACTÉRIAS <i>ESCHERICHIA COLI</i> E <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>.	61

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui, em seu território, um bioma constituído por tipos de vegetação contínuas e identificáveis a nível regional, relacionados de acordo as características geoclimáticas e agrupamentos de vida vegetal e animal em ambientes similares, favorecendo uma biodiversidade complexa (SNIF, 2016). As figuras 1 e 2 ilustram este panorama.

Área dos biomas do Brasil		
Bioma	Área aproximada (em km ²)	% Brasil
Amazônia	4.196.943	49,29
Cerrado	2.036.448	23,92
Mata Atlântica	1.110.182	13,04
Caatinga	844.453	9,92
Pampa	176.496	2,07
Pantanal	150.355	1,76
Total	8.514.877	100

Figura 1. Áreas de biomas do Brasil, segundo o IBGE em 2009 (SNIF, 2016).

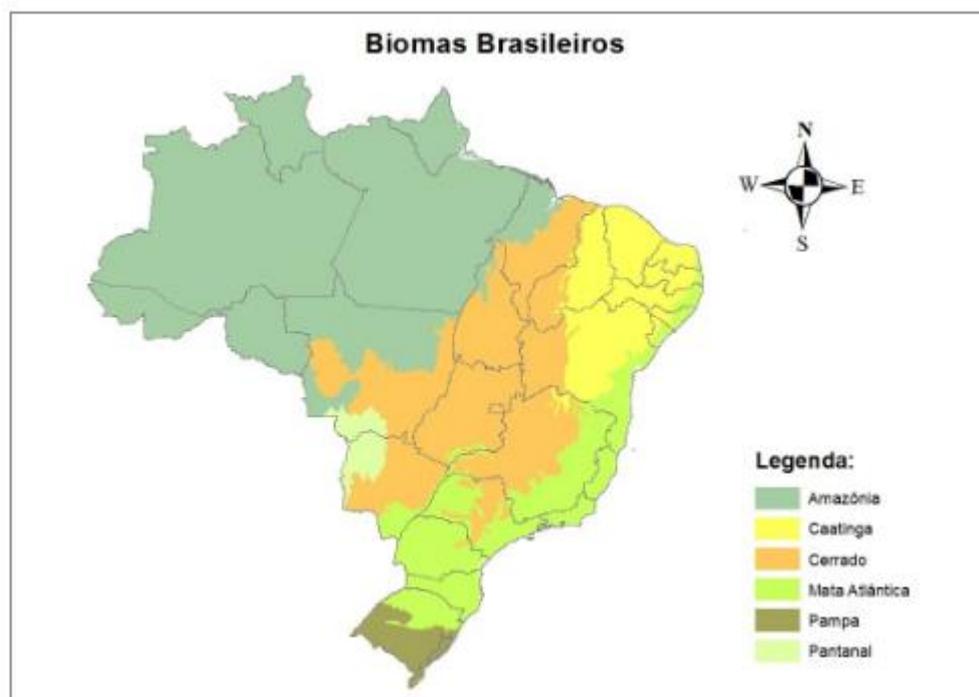


Figura 2. Mapa dos biomas do Brasil, de acordo com o IBGE (SNIF, 2016).

As biomassas, decorrentes da diversidade de biomas brasileiros, são fonte de recursos renováveis, considerados sustentáveis quando comparados aos recursos fósseis, cuja diversidade, disponibilidade e valor energético fornecem energia de inúmeras maneiras, tais como combustíveis sólidos, líquidos ou gases, assim como calor e eletricidade. Devido a

estas características as biomassas são consideradas uma opção à fontes de energia oriundas de fósseis (DEMIRBAS, 2009; MENA, 2014; RABELO, 2018).

Considera-se que a biodiversidade brasileira possui uma enorme gama de compostos com complexidade e variedade de estruturas moleculares, as quais representam uma fonte com potencial de pesquisa e inovação (DA SILVA; RODRIGUES, 2014). Os compostos químicos presentes no bioma vegetal, passíveis de serem utilizados em diversos segmentos das indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias, são oriundos do metabolismo secundário da planta, seja de origem madeireira ou não madeireira. Diversos processos podem ser utilizados para a extração, de maneira a serem empregados para o consumo humano ou animal (JANKOWSKY et al., 2017).

Dentro da biodiversidade brasileira deve-se considerar a importância das diversas espécies de bambu, nativas ou introduzidas, visto que várias dessas espécies apresentam taxas de crescimento e formação de biomassa comparáveis às obtidas em plantios homogêneos de espécies florestais. Dentre as de interesse econômico destacam-se o *Dendrocalamus asper*, o *Dendrocalamus giganteus*, o *Dendrocalamus latiflorus* e o *Bambusa vulgaris*; sendo que este último tem sido especificamente usado na produção de carvão vegetal, celulose e papel (GRECO; CROMBERG, 2011; GUARNETTI, 2013).

O processo mais amplamente empregado para a conversão da biomassa vegetal em carvão é a pirólise, com aplicação direta na conversão e utilização de calor. No decorrer deste processo diversas faixas de temperatura são aplicadas à biomassa, originando a liberação de gases não-condensáveis e condensáveis; sendo estes últimos denominados licor pirolenhoso, ou extrato pirolenhoso (DIAS et al., 2018). Muitos estudos já foram realizados para se determinar a composição química do licor pirolenhoso, considerando espécies vegetais específicas, assim como sua atividade biológica, configurando uma abordagem sustentável e de “química verde”. O bambu pode ser inserido nesse contexto e, visando contribuir para a ampliação de conhecimentos nesse campo, foi conduzida a presente pesquisa. O estudo focou a espécie *Dendrocalamus asper* considerando a conversão da biomassa em carvão vegetal e, especificamente; o potencial de uso de compostos presentes no licor pirolenhoso com propriedades passíveis de serem empregados como conservantes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. PIRÓLISE E LICOR PIROLENHOSO

O maior volume da produção de carvão vegetal (82,2%) está concentrada na Região Sudeste do país, principalmente para siderurgia; embora o volume produzido em 2016 tenha sido 31,7% menor quando comparado à produção observada em 2015 (IBGE, 2016). O Brasil ainda é o maior produtor e consumidor de carvão vegetal (OLIVEIRA et al., 2017). A biomassa de fontes vegetais é considerada como biomassa de matéria lignocelulósica, devido sua similariedade da composição básica de suas fibras: celulose (35-50%), hemicelulose (20-30%) e lignina (10-25%); além de minerais inorgânicos e extrativos orgânicos, como lipídios, proteínas, açúcares simples, amidos, glicosídeos, alcalóides, resinas, fenólicos e óleos essenciais. (BALAT et al., 2009; CAI et al., 2017; SILVA NETO et al., 2015). Esta constituição química confere rigidez estrutural ao vegetal, seja este arbóreo ou não (SILVA NETO et al., 2015).

A biomassa de materiais lignocelulósicos pode ser convertida em energia e produtos com maior valor comercial, como o carvão vegetal ou o licor pirolenhoso, através de alguns processos de transformação; os quais podem ser definidos como termoquímicos, físicos e bioquímicos. Dentre os supracitados processos, o termoquímico é o mais adotado na produção de carvão e produtos químicos; os quais são obtidos em três diferentes estados: sólido, gasoso condensável (líquido), e gasoso não condensável. As tecnologias envolvidas neste processo são a torrefação, liquefação, gaseificação, combustão e pirólise (BALAT et al., 2009; MENA, 2014).

A pirólise é considerada a tecnologia que melhor traduz a conversão de biomassa em produtos de alto valor. A pirólise é um processo de decomposição térmica de materiais orgânicos, na ausência de atmosfera oxidante, resultando em três subprodutos: carvão vegetal, gases condensáveis ou licor pirolenhoso, e gases não condensáveis (BALAT et al., 2009; CAMPOS, 2007). A pirólise pode ser classificada como lenta, rápida ou flash, de acordo com parâmetros como taxa de aquecimento, tempo de resistência e temperatura (CAI et al., 2017; KAN; STREZOV; EVANS, 2016). A pirólise lenta e a rápida variam em termos das variáveis empregadas no processo, como: I. Taxa de aquecimento; II. Temperatura; III. Tempo de residência das fases sólida e gasosa e IV. Produto final almejado (VIEIRA et al., 2014).

A pirólise lenta, ainda empregada nas carvoarias (ou sistemas contínuos), tem em seu processo o objetivo de uma produção maior de carvão vegetal. A taxa de aquecimento é lenta, de 5 a 7 °C/min, baixas temperaturas (até 600°C), e tempo de permanência no reator de 5 a 30 minutos. A pirólise rápida possui uma faixa de taxa de aquecimento superior, de 10 a 100°C/seg, temperaturas também superiores, variando de 600 a 1000°C, e com reduzido

tempo de permanência, de maneira a otimizar o rendimento de produto líquido. A pirólise flash, ou ultrarrápida, emprega taxa de aquecimento superior a 1000°C/seg, e curto tempo de permanência, visando a obtenção de bio-óleo. (BERNADINO, 2014; MOTA et al., 2015).

Durante o processo de conversão (fases endotérmica e exotérmica) do material lignocelulósico em carvão vegetal ocorrem fases distintas, que relacionam o aquecimento gradativo da madeira e a obtenção dos produtos deste processo, conforme sumarizado na tabela 1 (BRITO, 1990).

Tabela 1. Fenômenos e produtos da conversão da madeira para carvão vegetal (BRITO, 1990).

FASE	TEMPERATURA °C	FENÔMENOS E PRODUTOS
I	Até 200	- Poucas reações importantes; - Perda de umidade; - Fase endotérmica.
II	200 até 270-280	- Aumento de reação e na eliminação de gases; - A madeira passa para a cor marrom arroxeada; - Fase endotérmica.
III	280 até 250 – 380	- Importante fase de reações e grande eliminação de gases; - Composição de gases: centena de componentes químicos orgânicos (alguns recuperáveis). ex: ácido acético, metanol, acetona, fenóis, aldeídos, hidrocarbonetos, alcatrões, etc; - O resíduo final dessa fase já é o carvão vegetal, mas que ainda apresenta compostos volatizáveis em sua estrutura; - Fase exotérmica.
IV	380-500	- Redução da saída de gases; - O carvão vegetal passa a sofrer uma purificação na sua composição química com a eliminação do restante dos gases voláteis contendo hidrogênio (H) e oxigênio (O). O carvão torna-se mais rico em carbono em sua estrutura (carbono não volatizável ou carbono fixo); - Fase exotérmica.
V	Acima de 500	- Degradação do carvão; - Término da carbonização e início da gaseificação do carvão; - Fase exotérmica.

O material lignocelulósico é degradado durante o processo de pirólise lenta. As ligações químicas dos compostos orgânicos, tais como C-C, H-O, C-H e C-O, são decompostas por desidratação, hidrólise, oxidação, descarboxilação e despolimerização, gerando produtos gasosos, vapor de água, alcatrão e voláteis (MANSUR et al., 2011). Os voláteis orgânicos condensáveis são denominados de licor pirolenhoso, ou seja, a fração líquida, aquosa, altamente oxigenada e complexa (MATHEW; ZAKARIA, 2014).

O licor pirolenhoso é caracterizado como um líquido marrom, contendo uma fração aquosa composta de, ao menos, 80% de água; sendo que o restante pode conter mais de 200 compostos hidrossolúveis, com destaque para ácido acético, metanol, acetona, alcatrão solúvel e insolúvel. Estes compostos podem ser obtidos de diferentes espécies vegetais tais como bambu, eucalipto e pinus (ALMEIDA, 2012; CAMPOS, 2007; MENA, 2014; SENA et al., 2014). A característica de constituição química do alcatrão solúvel é a presença de fenóis como cresóis, xilenóis, guaiacol, metilguaicol, dentre outros. A fração insolúvel do alcatrão

pode ser obtida separadamente do licor pirolenhoso através do processo de destilação, com temperatura até 200°C, na qual há presença de aldeídos, cetonas, ésteres, ácidos e óleos pesados; e acima de 200°C, fenóis e o piche como resíduo (LEPAGE et al., 1986).

A composição química do licor pirolenhoso está diretamente relacionada com a temperatura da pirólise. A hemicelulose se decompõem numa faixa de temperatura relativamente baixa, de 200 a 320°C; a celulose começa a ser degradada a 280 até 360°C; e a lignina, cuja composição química é mais variável entre as espécies vegetais, degrada em uma faixa mais ampla de temperatura, de 140 a 600°C. A decomposição da celulose ocorre numa faixa estreita de temperatura devido a sua estrutura cristalina, homogênea, não ramificada de unidades de glicose ligadas a β - (1-4). A hemicelulose, cuja principal estrutura é a xilana, confere uma natureza amorfa com muitas unidades ramificadas, apresentando como característica termoquímica baixa energia de ativação e, desta forma, sendo responsável pela faixa relativamente baixa de temperatura na qual é degradada. A estabilidade termoquímica da lignina é devido às ligações cruzadas das moléculas aromáticas de sua composição (MATHEW; ZAKARIA, 2014).

A obtenção e uso do licor pirolenhoso não é uma prática recente, retomando à China antiga, assim como a Índia. Já no século 17, na Europa, registros do uso do líquido (pirolenhoso) da produção de alcatrão através da destilação seca de madeira também foram relatados. Há referências de que, em 1813, na Inglaterra, teria sido iniciada a produção de licor pirolenhoso, em grande escala, para coloração do linho (CAMPOS, 2007).

A produção do licor pirolenhoso deve seguir um rigoroso controle de processo, visando obter produto com baixo teor de alcatrão (composto apolar muito tóxico); e preservando os compostos químicos de interesse, sem degradá-los. Após iniciado o processo de pirólise, a condensação dos gases que originam o licor pirolenhoso deve ser monitorada, pois as reações químicas de polimerização continuam ocorrendo durante um período de até 06 meses (CAMPOS, 2007). Por este motivo é fundamental, considerando as potenciais aplicações do licor, providenciar o armazenamento adequado para evitar uma possível alteração química.

O licor pode ser utilizado em diversas áreas, tais como (CAMPOS, 2007):

- Desinfetantes e esterilizantes eficientes;
- Aditivos de alimentos;
- Aditivo em adubos orgânicos e compostagens, entre outros.

A validação da aplicação do licor considera fatores como a composição química da biomassa (produtos madeireiros e não-madeireiros); a faixa de temperatura no qual é obtido; armazenamento, estudo da composição química do licor; avaliação de toxicidade, quando empregado em uso humano e animal; avaliação de atividade biológica; determinação da segurança.

A utilização do licor pirolenhoso é ampla na agricultura com diversas aplicações: fertilizante orgânico aplicado ao solo no cultivo do arroz, sorgo e batata doce; fungicida; nematicida, dentre outros (ZANETTI et al., 2003). Nesse contexto, as principais referências estão vinculadas ao licor pirolenhoso obtido a partir da carbonização da madeira de eucalipto, por se tratar de uma espécie amplamente usada para a produção de carvão vegetal no Brasil. Há, inclusive, referência de pesquisa recentemente realizada, demonstrando o potencial antifúngico do licor pirolenhoso obtido da madeira de eucalipto para o fungo *Aspergillus niger* (ALMEIDA, 2012).

Os licores pirolenhosos, oriundos das inúmeras biomassas lignocelulósicas disponíveis, apresentam composição química com a presença de compostos aromáticos, cetona, fenóis, entre outros, com rendimentos e características que dependem da temperatura aplicada durante a pirólise e, logicamente, da composição da matéria-prima utilizada. Esta composição química orienta a aplicação do licor pirolenhoso em diversas áreas como na agricultura, alimentícia e, também, em sistemas conservantes. Considerando o conjunto de informações a respeito da produção do licor pirolenhoso, o foco deste trabalho foi o bambu *Dendrocalamus asper* como fonte da biomassa lignocelulósica.

2.2. BAMBU *Dendrocalamus asper* (Schult & Schult) Backer COMO FONTE DE BIOMASSA PARA PRODUÇÃO DE LICOR PIROLENHOSO

Embora apresentem similaridade em determinados usos, os bambus não são considerados como madeira, mas sim pertencentes ao grupo de plantas da família das gramíneas, *Poaceae* e subfamília *Bambusoideae*. São representados por 1250 espécies, distribuídas em 75 gêneros, sendo que a maioria delas é de rápido crescimento, atingindo maturidade por volta dos 05 anos (MOGNON et al., 2015; PEREIRA; BERALDO, 2016).

Os bambus, ao contrário de outras espécies de gramíneas, realizam fotossíntese C_3 , semelhante às espécies arbóreas, favorecendo o crescimento de sua biomassa em ambientes ricos em CO_2 , em ausência de fatores limitantes. Diversos gêneros de bambu são encontrados do México até o sul do Brasil, geralmente em regiões úmidas e de alta altitude. No Brasil podem ser encontradas desde o Rio Grande do Sul até a Bahia, ocorrendo principalmente nas regiões de bioma da Mata Atlântica (MOGNON et al., 2015). Por se tratar de uma espécie não originária em solo brasileiro, considera-se que houve grande adaptação dos gêneros *Bambusa*, *Dendrocalamus* e *Phyllostachys*. No Brasil, o bambu vem sendo cada vez mais empregado na indústria moveleira e na produção de painéis, uma vez que é considerado resistente e ecologicamente correto, atingindo patamares de sustentabilidade necessários à sociedade e ao ambiente (PEREIRA; BERALDO, 2016).

A espécie *Dendrocalamus asper* (Schult & Schult) Backer foi provavelmente trazida ao Brasil do sudoeste da Ásia pelos colonizadores portugueses. Em solo brasileiro apresenta touceiras de grande porte, com até 30 m de altura, sendo que os colmos da base podem chegar a 30 cm de diâmetro. Sua coloração marrom, em colmos jovens, ocorre devido a presença de tricomas (BRITO, 2018; TOMBOLATO; GRECO; PINTO, 2012).

A espécie *Dendrocalamus asper* é uma importante espécie de bambu no Brasil, entretanto é erroneamente identificada como *Dendrocalamus giganteus*, porque ambas as espécies são um tipo de bambu gigante com grandes diâmetros de colmo (AKIRA et al., 2007; FELISBERTO et al., 2017).

O bambu, de uma forma geral, é amplamente empregado como um substituto da madeira, tanto devido suas características físico-mecânicas, como também pelos aspectos ambientais favoráveis, como sequestro de carbono, em relação à sua cultura. As indústrias que trabalham com o processamento do bambu são consideradas estratégicas para o desenvolvimento das economias locais, devido suas características em tecnologia para aproveitamento do recurso florestal (MOGNON et al., 2015; YU, 2008), em termos de produtos madeireiros e não madeireiros.

Na construção civil o bambu é uma matéria-prima vegetal amplamente conhecida. Há referências de sua utilização descrita a mais de cinco mil anos, por conta de descobertas arqueológicas de cestas de bambu na província de Zhejiang, China (ROSA, 2013). Considerado um importante recurso natural renovável, principalmente para países africanos e asiáticos, apresenta grande emprego para construções civis e industriais; assim como utilizações rurais e residenciais (BRITO; TOMAZELLO FILHO; SALGADO, 1987; MAHDAVI; CLOUSTON; ARWADE, 2011).

Os colmos do bambu são anatomicamente compostos de feixes vasculares (12,8%), fibras (47,6%) e parênquima (39,6%) (MARINHO; NISGOSKI; DE MUÑIZ, 2014), evidenciando que as fibras são os constituintes majoritários do bambu. A parede celular, cujo foco de interesse reside na composição das fibras, é constituída de celulose, hemicelulose, holocelulose (microfibrilas de celulose, particularmente α -celulose, envoltas em hemicelulose), lignina, baixos teores de pectina e elevado conteúdo de compostos fenólicos (com até 5% de peso seco de ácido ferúlico). Estes componentes da fibra variam de acordo a espécie de bambu. As principais hemiceluloses encontradas são xilanos e arabinoglucanos, e em menor quantidade glucanos de ligação mista e xiloglucanos (ácido fenólico ligado a hemicelulose). A polimerização de três unidade monoméricas, os álcoois p-cumaril, conoferil e sinapil, originam os precursores das unidades fenilpropanoides guaiacil, siringil e p-hidrofenil, presentes nas ligninas encontradas nas fibras de bambu (SILVA, 2017). O *Dendrocalamus asper* apresenta fibras com 76,33%, 68,11% e 28,70% para holocelulose, α -celulose e lignina, respectivamente (MARINHO; NISGOSKI; DE MUÑIZ, 2014).

Em 2011 o governo Brasileiro, com a Lei 12.484, que dispõe sobre a Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu, promoveu políticas para o manejo sustentável e o cultivo de bambu. Através desta Lei o governo visou o desenvolvimento da cultura do bambu, tanto com ações governamentais quanto de investimentos privados. Entre as ações previstas pela Lei o governo federal tinha por objetivo elaborar planos de trabalho para implementação de incentivos à pesquisa e desenvolvimento tecnológico, focando o manejo sustentável, cultivo, serviços ambientais. Entre outras ações, o governo federal pretendia trabalhar na implementação do incentivo à pesquisa e ao desenvolvimento tecnológico com foco em manejo sustentável, cultivo, serviços ambientais e aplicações de produtos e sub-produtos do bambu (BRASIL, 2011).

O governo federal elabora vários programas para pesquisar e desenvolver o uso de fibras de bambu para construção de casas, isoladamente ou como reforço em diferentes tipos de matrizes, como compósitos de solo e cimento (FELISBERTO et al., 2017; GHAVAMI, 2005; SANTOS et al., 2016). Entretanto, mesmo com o possível estímulo à pesquisa, advindo da Política sobre Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu, verifica-se que há pouca informação disponível sobre o aproveitamento de outros produtos que podem ser obtidos a partir da pirólise. Dentre estes produtos pouco explorados está o licor pirolenhoso (JANKOWSKY et al., 2018; MENA, 2014).

Sabe-se que suas folhas apresentam propriedades anti-fúngicas (HADI; BREMNER, 2001; ZHOU; SHEN; HOU, 2017); porém a atividade antimicrobiana do licor pirolenhoso ainda é relativamente pouco descrita. Em um estudo comparativo de diferentes biomassas lignocelulósicas, incluindo bambu, seu licor pirolenhoso mostrou atividade antiviral (LI et al., 2018a). Pesquisa realizada com o licor pirolenhoso de bambu demonstrou que uma de suas frações fenólicas apresenta atividade germicida para o piconarvirus, um encefalomicardio vírus (MARUMOTO et al., 2012); e o licor pirolenhoso de *Dendrocalamus asper*, obtido em temperatura acima de 600°C, demonstrou perfil coagulante e antifúngico ao ser adicionado ao látex (SUMANATRAKUL et al., 2015).

Assim pode-se considerar que o bambu está a merecer uma maior atenção quanto ao potencial dos produtos obtidos da sua pirólise e, em particular, o licor pirolenhoso, obtido em diferentes faixas de temperatura. Nesse contexto, incluem-se a exploração de compostos com propriedades bacteriostáticas e/ou fungistáticas, que possam ser fontes de agentes conservantes, por exemplo, aplicáveis em diversos produtos como saneantes, cosméticos e medicamentos, para indústria farmacêutica e química, alimentos e até mesmo para o tratamento de madeiras de uso doméstico. As possibilidades são amplas, porém, no momento, pouco exploradas.

2.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA SOBRE AS BACTÉRIAS *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*

As bactérias são unicelulares, da classe procaríoto, devido à ausência de membrana nuclear. Morfologicamente podem apresentar diferentes formas, tais como cocos, bacilos, cilíndricas ou espiral, cujos arranjos podem igualmente variar. Os coco, por exemplo, podem ser encontrados em arranjos como diplococos, tétrades, estreptococos e estafilococos. Os bacilos podem ser encontrados isoladamente ou em arranjos, diplobacilo ou estreptobacilos. De maneira geral as bactérias apresentam mecanismos de locomoção, os flagelos, membrana plasmática e parede celular. Estas estruturas, assim como os diferentes tipos de arranjos celulares, permitem as bactérias sobrevivência e, ainda, sua patogenicidade (CAMPOS, 2017a; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). A figura 3 ilustra a estrutura morfológica geral das bactérias.

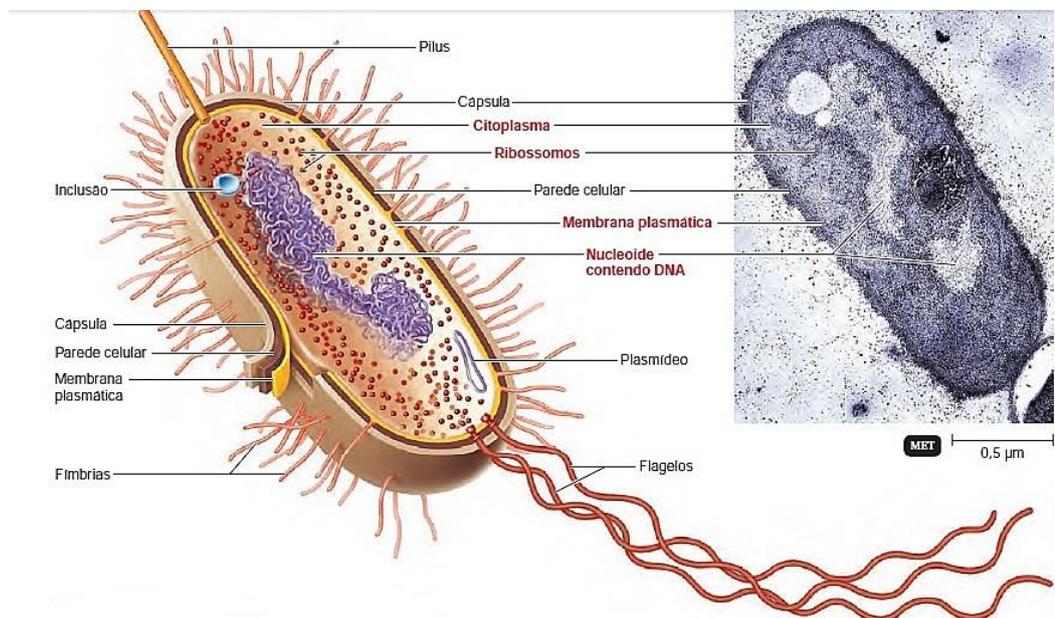


Figura 3. Estrutura morfológica geral de bactérias (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

As bactérias Gram-positiva e Gram-negativa apresentem semelhanças estruturais, contudo são as diferenças fundamentais que permitem a ação de um agente antimicrobiano por sua atividade bactericida ou bacteriostática sobre o microrganismo. Doravante cada classe de agentes antimicrobianos apresenta um mecanismo de ação único e, para compreender tanto a forma de ação como as maneiras de resistências geradas pela bactérias, é preciso compreender algumas de suas características básicas da estrutura celular bacteriana (COLYE et al., 2005), com atenção para as paredes celulares. A parede celular bacteriana é um alvo para novos antimicrobianos pois seu arranjo se diferencia da parede

celular de mamíferos, evidenciado nos lipídios aniônicos, que nos procaríotos são expostos na superfície das membranas bacterianas em oposição as membranas eucarióticas, nas quais os lipídios aniônicos são sequestrados para a monocamada voltada para o interior da célula, ou organela (EPAND et al., 2016).

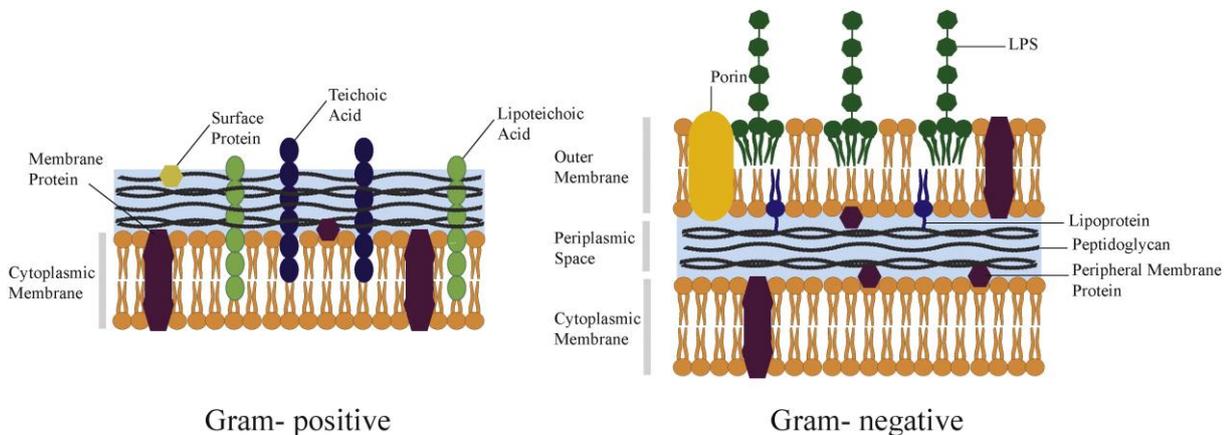


Figura 4. Paredes celulares de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa (EPAND et al., 2016).

A ilustração da figura 4 evidencia as diferenças entre as paredes celulares. Tanto as bactérias Gram-negativas quanto as Gram-positivas apresentam como principal componente da parede celular os peptidoglicanos com uma face citoplasmática e outra externa, que conferem formato e resistência para estas. As bactérias Gram-negativas apresentam duas camadas de membranas com um espaço peri-plasmático entre ambas, no qual podem ser encontrados as β -lactamase. A membrana externa é uma monocamada com endotoxinas lipopolissacarídeos (LPS), pouco peptidoglicano (10%) e proteínas como porinas. A parede celular das bactérias Gram-positivas é constituída em 90% de peptidoglicanos, contendo ácido lipoprotéico e ácido teicoico. Os lipídeos encontrados nos dois diferentes tipos de paredes celulares são fosfatidilglicerol (PG), fosfatidiletanolamina (PE) e cardiolipina (CL), em diferentes concentrações de acordo com a bactéria. Tais diferenças determinam o mecanismo de ação dos antimicrobianos para cada tipo de bactéria, assim como estão relacionados com os mecanismos de resistências das mesmas (COLYE et al., 2005; EPAND et al., 2016; LEVINSON, 2011; MALANOVIC; LOHNER, 2016).

A *Escherichia coli*, juntamente com *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter*, são coletivamente consideradas como bacilos coliformes. Apesar desta classificação a *Escherichia coli* faz parte da flora natural do intestino humano e, nestas condições, não apresenta riscos ao indivíduo. Esta bactéria faz parte da família Enterobacteriaceae, classificada como Gram-negativa, devido a estrutura de sua parede celular, sendo considerada um bastonete, com dimensões de até 1,1 a 1,5 μm por 2,0 a 6,0 μm . As cepas de *Escherichia coli* patogênicas e virulentas podem ocasionar diarreia não inflamatória

(diarréia aquosa) ou diarréia inflamatória (disenteria com fezes geralmente contendo sangue, muco e leucócitos) (DE OLIVEIRA SOUZA et al., 2016; EVANS JR; EVANS, 1996; GUENTZEL, 1996).

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram e catalase positiva cujo tamanho varia de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro. Sua parede celular expressa uma variedade de proteínas extracelulares e polissacarídeos, diretamente relacionados com sua potencial virulência. É imóvel, não encapsulada e apresenta-se com diversas formas e cocos: isolado, aos pares, em cadeias curtas e em arranjos irregulares. No organismo humano saudável, é encontrado na pele, axilas e nas cavidades nasais. O *Staphylococcus aureus* pode causar lesões superficiais da pele (furúnculos) e abscessos localizados em outros locais; infecções profundas como osteomielite e endocardite, assim como infecções cutâneas graves como furunculose; é o principal microrganismo patógeno a causar infecção hospitalar adquirida (nosocomial) de feridas cirúrgicas. Em alimento pode liberar enterotoxinas ocasionando intoxicações alimentares, promove a síndrome de choque tóxico, por liberar na corrente sanguínea superantígenos. Ainda estão relacionados a infecções como espinhas, furúnculos, celulite, pneumonia, meningite, entre outros (FOSTER, 1996; HARRIS et al., 2002; SOARES et al., 2017).

O uso excessivo de antibióticos aumenta a resistência bacteriana, promovendo um aumento das infecções, principalmente no contexto hospitalar. Bactérias como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* vêm apresentando patogenicidade crescente, e estudos de novos compostos químicos com atividade antimicrobiana são imperativos para a saúde da comunidade.

As primeiras evidências da patogenicidade e aumento da resistência aos tratamentos convencionais para ambas as bactérias estão registradas em hospitais, onde os casos são mais facilmente registrados. O Instituto Nacional de Saúde Pública e Meio Ambiente, na Holanda, vem coletando dados fornecidos pelo Sistema Europeu de Vigilância da Resistência aos Antibióticos, entre os anos de 1999 e 2009. As análises evidenciam o crescimento na taxa de mortalidade, de internações hospitalares e, conseqüentemente, um aumento em gastos hospitalares relacionados a bacteremias por *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e por *Escherichia coli* resistentes a cefalosporinas de terceira geração (G3CREC). Este cenário é considerado como de risco, devendo ser avaliado com critério e preocupação (KRAKER et al., 2011).

Em Portugal há uma crescente preocupação com o MRSA, não somente em âmbito hospitalar, mas no uso pela população não internalizada. Os custos gerados e o grave impacto sob a população estão relacionados a fatores de risco, como idade e hábitos gerais, assim como internações prolongadas. O crescimento do casos de MRSA é alarmante, de acordo com os dados obtidos e remetem a necessidade de mudanças de hábitos pelos pacientes,

profissionais da área da saúde e maiores estudos para minimizar o impacto de infecções resistentes aos tratamentos convencionais (CARVALHO, 2017).

Um estudo relacionou o uso de fluoroquinolona, um antibiótico com alta eficácia antimicrobiana e aceitabilidade por pacientes durante o tratamento, com resistência de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, em 17 hospitais nos Estados Unidos e as comunidades próximas, no ano de 2000. Os resultados encontrados remetem as associações entre o uso de fluoroquinolonas em hospitais e resistência à meticilina em *Staphylococcus aureus* e entre o uso de fluoroquinolona em comunidades e resistência às fluoroquinolonas em *Escherichia coli* em hospitais (MACDOUGALL et al., 2005). E outros casos são relatados com *Escherichia coli* (ABERNETHY et al., 2017; STOESSER et al., 2017) e *Staphylococcus aureus* (ZETOLA et al., 2005), nos quais os hábitos de consumo de antibióticos fora do ambiente hospitalar, associado a populações de risco (idade, alimentação, hábitos diários), aumentam a prevalência de infecções hospitalares resistentes e custos elevados aos hospitais. Estes hábitos estão relacionados aos prescritores de medicação e ao consumo inadequado pelos pacientes.

Entretanto as infecções não estão restritas a hospitais e sistemas orgânicos internos ao corpo humanos. Em meados de 2000, no Estados Unidos, uma epidemia por MRSA provocou infecções na pele e tecidos moles, ocasionando danos aos pacientes e ao sistema de saúde pública (CHALLAGUNDLA et al., 2018).

Todos os relatos acima evidenciam que o uso inadequado e más condutas por pacientes, prescritores e uso em âmbito hospitalar de antimicrobianos oneram a comunidade e os sistemas de saúde pública. Bactérias como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* estão entre os relatos de maiores incidências no aumento de resistências as tratamentos medicamentosos devido a sua patogenicidade, e estudos de novos compostos químicos com atividade antimicrobiana são imperativos para a saúde da comunidade. Para iniciar uma real modificação em tal cenário são necessárias ações preventivas e pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos, aliando fontes pouco exploradas de compostos químicos e novas tecnologias, tais como nanotecnologia, para combater as bactérias resistentes que ameaçam a saúde pública. Considerando o perfil de ação desses compostos como potenciais conservantes, há a possibilidade da aplicação nas indústrias alimentícia, cosmética e química, entre outros (ALSALH et al., 2016; ANVISA, 2010; SOARES et al., 2017; VIEIRA; VICENTINO VIEIRA, 2018).

Muitos subprodutos do bambu são relativamente pouco explorados devido a falta de estudos que agreguem valor ao produto final. Considerando a biomassa de bambu e a obtenção de licor pirolenhoso, muitos estudos sugerem potenciais de aplicabilidade, e neste trabalho se optou por avaliar o perfil antimicrobiano em bactérias Gram positiva, a *Escherichia coli*, e Gram negativa, a *Staphylococcus aureus*.

O emprego do licor pirolenhoso de *Dendrocalamus asper*, com potencial atividade antimicrobiana, pode ser empregado em sistemas conservantes, em indústrias farmacêuticas, cosméticas, químicas e alimentícias.

2.4. SISTEMAS CONSERVANTES

De acordo com a Resolução nº 79, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) os conservantes são definidos como: "substâncias adicionadas aos produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes com a finalidade primária de preservá-los de danos e/ou deteriorações causadas por microrganismos durante suas fabricações e estocagem, bem como proteger o consumidor de contaminação inadvertida durante seu consumo" (ANVISA, 2010).

Não existe uma única substância química que possa ser considerada como um conservante ideal, por isso é costumeiro o emprego de misturas de substâncias que promovam a atividade antimicrobiana apropriada ao emprego destinado. Contudo, um bom conservante apresentaria as características de amplo espectro de ação inibitória para fungos e bactérias, tanto as Gram-positivas quanto para as Gram-negativas («Conservantes», 2011).

Entretanto, ao considerar o emprego de quaisquer substâncias químicas, é necessário avaliar sua toxicidade, pois mesmo em cosméticos os sistemas conservantes podem ocasionar reações de hipersensibilidade, graus I, II, III e IV (GOMES, 2017; SOUZA, 2014).

Na área alimentícia a importância de conservantes com atividade antimicrobiana é fundamental para garantir a ingestão segura de alimentos, tanto para seres humanos quanto para animais. A demanda crescente por conservantes em produtos industrializados aliada a procura de conservantes de origem natural, ou com menos síntese química, é considerável entre os consumidores. Os nitratos e nitritos estão relacionados ao desenvolvimento de neoplasias, em particular estomacal, e na redução do transporte de oxigênio (O₂), sendo considerado um agravante para grupos de risco e crianças (FANI, 2012; FERREIRA, 2015).

Por estas razões os estudos envolvendo novas tecnologias, como as nanopartículas, e novos agentes antimicrobianos para bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, são imperativas no contexto mundial.

3. OBJETIVOS

Pretendeu-se como **objetivo geral** da pesquisa estudar o potencial do licor pirolenhoso obtido a partir da pirólise da espécie de bambu *Dendrocalamus asper* (Schult & Schult) Backer, e avaliar seu potencial antimicrobiano para as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

3.1. Objetivos Específicos

- I. Quantificar a conversão da matéria-prima em produtos, considerando três diferentes temperaturas de pirólise: 250°C, 350°C e 550°C.
- II. Avaliar as características organolépticas e as possíveis características de solubilidade química dos licores pirolenhos.
- III. Estudar o potencial antimicrobiano dos licores pirolenhos e de suas frações metanólica e hexânica, em linhagens bacterianas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.
 - a.
 - b.
- IV. Considerando os resultados obtidos nas fases anteriores, selecionar o licor pirolenhoso de uma única temperatura, e uma única fração química, visando:
 - a. Analisar quimicamente a fração selecionada, mediante cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas;
 - b. Obter curvas dose-resposta a partir de testes bioguiados em difusão de disco;
- V. Avaliar as possíveis alterações morfológicas e químicas nas bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Na figura 5 encontra-se o fluxograma das atividades realizadas na execução da presente pesquisa.

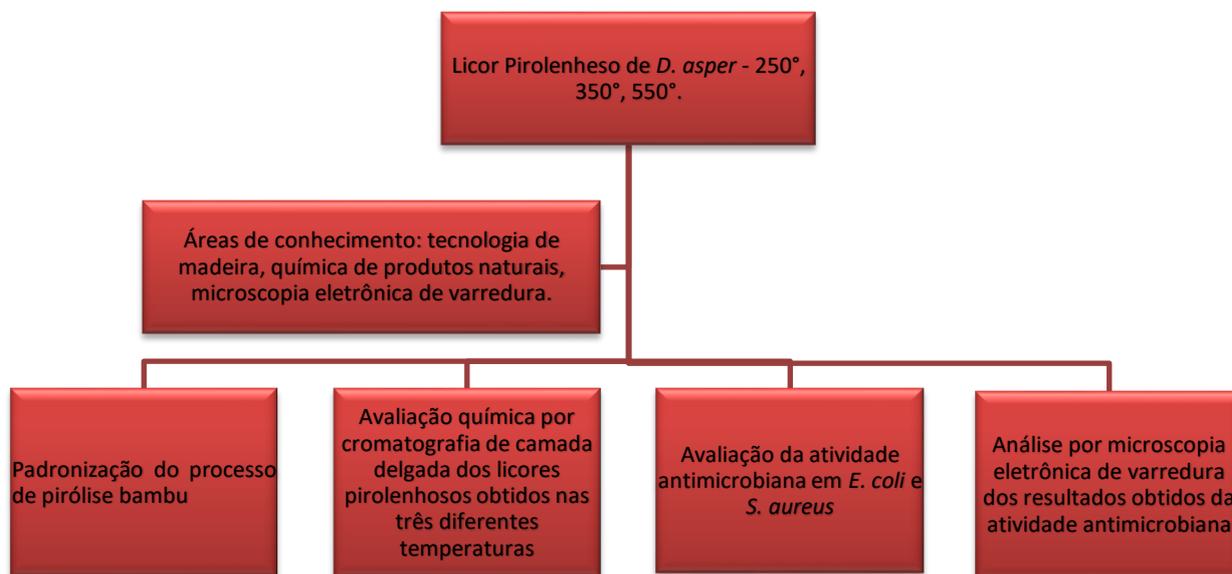


Figura 5. Fluxograma das atividades realizadas para análise dos licores pirolenhos de *D. asper* nas temperaturas de 250°C, 350°C e 550°C.

A pesquisa foi desenvolvida de forma a integrar diferentes especialidades e, por conta desse fato, requereu o uso de distintas estruturas laboratoriais existentes no Campus da ESALQ/USP:

- Laboratório de Química, Celulose e Energia do Departamento de Ciências Florestais/ESALQ/USP;
- Laboratório de Secagem de Madeiras do Departamento de Ciências Florestais/ESALQ/USP;
- Laboratório de Química Orgânica de Produtos Naturais do Departamento de Ciências Exatas – Química, ESALQ/USP;
- NAP/MEP – Núcleo de Apoio a Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada a Agricultura – ESALQ/USP.

4.1. COLETA DO MATERIAL

O bambu, espécie *Dendrocalamus asper* (Schult & Schult) Backer, foi coletado na fazenda da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento (UPD) da Agência Paulista de

Tecnologia dos Agronegócios (APTA), no município de Tatuí – São Paulo (figura 6). Os critérios de seleção adotados foram: (a) touceiras com idade superior a três anos e, (b) sinais de manchas e ramificações, indicativos da idade do bambu. Foram selecionadas 08 plantas, com altura variando de 15,0 a 20,0 m e circunferência média de 15,0 cm.



Figura 6. *D. asper* coletado na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento (UPD) da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), no município de Tatuí – São Paulo. **A:** touceira com a nome científico da espécie de bambu, certificando a identificação correta. **B:** touceira de bambu utilizada para o estudo.

Com o auxílio de motosserra as hastes do bambu foram obtidas *in situ*, cortadas em colmos de 2 metros de comprimento e transportadas até o Laboratório de Secagem de Madeiras do Departamento de Ciências Florestais (ESALQ/USP). Para que as taliscas fossem obtidas os colmos foram cortados longitudinalmente com uma serra circular com guia. Com o propósito de remover a camada interna, rica em amido, da camada externa (casca), as taliscas foram processadas numa plaina desgrossadeira. Posteriormente foram transformadas em cavaco, através do uso de uma serra de fitas, e submetidos a dois processos subsequentes de secagem, uma ao ar livre e outra em estufa (BRITO, 2013, 2018). A figura 7 ilustra os processos supracitados.



Figura 7. Processamento mecânico do bambu: (A) Colmos seccionados em campo; (B) Taliscas processadas com casca; (C) Desengrosso das Taliscas; (D) Taliscas; (E) Cavacos. Fonte: BRITO, 2018.

Os cavacos, após as secagens, foram transformados em partículas, através de um moinho de facas Willey, dotado de uma peneira com malha de 4 mm de abertura (0,85 mesh). As partículas foram secas em estufa á 103°C por 24 horas para que a umidade fosse de 0%, aproximadamente. Desta forma foram armazenadas em sacos plásticos para evitar contaminação.

4.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE

Para a condução do processo de pirólise o material vegetal necessita estar com o teor de umidade próximo de 0%, razão pela qual a determinação do teor de umidade foi realizada para cada pirólise, individualmente.

Dois métodos foram , para a determinação do teor de umidade, foram comparados entre si. O primeiro consiste no método gravimétrico, no qual uma de aproximadamente 5 g, em triplicata, foi introduzida na estufa, a 103°C por 24 horas (GALVÃO; JANKOWSKY, 1985). Decorrido este período as amostras foram pesadas e o cálculo realizado de acordo com a equação (1):

$$U\% = ((M_u/M_s) - 1) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

Mu = massa úmida, em gramas.

Ms = massa seca a 0%, em gramas.

U% = Teor de umidade, em porcentagem.

O segundo método é utilizando a balança ID200, específica para determinar o teor de umidade em material particulado (figura 8). Nesta, uma amostra de 2 g foi introduzida e aquecida a 103°C, por 10 minutos. Após esse período a balança automaticamente informa o teor de umidade da amostra.

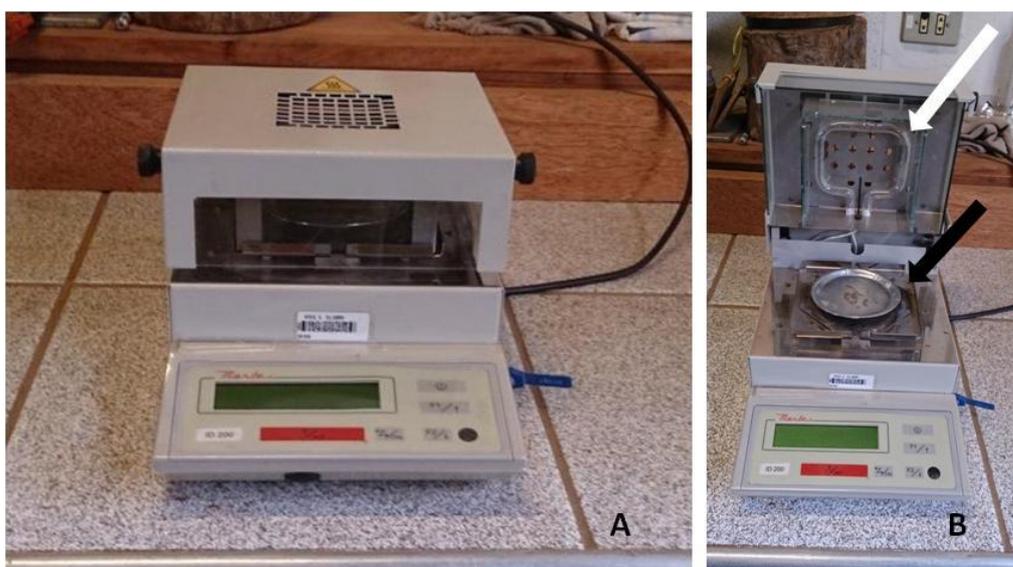


Figura 8. Balança ID200 específica para determinar o teor de umidade em material particulado. **A.** Balança ID200. **B.** Mesmo aparelho, onde a seta preta indica o local onde o material particulado é introduzido e, a seta branca, o sistema de aquecimento da balança.

Os resultados obtidos nos dois métodos foram comparados entre si, de forma a determinar qual poderia ser utilizado para a análise da porcentagem de umidade a ser realizada antes de cada pirólise.

4.3. OBTENÇÃO DOS LICORES PIROLENHOSOS INTEGRAIS ATRAVÉS DO PROCESSO DE PIRÓLISE

Para obtenção do licor pirolenhoso integral (LPI) foram realizadas pirólises conduzidas em forno-mufla laboratorial (figura 9), com ausência de oxigênio, de *D. asper* particulado. A pirólise foi realizada em três diferentes temperaturas, e para cada temperatura foi designado uma denominação para o licor obtido. Assim:

- O licor obtido a 250°C foi denominado LPI250;
- O licor obtido a 350°C foi denominado LPI350;
- O licor obtido a 550°C foi denominado LPI550.

O forno-mufla é dotado de resistência elétrica com controle de temperatura. Um recipiente metálico (volume nominal de 500 cm³) foi introduzido no interior da mesma, contendo 250 g (±4 g) do material a ser pirolizado. O forno-mufla estava conjugado a um sistema de coleta em vidro, com separação para os gases condensáveis.

Para coleta dos licores pirolenhosos um sistema de dois condensadores de vidro, acoplados a um balão volumétrico previamente pesado em balança semi-analítica, foram conectados ao recipiente metálico já introduzido na mufla laboratorial. Uma corrente de água fria ficou circulando pelos condensadores durante todo processo.

Para a pirólise a mufla foi calibrada com uma rampa de aquecimento de 1,7 graus/minuto, até atingir as temperaturas selecionadas. Uma vez atingida a temperatura de escolha, o material acondicionado no recipiente metálico permaneceu sob o efeito desta temperatura por 4 horas, período em que foi coletado o licor pirolenhoso, conforme figura 9.

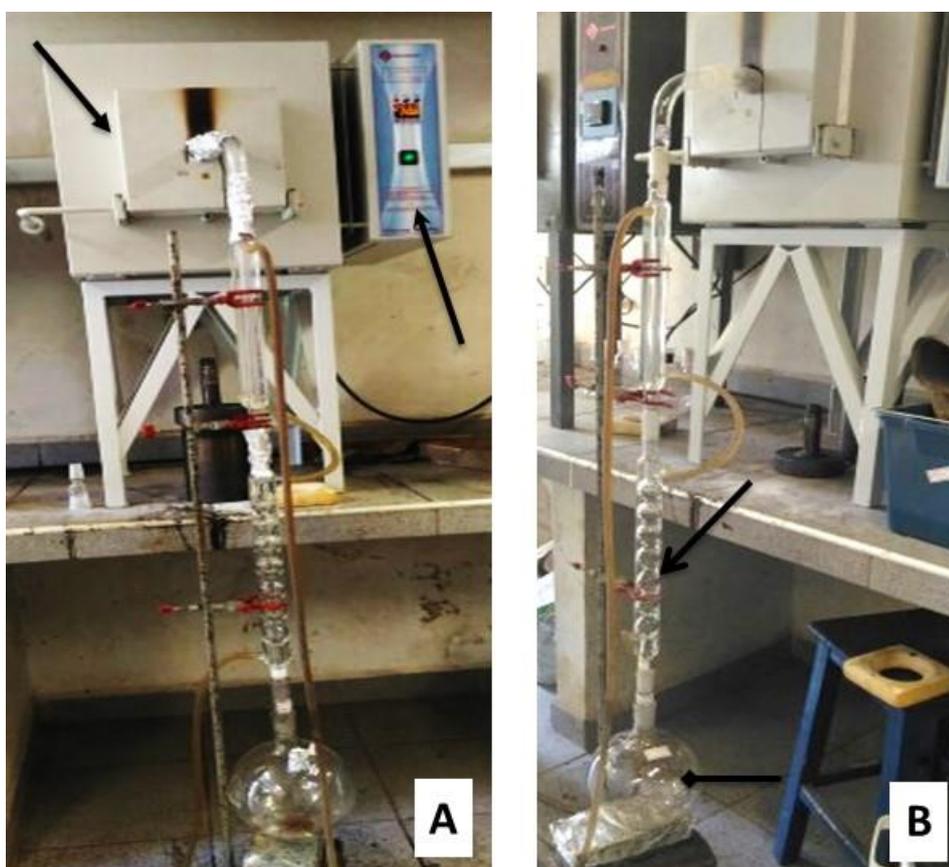


Figura 9. Mufla laboratorial acoplada ao sistema de condensadores de vidro e balão volumétrico, utilizados durante a pirólise e coleta dos licores pirolenhosos. **A:** Setas destacando a mufla laboratorial onde o cilindro contendo bambu é submetido a aquecimento; e o sistema eletrônico de controle de rampa de aquecimento da mufla. **B:** Seta furtiva evidenciando o sistema de condensadores para os gases voláteis; seta em losango demonstrando o balão volumétrico onde o licor pirolenhoso foi coletado.

Após o período de 4 horas o balão volumétrico era pesado novamente, obtendo-se a massa de licor pirolenhoso coletado durante a pirólise, sendo então o volume transferido para uma proveta de vidro e mensurado, e na sequência, transferido para um recipiente de vidro âmbar e armazenado em geladeira a 4°C.

4.4. CÁLCULO DE RENDIMENTO DOS LICORES PIROLENHOSOS INTEGRAIS

O rendimento gravimétrico em gases condensáveis (licor pirolenhoso) expressa a relação entre a massa do líquido condensado e a massa da madeira, na base seca, segundo equação 2:

$$\text{RLP} = (\text{PGC} / \text{PMS}) \times 100 \quad (2)$$

Onde:

RLP = rendimento gravimétrico de licor pirolenhoso, em (%);

PGC = massa do gás condensado, em (g); e

PMS = massa da madeira seca, em (g).

4.5. FRACIONAMENTO POR PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Os LPIs, das três temperaturas de estudo, foram submetidos separadamente a um fracionamento químico por partição líquido-líquido. Os solventes orgânicos de escolha foram o metanol e o hexano (Sigma-Aldrich). Inicialmente, 20 mL de LPI, medidos em uma proveta de vidro, foram introduzidos em um funil de separação, alocado em uma capela. No mesmo funil de separação foram adicionados 30 mL de metanol (PA) e, posteriormente, 50 mL de hexano (PA). Após a adição de hexano o funil de separação era manualmente agitado e colocado em pé para que a separação dos compostos químicos presentes no LPI ocorresse através da afinidade pelas polaridades distintas dos solventes orgânicos. Esse procedimento foi realizado por 8 vezes, totalizando um volume de 400 mL de hexano, sendo que a cada agitação do funil a fração hexânica do LPI era coletada em um bequer.

Após a coleta ambas as frações foram concentradas através da evaporação dos solventes orgânicos em rotaevaporador a vácuo e aquecido a 60°C e, posteriormente, armazenadas em ambiente refrigerado a 4°C.

Esse procedimento foi realizado para cada um dos licores pirolenhos integrais (LPI250, LPI350 e LPI550), gerando as frações metanólicas FMeOH250, FMeOH350 e FMeOH550; e as frações hexânicas FHex250, FHex350 e FHex550, respectivamente (figura 10).

Todas as frações, metanólicas e hexânicas, foram analisadas pela avaliação antimicrobiana, bioguiadas pela cromatografia de camada delgada (CCD). Os resultados permitiram selecionar uma única fração, de um LPI obtido em uma única temperatura, para análise em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), avaliação de curva dose-resposta da atividade antimicrobiana, assim como avaliação por MEV.

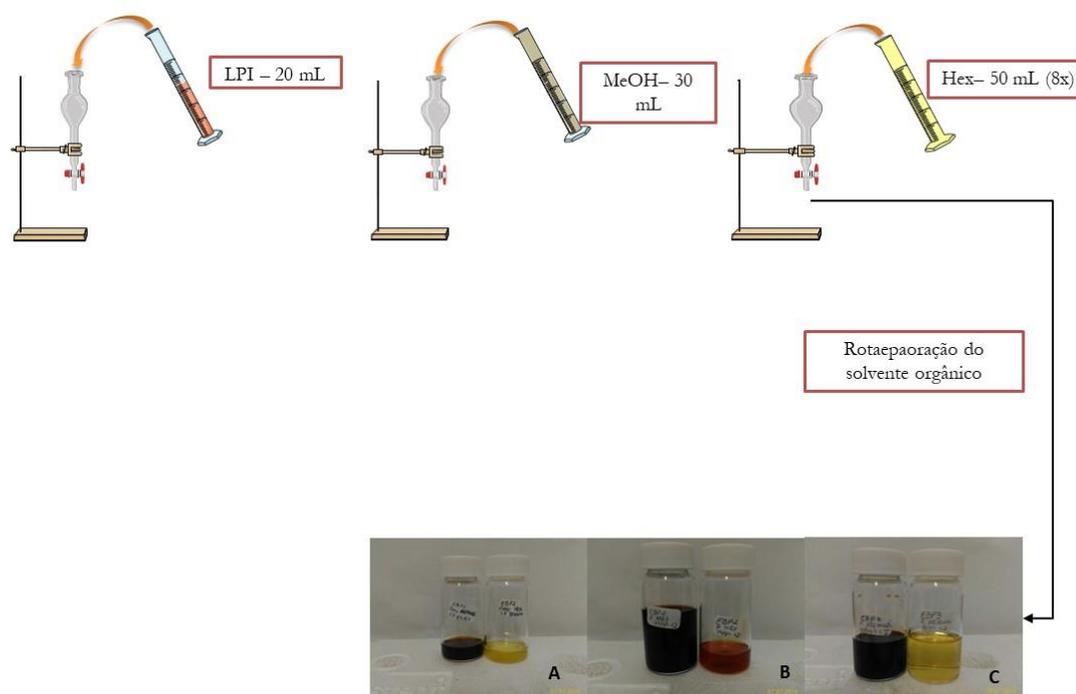


Figura 10. Fluxograma do fracionamento dos LPI250, LPI350 e LPI550 por partição líquido-líquido. **A:** Fração metanólica (LMeOH250) e hexânica (FHex250). **B:** Fração metanólica (LMeOH350) e hexânica (FHex350). **C:** Fração metanólica (LMeOH550) e hexânica (FHex550).

4.6. CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA

Todos os LPIs e as frações obtidas da partição líquido-líquido, nas três temperaturas de pirólise, foram submetidos inicialmente a cromatografia de camada delgada (CCD) em cromatofolhas de sílica gel com indicador de fluorescência (Macherey-Nagel), a fase móvel continha uma mistura de solventes absolutos (PA) metanol, diclorometano e hexano, em diferentes proporções, para melhor separação e visualização dos compostos químicos. Os spots (aplicação das amostras na placa de CCD) foram inspecionados em luz ultravioleta (254 a 365 nm), para visualização do perfil químico e monitoramento das frações obtidas. Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Química Orgânica de Produtos Naturais do Departamento de Ciências Exatas (ESALQ/USP) (DOS REIS, 2017).

Cada análise química realizada nas amostras foi monitorada através de bioensaio do perfil de atividade antimicrobiana, nas bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

4.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.7.1. Teste de Difusão de Disco

O teste de difusão em disco é reconhecido e aceito pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), pelo Food and Drug Administration (FDA) e pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2003; COLYE et al., 2005; OSTROSKY et al., 2008; WEINSTEIN et al., 2018). Todos os materiais utilizados nos testes foram autoclavados a 110 °C por 20 minutos. Duas linhagens *Escherichia coli* (ATCC 23282) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 35696) foram utilizadas para pesquisa no Laboratório de Microbiologia Aplicada, alocado no Laboratório de Química Orgânica de Produtos Naturais do Departamento de Ciências Exatas (ESALQ/USP). Primeiro, as bactérias foram reativadas de -80°C para temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$), e um volume de 50 μL , foi inoculado em meio de cultura, líquido Luria-Bertani (LB), a 37°C por 24 horas, em uma incubadora de agitação. Simultaneamente, o mesmo meio LB, contendo ágar, foi vertido em placas de Petri dentro da câmara de fluxo laminar. Em seguida, as placas foram alocadas em uma incubadora de demanda química de oxigênio (B.O.D.) a 37°C, por 24 horas. Após o período de incubação, 100 μL de cada bactéria foram inoculados por espalhamento nas placas de Petri, permanecendo incubadas por 15 minutos no ODI, para adesão e crescimento das bactérias.

4.7.1.1. Aplicação das Amostras de Licores Pirolenhosos Integrais

Para o ensaio de difusão em disco, um disco de papel padronizado (6,0 mm de diâmetro) impregnado com 0,01 mg de ampicilina (Cefar Diagnóstica Ltda), produzido de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo Clinical & Laboratorial Standards Institute (CLSI), foi utilizado como controle positivo. Amostras dos LPIs obtidos 250°C, 350°C e 550°C foram homogenizadas e, de cada solução, 0,5 μL (dose equivalente a 0,5 mg de licor pirolenhoso por disco) foi adicionado com uma pipeta volumétrica em discos de papel (6,0 mm de diâmetro) nas placas de Petri previamente inoculadas com as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, no interior capela de fluxo laminar para evitar contaminação e possível contágio. As placas de Petri foram então colocadas na B.O.D., à 37°C por 24 horas (figura 11).

Após este intervalo de tempo o experimento foi encerrado e a ausência de crescimento radial de bactérias ao redor dos discos de papel foi aferida, usando duas medidas

perpendiculares do diâmetro de halo de inibição, com o auxílio de um paquímetro eletrônico (Mitutoyo) (JANKOWSKY et al., 2018).

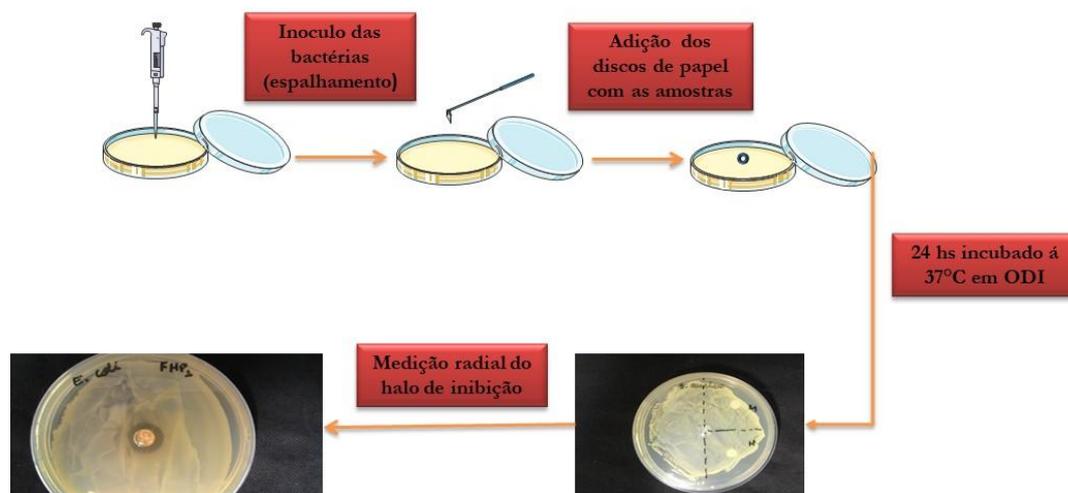


Figura 11. Fluxograma do teste de difusão de disco para avaliação da atividade antimicrobiana das amostras.

4.7.2. Aplicação das Frações Metanólicas e Hexânicas obtidas dos Licores Pirolenhosos Integrais

Amostras das frações metanólicas e hexânicas foram diluídas em metanol e hexano, respectivamente, na concentração de 0,25 mg/ μ L. De cada solução, 0,5 μ L foi adicionado com uma pipeta volumétrica em discos de papel (6,0 mm de diâmetro), dentro do fluxo laminar, resultando em uma dose de 0,125 mg por disco. Por esse motivo discos de papel impregnados com metanol e hexano foram introduzidos no experimento como controles negativos, sendo que todos os discos de papel (amostras e controles negativos) foram submetidos a aquecimento ao redor de um bico de Bunsen, em um raio de 10 cm, para garantir a esterilidade. Os discos de papel impregnados com as amostras foram introduzidos nas placas de Petri previamente inoculadas com as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Na sequência, as placas de Petri permaneceram no B.O.D., à 37°C por 24 horas.

Após este intervalo de tempo o ensaio foi considerado encerrado e o halo de crescimento radial de bactérias ao redor dos discos de papel foi quantificado, conforme descrito em 4.7.1.

4.8. ENSAIOS CONDUZIDOS COM A FRAÇÃO FMeOH350

De acordo com a metodologia inicialmente proposta, e com base nos resultados obtidos nos ensaios anteriores, a fração metanólica obtida na pirólise a 350°C (FMeOH350) foi submetida a ensaios mais detalhados.

4.8.1. Avaliação da curva dose-resposta

Para avaliação da curva dose-resposta da LMeOH350, amostras dessa fração foram diluídas e homogêneas em metanol em quatro diferentes concentrações (0,25, 1,0, 1,5 e 2,0 mg/μL). De cada solução, 0,5 μL foi adicionado com uma pipeta volumétrica em discos de papel (6,0 mm de diâmetro) dentro do fluxo laminar. Após a evaporação do solvente, as amostras de disco impregnadas com concentrações de 0,25, 1,0, 1,5 e 2,0 mg/μL continham doses de 0,125, 0,500, 0,750 e 1,000 mg de LMeOH350 por disco, respectivamente. O restante do experimento foi conduzido seguindo a metodologia já descrita em 4.7.1 e 4.7.2.

4.8.2. Análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

A fração LMeOH350 foi analisada por espectrômetro de massas quadrupolo CG/EMS com modelo linear modelo 5975C (Agilent) equipado com um injetor a 280 °C, coluna de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e espessura de filme de 0,25 μm (Stabilwax). O programa da temperatura do forno GC foi mantido a 62°C durante 6 min e depois aumentado para 110°C a uma taxa de 10°C/min e finalmente a 215°C a uma taxa de 3°C/min, permanecendo nessa temperatura durante 15 minutos até a inserção da amostra. Os outros parâmetros de CG/EM empregados foram temperatura de injeção e fonte de íons de 280°C, gás transportador hélio a 1,0 mL/min, volume de injeção de 1,0 μL, razão de divisão de 50:1, energia de fonte iônica de 70 eV, e gama de massa de m/z 33-550 Da (THEAPPARAT et al., 2015).

4.8.3. Microscopia eletrônica de varredura

Ao final do ensaio de difusão em disco foram coletadas amostras de cada uma das placas da fração LMeOH350, inoculadas em fixador de Karnovsky e armazenadas a 4 °C. O sedimento celular de cada uma das bactérias a ser analisado foi homogêneo no fixador de Karnovsky e 5,0 μL foram adicionados a uma grade de vidro coberta com ε-poli-lisina por 15 minutos, seguido por uma sequência de desidratação em etanol absoluto em diversas concentrações [30, 50, 70, 90 e 100% (3 vezes)] durante 10 minutos em cada fase. Logo depois, eles foram secos até o ponto crítico usando CO² líquido e, posteriormente, colados em stubs para metalização com ouro. As amostras foram então analisadas por microscopia

eletrônica de varredura (MEV, modelo LEO 435VP, Zeiss, Alemanha) para obter imagens salvas no formato TIFF para análise, conforme figura 12 (PETENÁ et al., 2016).

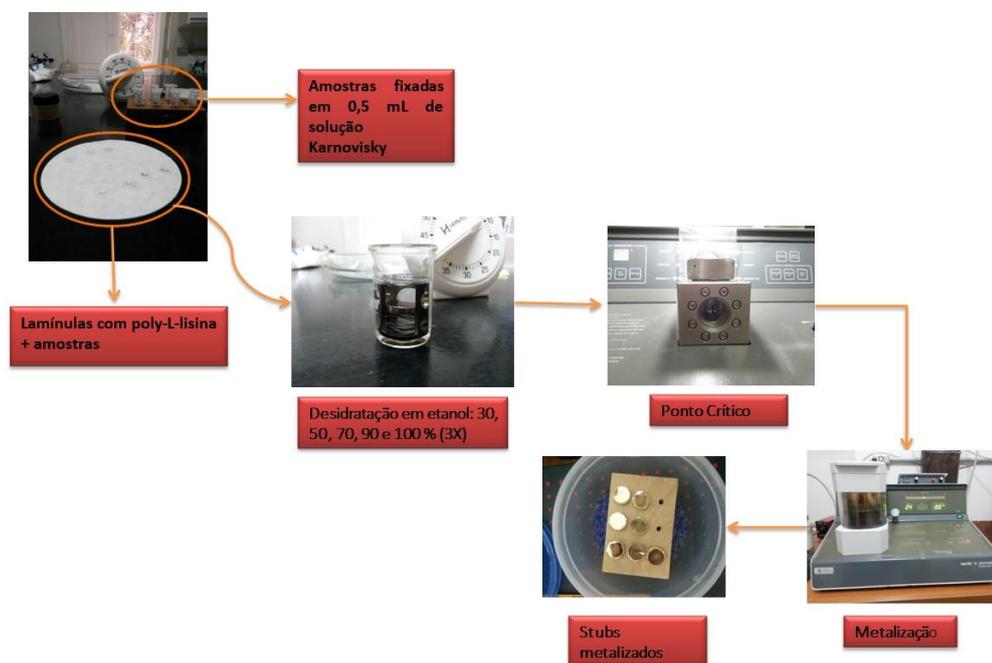


Figura 12. Fluxograma do preparo das amostras da fração metanólica LMeOH350 para leitura em microscópio eletrônico de varredura.

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos rendimentos obtidos no processo de pirólise seguiu um delineamento casualizado com 3 repetições, sendo que o mesmo delineamento foi adotado para analisar o poder calorífico e o teor de cinzas do material pirolisado, porém com 5 repetições

Os resultados da atividade microbiana dos licores pirolenhosos e das suas respectivas frações metanólicas e hexânicas foram analisados individualmente para as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, seguindo um delineamento fatorial 3 x 3 (produto x temperatura), com 4 repetições. Para a análise dos resultados da curva dose-resposta da fração LMeOH350 também foi adotado um delineamento fatorial, 2 x 5 (bactéria x concentração) com 4 repetições.

Em cada ensaio foi aplicada a ANOVA aos resultados totais e o teste de Tukey foi usado para comparar as médias. A relação entre o diâmetro do halo de inibição e a temperatura ou a dose da FMeOH350 foi analisada por regressão linear.

O programa utilizado para os cálculos estatísticos foi o Microsoft Excel.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. TEOR DE UMIDADE DAS PARTÍCULAS DE *Dendrocalamus asper* (Schult & Schult)

Backer

É importante manter o teor de umidade das partículas de bambu próximas a 0% para evitar a degradação biológica e a consequente contaminação do material. Pela mesma razão é necessário aferir constantemente, durante toda a fase experimental, esse teor de umidade.

Os dois métodos disponíveis para a quantificação do teor de umidade, descritos no item 4.2, foram comparados entre si, e os resultados dessa comparação constam da tabela 2.

Tabela 2. Dados comparativos do teor de umidade (%), medido pelos métodos gravimétrico (secagem a 103°C) e secagem em balança ID200.

Amostras	Gravimétrico 103°C/24h	Balança ID200 103°C/10min
Amostra 1	6,5	6,7
Amostra 2	6,8	6,4
Amostra 3	6,2	6,6
Média	6,5 ^a	6,7 ^a
Desvio Padrão	0,29	0,15

Médias com a mesma letra minúscula no sentido horizontal não diferem entre si, Teste Tukey, p < 0.01

O método gravimétrico é considerado como padrão, porém os resultados obtidos com a balança ID200 são equivalentes. Assim, decidiu-se, pela rapidez do método, padronizar as medições de umidade antes das pirólises, utilizando a balança ID200.

5.2. RENDIMENTO DAS PIRÓLISES E CARACTERÍSTICAS DOS LICORES PIROLENHOSOS INTEGRAIS

A cada pirólise realizada foi medido o teor de umidade (%) das partículas de bambu, para que padrões metodológicos fossem padronizados e, desta forma, garantir a qualidade e reprodutibilidade do licor pirolenhoso resultante do processo, seguindo as recomendações de Campos (2007).

Os licores coletados de *D. asper* apresentaram as características descritas na tabela 3, demonstrando uma diferença entre suas características organolépticas, perceptíveis conforme ao aumento da temperatura e, conseqüentemente, a queimas dos constituintes lignocelulósicos. Cada etapa da pirólise está associada a uma determinada faixa de

temperatura, produzindo um licor pirolenhoso de diferente composição química e com maior ou menor conteúdo de alcatrão. (BRITO, 1990; BRITO; TOMAZELLO FILHO; SALGADO, 1987; MENA, 2014)..

Tabela 3. Característica organolépticas dos licores pirolenhosos obtidos nas temperaturas de 250°C, 350°C e 550°C.

Temperatura da Pirólise (°C)	Cor	Odor	Presença de Alcatrão
250	Arroxeadada tendendo para o vermelho	Churrasco	Pouco
350	Avermelhada	Churrasco	Intermediária
550	Vermelha tendendo para o marrom	Churrasco	Intensa

Tabela 4. Tabela de rendimentos das pirólises do bambu *D. asper*.

TEMPERATURA (°C)	UMIDADE DAS PARTÍCULAS (%)	LICOR PIROLENHOSO RECUPERADO (mL)	RENDIMENTO (% em massa)		PERDAS DE PROCESSO [P] (% em massa)
			LICOR PIROLENHOSO [RPL]	BAMBU PIROLISADO [RBP]	
250	1,00	20,50	9,38 ^a	85,70 ^a	4,92 ^a
350	1,30	80,00	36,15 ^b	45,93 ^b	17,92 ^b
550	1,27	126,00	44,50 ^c	33,12 ^c	22,38 ^c

Médias com a mesma letra minúscula no sentido vertical não diferem entre si, Teste Tukey, $p < 0.01$

ANOVA RPL (2, 6); $F = 181,56$, $p < 0.01$

ANOVA RPB (2, 6); $F = 618,47$, $p < 0.01$

ANOVA P (2, 6); $F = 259,62$, $p < 0.01$

A tabela 4 apresenta os rendimentos obtidos nas pirólises, para as três temperaturas sob estudo. É apresentado também um resumo da análise estatística, sendo que as respectivas ANOVAs são detalhadas no Apêndice D.

Na pirólise lenta realizada a 250°C foi obtido 9,38% e 85,70% de RPL e RPB, respectivamente. Nesta faixa de temperatura, o LP é oriundo principalmente da degradação das hemiceluloses, portanto os volumes recuperados do licor são relativamente pequenos, e com elevado rendimento do bambu pirolisado. Ao alterar a faixa de temperatura, percebe-se que a relação entre os rendimentos de RPL e de RPB inicia uma inversão em seus valores, nitidamente visível na figura 13. A 350°C os rendimentos obtidos foram de 36,15% e 45,93%, e em 550°C foram de 44,50% e 33,12%, para RPL e RPB, respectivamente. Estes dados são

condizentes com estudos anteriores conduzidos com diferentes espécies de bambu e *Eucalypto* (BRITO; TOMAZELLO FILHO; SALGADO, 1987).

Estes valores são coerentes com a relação do aumento da temperatura e as diferentes estruturas químicas a serem degradadas, aumentando desta maneira o rendimento do licor pirolenhoso recuperado e, conseqüentemente, reduzindo o rendimento do bambu pirolisado. De acordo com a literatura, na faixa de 350°C há a degradação da hemicelulose, celulose e o início de algumas das estruturas de lignina. Acima desta temperatura a degradação é principalmente da lignina. Contudo, entre as diversas biomassas lignocelulósicas, cuja composição nominal não difere umas das outras, a composição química do LPI e as características do carvão vegetal diferem entre si. Este fato é devido as diferenças de compostos químicos e quantidades destes em cada diferente biomassa lignocelulósicas, mesmo sendo classificadas como hemicelulose, celulose e lignina, sem excluir outros compostos presentes e característicos de cada espécie (MARINHO et al., 2012; QUEIROZ; FERREIRA; RAMBO, 2013; RAMBO et al., 2015).

Analisando visualmente os licores pirolenhosos obtidos nas três diferentes temperaturas ficou visível a influência destas na formação do alcatrão, solúvel e insolúvel. O LPI250 apresentou maior fração aquosa e menor precipitação do alcatrão, e com o aumento na temperatura da pirólise verificou-se também o aumento no conteúdo de alcatrão presente no LP. Este comportamento era esperado, visto que a formação do alcatrão ocorre principalmente pela quebra das estruturas químicas complexas presentes na lignina (LEPAGE et al., 1986).

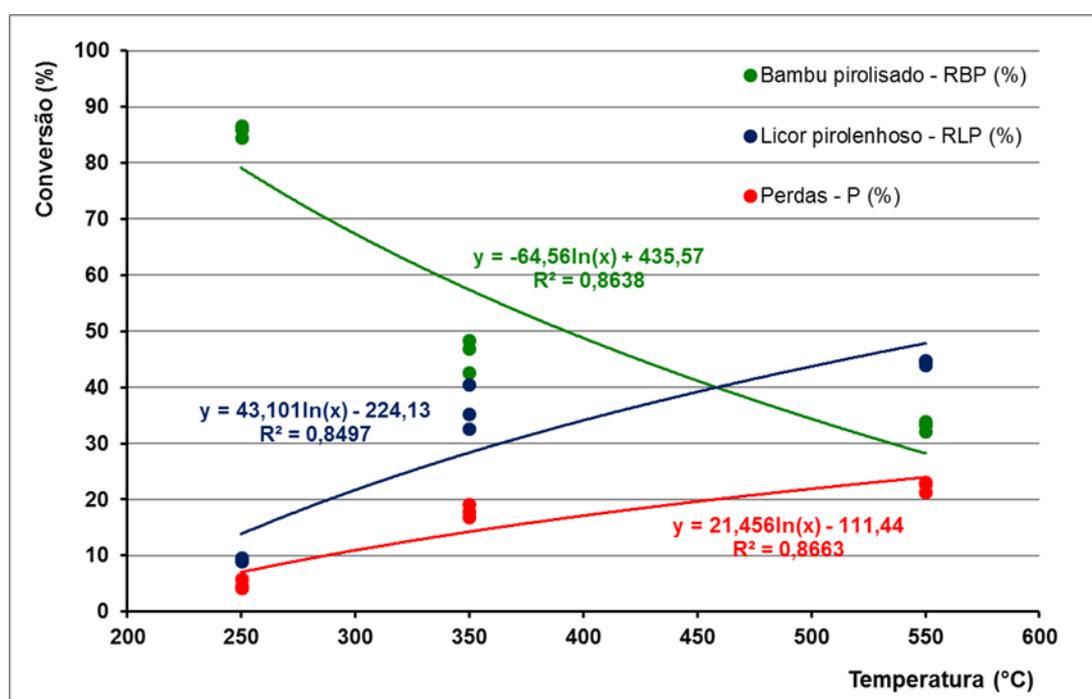


Figura 13. Relação entre a conversão (%) com as diferentes temperaturas (°C) de pirólise lenta da biomassa do bambu *D. asper*.

A figura 13, que apresenta a análise de regressão entre os rendimentos e as temperaturas, comprova que quanto maior a temperatura menor o RBP e maior o RLP; resultados condizentes com as informações da literatura. Adicionalmente, é importante destacar que os licores pirolenhosos integrais apresentam diferenciações organolépticas conforme a temperatura empregada para obtê-los; decorrentes do aumento no conteúdo de alcatrão presente no licor condensado.

Finalizando a análise do processo de pirólise, a tabela 5 mostra o poder calorífico e o teor de cinzas do bambu pirolisado.

Tabela 5. Poder calorífico e teor de cinzas do bambu *D. asper* pirolisado a temperaturas de 250°C, 350°C e 550°C.

TEMPERATURA (°C)	TEOR DE CINZAS (%)	PODER CALORÍFICO (KJ/Kg)
250	1,68 ^a	25.009 ^a
350	2,86 ^b	28.107 ^a
550	5,32 ^c	26.873 ^a

Médias com a mesma letra minúscula no sentido vertical não diferem entre si, Teste Tukey, $p < 0.05$
ANOVA Teor de cinzas (2, 13); $F = 82,37$, $p < 0.01$
ANOVA Poder calorífico (2, 13); $F = 1,15$, $p > 0.05$ (não significativo)

Os resultados da tabela 5 são coerentes com as informações divulgadas por outros pesquisadores. BRITO e cols. (1987), trabalhando com o carvão de cinco espécies de bambu, pirolisados a 550°C; relatam poder calorífico variando de 27.193 a 36.390 KJ/Kg, e com teor de cinzas na faixa de 3,0% a 12,3%. Especificamente para o carvão da espécie *Dendrocalamus asper*, pirolisado a 450°C, é registrado um poder calorífico de 27.820 KJ/Kg e com 1,9% de cinzas (SANTOS et al., 2016).

Verifica-se na tabela 5 que o poder calorífico não varia em função do aumento na temperatura de carbonização; fato que era esperado, visto que a pirólise é um processo que concentra o conteúdo de carbono no carvão.

Na medida em que aumenta a temperatura da pirólise tem-se maior degradação dos componentes orgânicos da madeira, reduzindo a massa do carvão a ser obtida ao final do processo. Como a quantidade absoluta dos componentes não orgânicos não se altera, é esperado um aumento proporcional no teor de cinzas como resultado do aumento na temperatura.

Assim, é possível afirmar que as pirólises foram adequadamente conduzidas, e que o carvão obtido apresenta características energéticas similares às de outros carvões obtidos a partir de diferentes espécies de bambu.

5.3. CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA E FRACIONAMENTO LÍQUIDO-LÍQUIDO DOS LICORES PIROLENHOSOS BRUTOS

Os LPIs, nas três diferentes temperaturas, apresentaram como característica comum alto teor de água, contudo, conforme a elevação da temperatura da pirólise, o teor de alcatrão igualmente aumentava.

Com o conhecimento prévio da complexidade de compostos encontrados nos licores pirolenhosos integrais oriundos de biomassas lignocelulósicas, obtidos pela revisão bibliográfica, optou-se um fracionamento líquido-líquido; o qual foi realizado com solventes orgânicos de diferentes polaridades, como o metanol (polar) e o hexano (apolar), com o propósito de separar os compostos químicos de acordo com a finidade destes pelos solventes. Todos os compostos químicos contêm, majoritariamente, carbono (C), hidrogênio (H) e oxigênio (O); contudo outros elementos são encontrados em algumas estruturas orgânicas, como nitrogênio, flúor, cloro, bromo, iodo e sulfato (O, N, F, Cl, Br, I e S). As ligações químicas entre esses elementos conferem característica polar, apolar ou ainda de média polaridade, baseado na eletronegatividade entre estes (NELSON; COX, 2002).

A eletronegatividade se refere a capacidade que um átomo tem de atrair para si o par eletrônico que ele compartilha com outro átomo em uma ligação covalente. Compostos químicos contendo carbono e hidrogênio não apresentam eletronegatividade entre si, portanto os compostos ricos nesses elementos químicos são considerados apolares. Contudo os demais elementos químicos citados são mais eletronegativos que o carbono e hidrogênio, portanto são polares (NELSON; COX, 2002).

A polaridade influencia diretamente na solubilidade dos compostos orgânicos. É correto associar que compostos polares são solúveis em água e compostos apolares são solúveis em óleo. Num processo de extração química a solubilidade define que compostos serão removidos de uma matriz, como os licores pirolenhosos integrais, devido a uma maior afinidade pelo solvente orgânico do que pela matriz.

Considerando o princípio de separação por afinidade com os solventes extratores, foi realizada um fracionamento líquido-líquido, com metanol e hexano, dando origem as frações FMeOH250 e FHex250, FMeOH350 e FHex350, FMeOH550 e FHex550; conforme figura 14. Os licores pirolenhosos brutos LPI250, LPI350 e LPI550 encontravam-se armazenados em geladeira a 4°C, portanto, para quaisquer procedimentos relativos os perfis e separações químicas, assim como os testes de atividades biológicas, eram removidos e deixados em temperatura ambiente ($\pm 30^{\circ}\text{C}$) por 1 hora. Este procedimento foi adotado devido as características dos LPIs e igualmente de suas frações, visando evitar degradação dos compostos químicos, que até o momento eram desconhecidos.

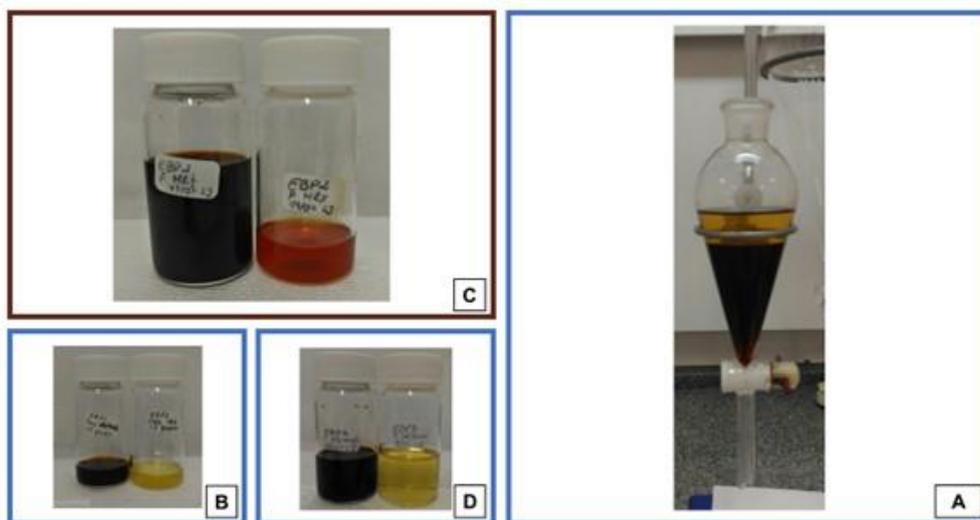


Figura 14. Separação líquido-líquido realizada para cada LPI. **A:** Funil de separação contendo metanol e hexano. **B:** Frações FMeOH250 e FHex250. **C:** FMeOH350 e FHex350. **D:** FMeOH550 e FHex550.

A figura 14 apresenta as frações metanólica e hexânica de cada LPI ainda em seus respectivos solventes extratores. Para evitar degradação dos compostos químicos estes solventes foram rotaevaporados á vácuo, em temperatura de 60°C, para posterior armazenamento em geladeira (4°C).

A cromatografia de camada delgada é uma metodologia de separação cromatográfica no qual uma amostra é aplicada em uma placa contendo sílica (fase estacionária). A placa com as amostras é introduzida em um recipiente de vidro contendo o solvente, ou mistura de solventes em diferentes polaridades (fase móvel), e pela eluição do solvente através da placa ocorre a separação dos compostos químicos, através do processo de adsorção. A placa é removida da cuba após os solventes eluírem até um limite pré-determinado, de aproximadamente 0,5 cm do final da placa. Os compostos químicos mais apolares eluem mais facilmente, pois não apresentam afinidade com a fase estacionária, ao contrário dos compostos polares. Os compostos com polaridade intermediária ficam adsorvidos no centro da placa. Este é um método rápido, confiável e reproduzível para monitoramento da separação química («Cromatografia de Camada Delgada - CCD», 2013; FERREIRA; SARAIVA; PEDROSO, 2018; LINI et al., 2014).

A Figura 15 ilustra a separação por CCD dos LPIs e suas respectivas frações.

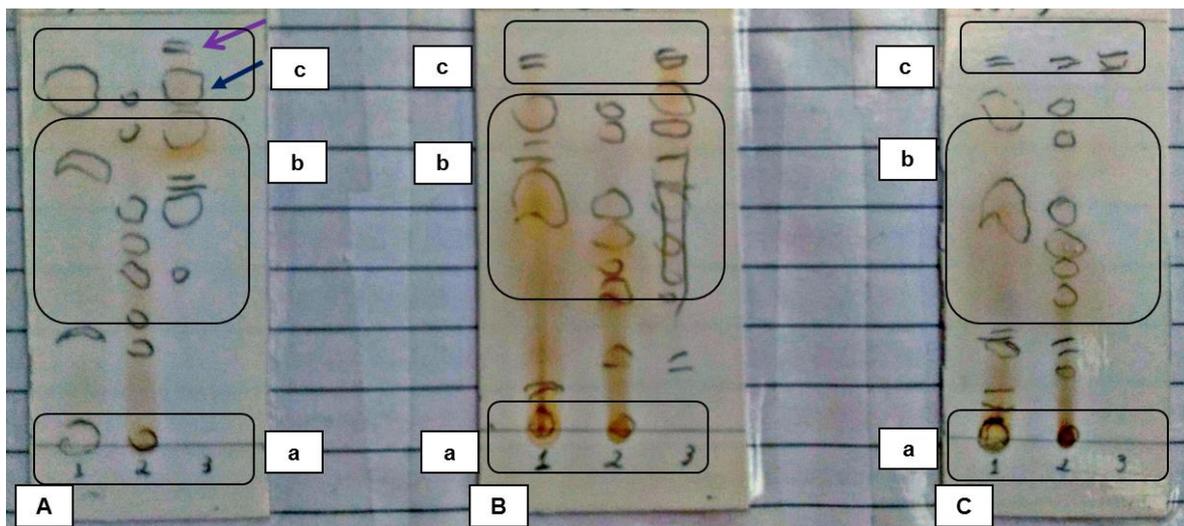


Figura 15. Cromatografia de camada delgada, eluída em metanol/diclorometano/hexano (½:8:½). Seta azul escura: compostos químicos visíveis a 254 nm. Seta aberta roxa: compostos químicos visíveis a 365 nm. **A:** Aplicação de (1) LPI250, (2) FMeOH250 e (3) FHex250. **B:** Aplicação de (1) LPI350, (2) FMeOH350 e (3) FHex350. **C:** Aplicação de (1) LPI550, (2) FMeOH550 e (3) FHex550. As legendas Aa, Ba e Ca representam região da aplicação da amostra, muito polar. As legendas Ab, Bb e Cb representam região de polaridade intermediária. As legendas Ac, Bc e Cc representam região apolar.

O método de revelação empregado foi físico, com luz ultravioleta nas faixas de 254 e 365 nm, indicados pelas setas na figura 15. Nesta figura é possível verificar as diferenças e semelhanças de compostos químicos, ou grupos de compostos químicos, presentes nos LPIs e suas frações, nas três diferentes temperaturas.

O LPI250 e a fração FMeOH250 apresentam compostos químicos muito polares, visíveis pela permanência da amostra no ponto de aplicação da placa de CCD (figura 15Aa). Compostos de polaridade alta a intermediária são observados no centro da placa (figura 15Ab), destacando que o fracionamento permitiu a separação e concentração de compostos, conforme os círculos e retas visíveis nesta região. Os compostos mais apolares encontram-se no final da placa de CCD (figura 15Ac).

Para o LPI350, LPI550 e suas respectivas frações, FMeOH350 e FMeOH550, há a presença de compostos muito polares, cuja adsorção é forte para não permitir seu deslocamento pela placa de cromatografia (figura 15Ba e Ca). De maneira semelhante a Figura 15A, o fracionamento dos licores pirolenhosos integrais a 350°C e 550°C permitiu uma melhor separação e concentração dos compostos químicos, evidenciados na figura 15B e C. A fração FHex350 apresenta um perfil no qual é possível verificar compostos na região de polaridade intermediária e apolar (figura 15Bb e Cc), no entanto, a fração FHex550 concentra somente compostos apolares (figura 15Cc). Pela análise visual as frações FMeOH350 e FMeOH550 apresentam uma maior complexidade de compostos químicos, com diferentes polaridades (figura 15B e C).

A observação das características organolépticas das frações, após rotaevaporação à vácuo, é semelhante. Todas apresentam grande viscosidade, dificultando as pesagens das doses para os testes de atividade antimicrobiana; cheiro característico e coloração avermelhada após evaporação dos solventes empregados no fracionamento. Ao considerar tais características, similares entre os LPIs e suas frações, fica evidente dois fatores que permitem diferenciar as amostras analisadas: perfil químico, fornecido pela CCD e, perfil de atividade biológica, fornecido pelo teste de difusão de disco.

A complexidade química dos licores pirolenhosos integrais, encontrados na análise de CCD, evidencia a presença compostos químicos polares, apolares e de polaridade intermediária. Ao realizar o fracionamento com solventes de polaridades opostas, ocorreu a separação dos compostos químicos presentes nos LPIs, de acordo com a atração pela polaridade destes com os solventes orgânicos, conforme descrito na figura 15.

As análises das CCDs e o perfil de atividade biológica permitiram selecionar uma única fração, de uma única temperatura, para aprofundamento dos estudos químicos e biológicos.

5.4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS LICORES PIROLENHOSOS E DAS RESPECTIVAS FRAÇÕES METANÓLICAS E HEXÂNICAS

Os valores médios da inibição de halos mensurados nos ensaios de difusão em disco, para os licores pirolenhosos integrais (LPIs) e suas respectivas frações metanólica (FMeOH) e hexânica (FHex), constam da tabela 6 para a *E. coli* e da tabela 7 para a *S. aureus*.

Tabela 6. Médias dos diâmetros do halo de inibição, em mm, obtidos no ensaio de difusão em disco com *E. coli*, para os licores pirolenhosos integrais (LPIs) e suas respectivas frações metanólica (FMeOH) e hexânica (FHex).

PRODUTOS	TEMPERATURA (°c)		
	250	350	550
LPI	6,8 ^{A a}	13,01 ^{A b}	13,67 ^{A b}
FMeOH	8,88 ^{A a}	14,68 ^{A b}	14,66 ^{A b}
FHex	4,73 ^{A a}	12,01 ^{A b}	0,33 ^{B a}

Médias com a mesma letra maiúscula no sentido vertical não diferem entre si, Teste Tukey, $p < 0.05$
Médias com a mesma letra minúscula no sentido horizontal não diferem entre si, Teste Tukey, $p < 0.01$
ANOVA Produtos (2, 31); $F = 21,84$, $p < 0.01$
ANOVA Temperaturas (2, 31); $F = 16,62$, $p < 0.01$

Tabela 7. Médias dos diâmetros do halo de inibição, em mm, obtidos no ensaio de difusão em disco com *S. aureus*, para os licores pirolenhos integrais (LPIs) e suas respectivas frações metanólica (FMeOH) e hexânica (FHex).

PRODUTOS	TEMPERATURA (°c)		
	250	350	550
LPI	0,34 A a	6,9 A b	4,12 A ab
FMeOH	8,16 B a	11,37 B ab	14,83 B b
FHex	9,90 B a	9,21 AB a	4,41 A b

Médias com a mesma letra maiúscula no sentido vertical não diferem entre si, Teste Tukey, $p < 0.05$
Médias com a mesma letra minúscula no sentido horizontal não diferem entre si, Teste Tukey, $p < 0.05$
ANOVA Produtos (2, 31); $F = 28,38$, $p < 0.01$
ANOVA Temperaturas (2, 31); $F = 4,46$, $p < 0.05$

A relação entre a atividade antimicrobiana (halo de inibição) e a temperatura da pirólise, em relação às bactérias *E. coli* e *S. aureus*, é apresentada nas figuras 16, 17 e 18; respectivamente para o licor pirolenhoso integral (LPI) e suas frações metanólicas (FMeOH) e hexânicas (FHex).

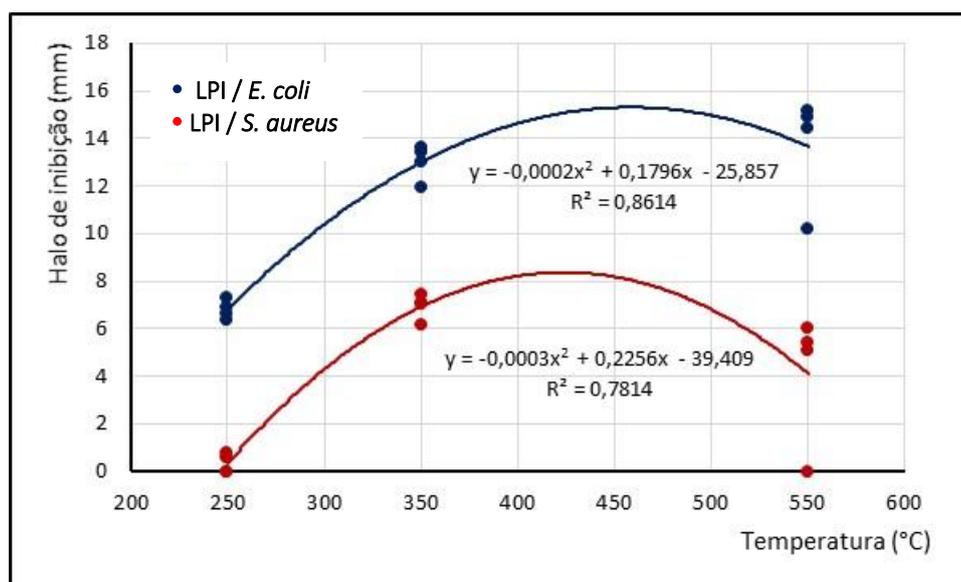


Figura 16. Relação da atividade antimicrobiana (halo de inibição) dos licores pirolenhos integrais (LPI) em relação as bactérias *E. coli* e *S. aureus* e em função da temperatura da pirólise.

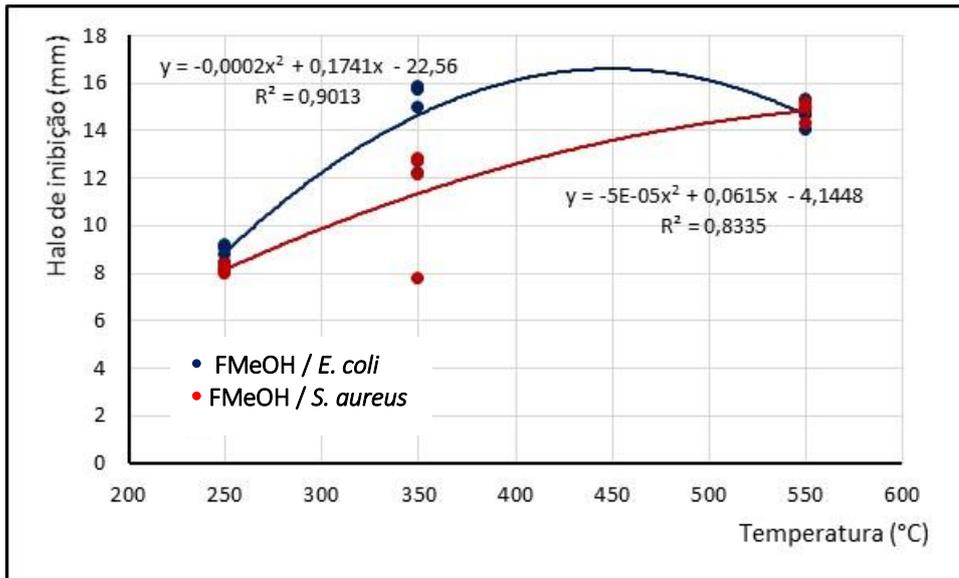


Figura 17. Relação da atividade antimicrobiana (halo de inibição) da fração metanólica dos licores pirolenhos (FMeOH) em relação às bactérias *E. coli* e *S. aureus* e em função da temperatura da pirólise.

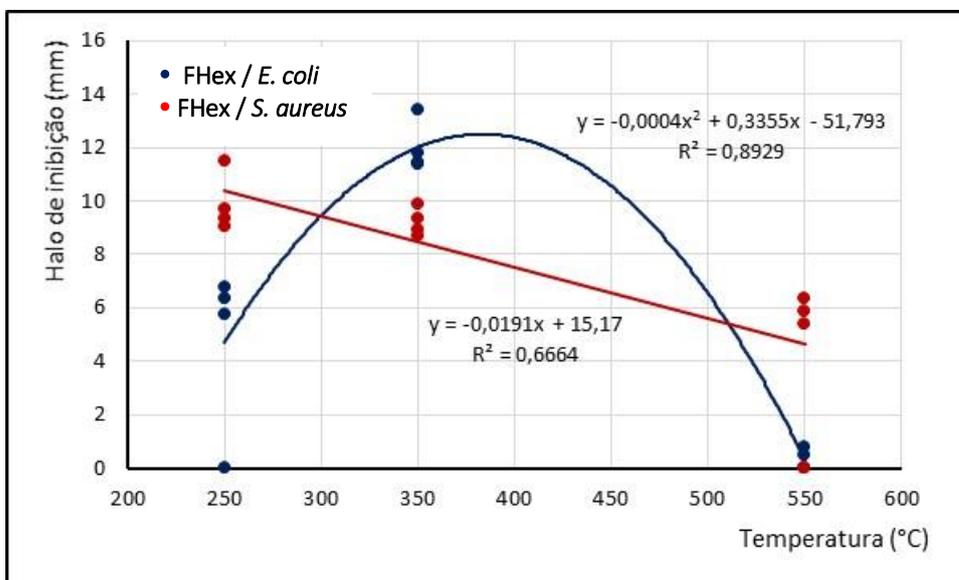


Figura 18. Relação da atividade antimicrobiana (halo de inibição) da fração hexânica dos licores pirolenhos (FHex) em relação às bactérias *E. coli* e *S. aureus* e em função da temperatura da pirólise.

Analisando os resultados da tabela 6 observa-se que os licores pirolenhos e suas frações apresentam comportamento similar, em relação a bactéria *E. coli*, quando obtidos nas temperaturas de 250°C e 350°C; mas que a fração hexânica perde sua eficiência antimicrobiana quando proveniente da pirólise a 550°C. Resultado similar (perda da eficiência antimicrobiana) também é observado em relação à bactéria *S. aureus* (tabela 7).

Esse comportamento é facilmente visualizado nas figuras 16 a 18. Para os três produtos avaliados, com exceção da fração metanólica em relação a *S. aureus*, tem-se uma

tendência de redução na atividade microbiana quando a temperatura da pirólise passa de 350°C para 550°C.

Na pirólise a 550°C ocorre uma degradação maior da lignina presente no material lignocelulósico, ocorrendo também a liberação de alcatrão; o qual será recuperado junto com o licor pirolenhoso, podendo ser comprovado pelas alterações nas características organolépticas do licor. O alcatrão em si possui compostos orgânicos mais complexos, muitos dos quais possuem atividade antifúngica (LEPAGE et al., 1986), mas cujos efeitos em relação a outros microrganismos e ao ser humano ainda não são conhecidos.

Adicionalmente deve-se considerar que compostos presentes no licor pirolenhoso obtido a 350°C também podem sofrer alterações em suas moléculas quando expostos a temperatura de 550°C, alterando a composição química do licor recuperado e, conseqüentemente, a sua eficiência antimicrobiana.

Da análise dos resultados obtidos neste ensaio conclui-se que a fração metanólica do licor pirolenhoso recuperado na pirólise a 350°C (FMeOH350) apresentou, comparativamente, maior atividade antimicrobiana e um comportamento mais consistente em relação às duas bactérias utilizadas no ensaio.

Considerando também o rendimento obtido na pirólise, o perfil de separação química observado na CCD, e o menor conteúdo de alcatrão no recuperado decidiu-se utilizar apenas a FMeOH350 para os demais ensaios.

5.5. ANÁLISE DE CG/EM, MEV E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA FRAÇÃO METANÓLICA DO LICOR PIROLENHOSO OBTIDO A 350°C

A partir dos dados obtidos dos três LPIs e suas respectivas frações, a fração metanólica obtida a 350°C foi selecionada para estudos mais aprofundados com relação a sua composição química e perfil de atividade antimicrobiana, para as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, empregando método de análise de imagem por MEV.

5.5.1. Análise por CG/EM

Os resultados obtidos pelo CG/EM foram expressos de acordo com os seguintes parâmetros: tempo de retenção (t_R) de cada composto químico do cromatograma (expresso em minutos), porcentagem normalizada da área (A%), que indica a distribuição relativa dos compostos da amostra, e a análise qualitativa (QA, cujo escore variou de 0 a 100). Os compostos identificados por estes parâmetros foram analisados por bancos de dados de espectros de massa que refletem a similaridade do espectro de massa obtido com aqueles registrados nas bibliotecas utilizadas e considerando como limite para identificação de

compostos uma pontuação igual ou superior a 70. Estas análises foram realizadas pela Central Analítica (Instituto de Química/UNICAMP), o relatório final encontra-se no Apêndice A, e os espectros de massas no Apêndice B.

O fracionamento líquido-líquido foi realizado com os solventes orgânicos metanol e hexano. O metanol é um solvente polar que extrai compostos por afinidade a sua característica hidrofílica e, desta maneira, originou uma fração com compostos de alta e média polaridade, a FMeOH2. O hexano, devido às suas características apolares, extrai compostos com semelhante polaridade. Utilizando desse fracionamento, os compostos mais tóxicos, como o alcatrão insolúvel e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), são excluídos da fração metanólica.

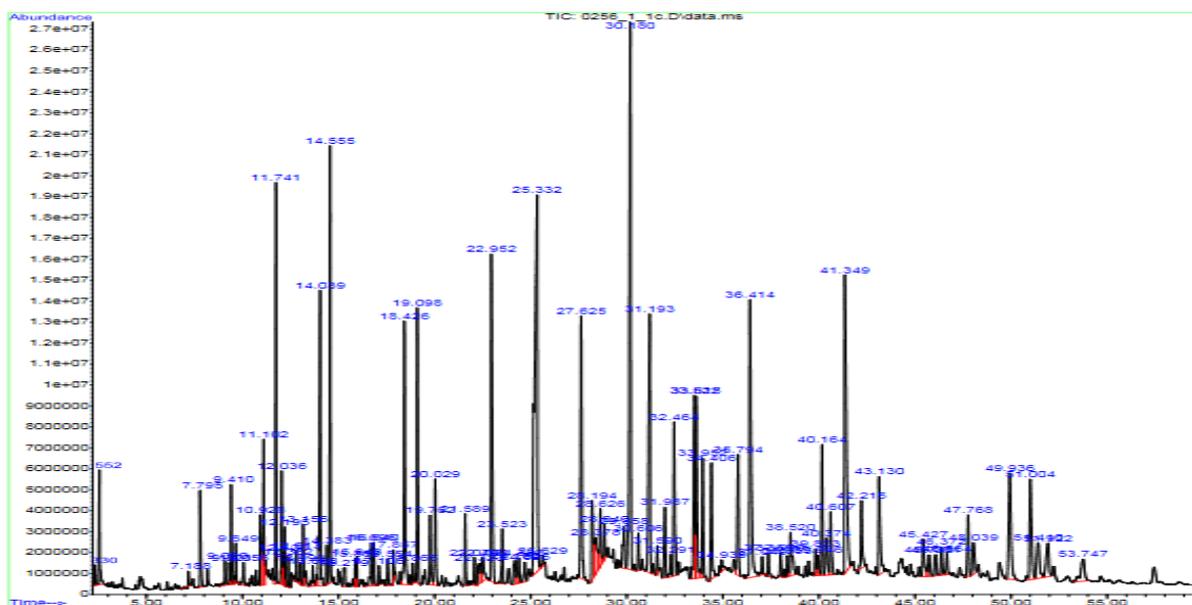


Figura 19. Cromatograma dos compostos químicos identificados através da análise por CG/EM da FMeOH2 do bambu *D. asper*.

O cromatograma (figura 19) mostra todos os 92 compostos químicos identificados por meio da absorbância da fração metanólica; incluindo compostos fenólicos, cetonas, aldeídos e lactonas, entre outros. Alguns estudos avaliam a composição química por CG/EM, variando o método de extração (pirólise ou extração química) e o tipo de biomassa, proporcionando uma análise comparativa dos compostos químicos, identificados qualitativa ou quantitativamente; mesmo sendo resultados obtidos em condições diferentes das realizadas neste trabalho. A tabela 8 apresenta compostos químicos presentes em diferentes espécies de bambu, incluindo o *D. asper*, e os compostos cuja análise qualitativa indicam possível presença na fração FMeOH350.

Tabela 8. Compostos químicos presentes em diferentes espécies de bambu, incluindo o *D. asper*, e os compostos cuja análise qualitativa indicam possível presença na fração FMeOH350.

COMPOSTOS QUÍMICOS	COMPOSTOS QUÍMICOS FMeOH2
2-metoxifenol ¹	Ácido acético
3- ou 4-etilfenol ¹	Catecol
4-metoxifenol ¹	Creosol
2-metoxi-4-propilfenol ¹	Dimetoxi Fenol
4'-hidroxiacetofenona ¹	Dimetoxiofenol
Etanona-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil) ¹	Etil catecol
3-metilcatecol ⁵	Etil Metoxi Fenol
4-metilcatecol ⁵	Etilfenol
3-etilcatecol ⁵	Fenol
Ácido propanoico ⁷	Hidroquinona
Ácido butanóico ⁷	Maltol
Creosol ⁷	Metil Benzenediol
Vanilina ⁷	Metoxifenol
Siringol ⁷	Trans Isoeugenol
4-metil-2-metoxifenol ^{2,4,2}	Vanilina
1,2,3-metoxibenzeno ¹	
2,3,5-trimetilfenol ¹	
2,3-dimetilfenol ^{1,24,6}	
2-metilfenol ^{1,2,4,6}	
3- ou 4-metilfenol ^{1,2,4,6}	
2,6-dimetilfenol ^{1,2,4,6}	
2-etilfenol ^{1,2,4,6}	
2,4-dimetilfenol ^{1,2,4,6}	
2,5-dimetilfenol ^{1,2,4,6}	
4-etil-2-metoxifenol ^{1, 2,4,6}	
4-propil-2-metoxifenol ^{2,4,6}	
4-metil-2-metoxifenol ^{2,4,6}	
4-etil-2-metoxifenol ^{2,4,6}	
Eugenol ^{2,4,6}	
Seringol ^{2,4,6}	
Acetovanilona ^{2,4,6}	
4-propil-2-metoxifenol ^{2,4,6}	
4-etil-2-metoxifenol ^{2,4,6}	
Metanol ^{2,4,6}	
n-Propanol ^{2,4,6}	
n-Butanol ^{2,4,6}	
Guiacol ^{2,3,4,6}	
Maltol ^{2,3,4,6}	
Fenol ^{1,2,3,4,5,6}	
Ácido acético ^{2,4,7}	
1,2-benzodienolfenol ¹	
1,2-benzenediol ¹	
3-metil-1,2-benzenediol ¹	
3-metoxil-1,2-bezenediol ¹	
2,3-dimetilhidroquinona ⁵	
2-metoxi-4-metilfenol ^{1,4}	
3,4-dimetilfenol ¹	
2,6-dimetoxifenol ¹	
4-alcil-2,6-dimetoxifenol ¹	
2,6-dimetilhidroxifenol ³	

Fontes: ¹LI et al., 2018a, ²THEAPPARAT et al., 2015, ³MULYONO et al., 2012, ⁴THEAPPARAT; PONGLIMANONT; CHANDUMPAL, 2018, ⁵LI et al., 2018b, ⁶THEAPPARAT et al., 2014, ⁷HO et al., 2013.

O estudo realizado pela equipe de MULYONO e cols (2012) difere dos demais estudos citados pois foi realizado com as folhas de *D. asper*, sendo que os demais estudos foram realizados com LPI obtido do processo de pirólise em condições diferentes das utilizadas neste estudo, assim como a espécie de bambu. Apesar da diferença de técnicas aplicadas ainda há compostos químicos identificados por CG/EM, qualitativamente iguais, entre os estudos citados na tabela 8 e os encontrados nas análises da FMeOH350.

Todos os estudos citados relacionam a composição química a uma atividade biológica, em particular antimicrobiana ou antifúngica, com aplicação na indústria de alimentos (SOUZA et al., 2018; THEAPPARAT; PONGLIMANONT; CHANDUMPAL, 2018). Compostos fenólicos e seus derivados, como guaiacol, creosol, catecol, vanilina são descritos como agentes antimicrobianos na literatura, através de diferentes mecanismos de ação, assim como atividade antioxidante (BUDYKO, 1991; HADI; BREMNER, 2001; HO et al., 2013; LI et al., 2018a; PETTY et al., 2014; SCOZZAFAVA et al., 2015; ZHAO et al., 2017).

Pela análise dos compostos químicos observados em diferentes estudos pode-se inferir que a atividade antimicrobiana da FMeOH350 possivelmente está relacionada a um sinergismo de compostos químicos.

5.5.2. Atividade Antimicrobiana por Teste de Difusão de Disco

Inicialmente, utilizou-se uma concentração de 0,25 mg/μl (0,125mg) em um screening comparativo das frações metanol e hexano do LPI a 350 °C, no teste de difusão em disco, para avaliar a possível atividade antimicrobiana. Os resultados permitiram selecionar o fracionamento mais adequado e determinar as concentrações a serem posteriormente avaliadas.

A avaliação da atividade antimicrobiana deste trabalho foi padronizada através do método de difusão de disco (WEINSTEIN et al., 2018). Os resultados dispostos na tabela 9 demonstram claramente que os efeitos da fração metanólica em diferentes concentrações, bem como o efeito da ampicilina, são similares para ambas as bactérias (*E. coli* e *S. aureus*).

Tabela 9. Média dos diâmetros de halo de inibição, onde há ausência de crescimento bacteriano, em milímetros (mm), após tratamento com a fração metanólica e ampicilina.

Bactéria	Dose (mg)				
	Fração Metanólica do Licor Pirolenhoso a 350°C				Ampicilina
	0,125	0,500	0,750	1,000	0,010
<i>E. coli</i>	11.66 ^{A a}	13.42 ^{A ab}	14.28 ^{A ab}	16.73 ^{A bc}	19.91 ^{A c}
<i>S. aureus</i>	10.77 ^{A a}	12.74 ^{A ab}	14.91 ^{A bc}	16.95 ^{A c}	21.69 ^{A d}

Médias com a mesma letra maiúscula na direção vertical não diferem entre si, teste de Tukey, p <0,05. Médias com mesma letra minúscula na direção horizontal não diferem entre si, teste de Tukey, p <0,05. ANOVA (5, 10) = 58,98, p <0,01.

Em relação à *E. coli*, a análise estatística mostrou que FMeOH350 a 0,125, 0,500 e 0,750 mg possuem ação antimicrobiana semelhante, e que a mesma interpretação pode ser aplicada nas concentrações de 0,500, 0,750 e 1,000 mg. Apenas a dosagem mais alta da fração FMeOH2, 1,000 mg, é estatisticamente equivalente a ampicilina.

Os resultados obtidos com *S. aureus* são muito semelhantes. O extrato metanólico, nas doses 0,125 e 0,500 mg, apresentaram efeito semelhantes entre si, de acordo com o teste de Tukey; entre as doses de 0,500 e 0,750 mg, bem como dosagens de 0,750 e 1,000 mg, a inibição observada foram equivalentes. Para esta bactéria a ampicilina não demonstrou semelhança estatística com nenhuma das doses da FMeOH350.

A equivalência estatística entre dosagem de fração metanólica de 1,000 mg e dosagem de ampicilina de 0,010 mg em relação a *E. coli* não foi observada em *S. aureus*.

Os valores da tabela 9 também evidenciam uma relação direta entre a concentração do extrato metanólico e o diâmetro do halo de inibição, que é analisado na figura 20. A análise de regressão linear mostrou que, para ambas as bactérias, o diâmetro do halo de inibição aumentou principalmente como resposta ao aumento da concentração, e a equação linear que expressa essa relação tem um coeficiente de determinação (R^2) maior que 0,8 ($p < 0,01$). Esse resultado pode ser interpretado como evidência da ação dose-dependente da ação antimicrobiana do extrato metanólico.

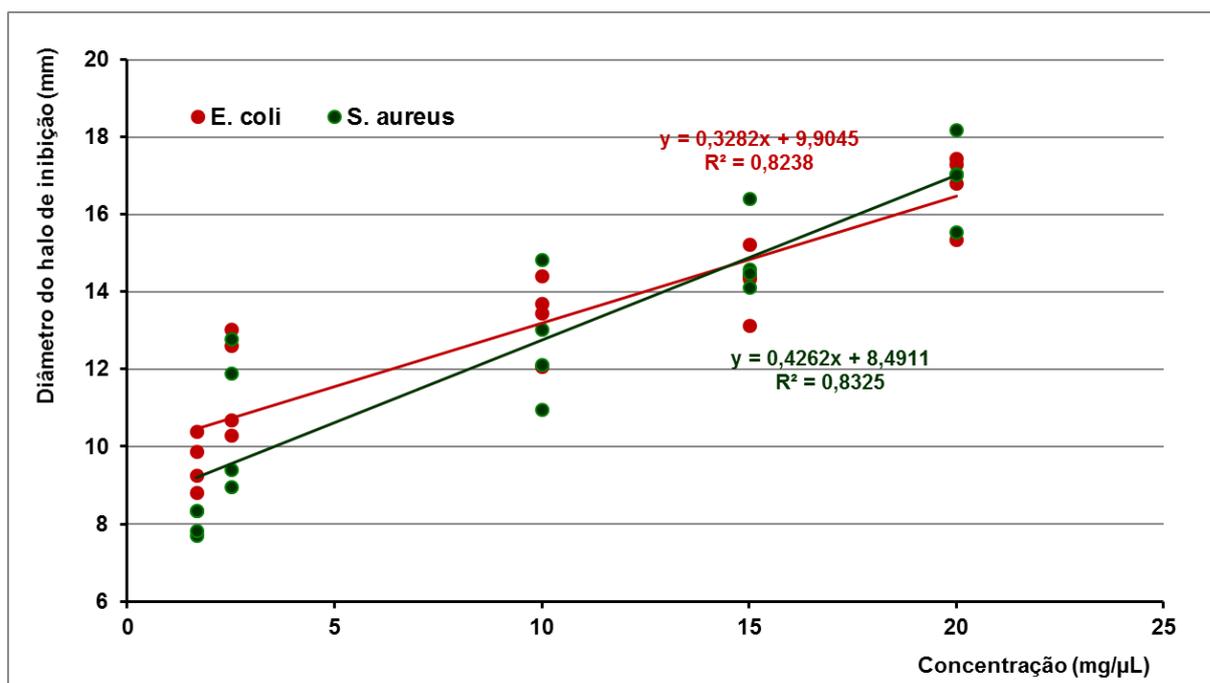


Figura 20. Análise da regressão linear relacionando as concentrações da fração metanólica (mg/μL) com as médias de inibição de halo (mm).

A atividade antimicrobiana observada pode estar relacionada com a presença de compostos fenólicos, e seus derivados, na FMeOH350. Os fenóis e derivados apresentam a estrutura química básica de um anel aromático ligado covalentemente a grupos metila (OH), conferindo a característica polar dos compostos. Os estudos relacionam as atividades antimicrobiana e antioxidantes principalmente a este grupo químico, e por esta razão podem ser empregadas nas área de conservantes como na área alimentícia (CARTAXO, 2012; FELISBERTO et al., 2017; LOO; JAIN; DARAH, 2008).

Em uma fração como esta analisada, que evidencia uma complexidade em sua composição química conforme demonstrado no cromatograma da figura 19, é impossível atribuir essa atividade a um único composto químico.

5.5.3. Análise por MEV

Amostras para análise de imagem por MEV foram coletadas nas bordas do halo de inibição das placas de Petri usadas no screening com a FMeOH350 na concentração de 0,25 mg/ μ L (0,125 mg), buscando verificar as diferenças morfológicas entre as bactérias controle (não tratadas) e as bactérias submetidas ao tratamento com a fração metanólica, conforme evidenciado nas figuras 21 e 22. Para fazer essas comparações, é necessário conhecer os padrões morfológicos normais das bactérias, nas quais elas manifestam sua patogenicidade.

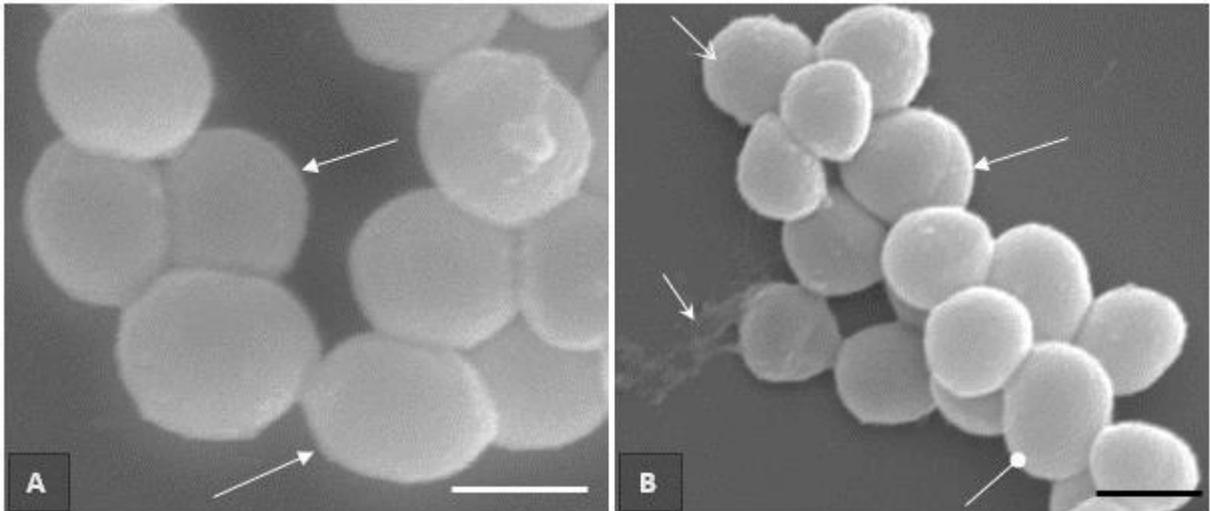


Figura 21. Microscopia eletrônica de varredura: *Staphylococcus aureus*. **21A:** bactérias sem tratamento; cocos mostram forma esférica e tamanhos normais (setas). **21B:** Bactérias submetidas a tratamento com a fração metanólica, com morfologia oval de cocos (seta em elipse); uma linha seccional em uma célula de tamanho e forma anormais (seta); rugosidade na parede celular do coco (seta aberta); e uma substância extracelular (seta furtilva). (Barras = 0,5 μ).

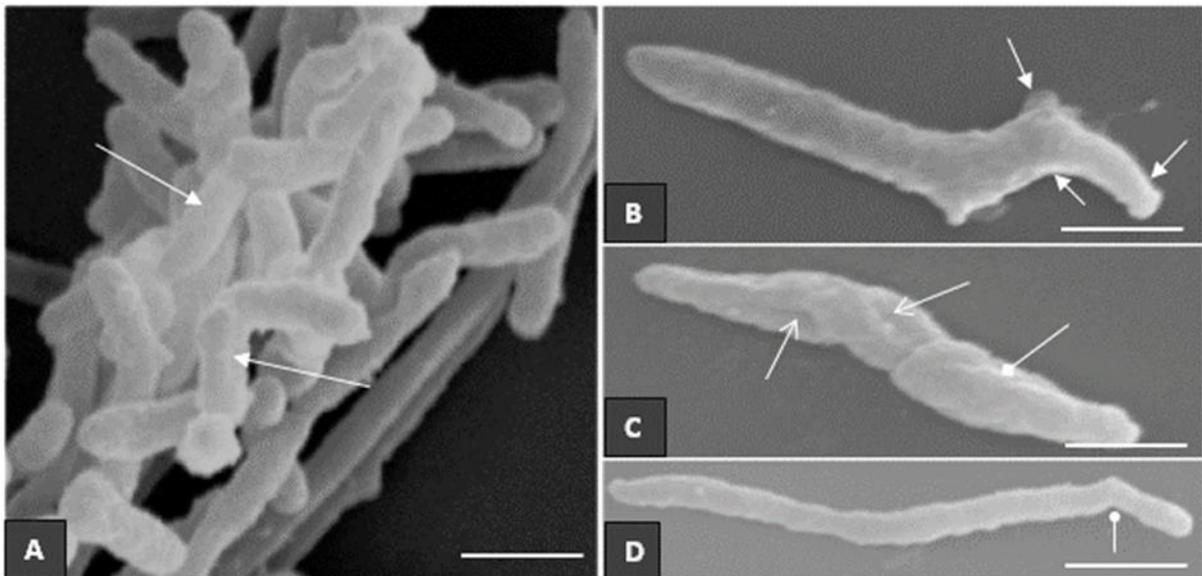


Figura 22. Microscopia eletrônica de varredura: *Escherichia coli*. **22A:** Bactérias sem tratamento mostrando forma de bastonete e tamanho normal (seta). **22B, 22C e 22D:** Bactérias submetidas a tratamento com a fração metanólica. **4B:** Deformações na bactéria, cuja morfologia normal da haste é modificada, mostrando curvas (seta). **22C:** Presença de seções longitudinais na bactéria bem como rugosidade na extensão total da parede celular (seta aberta). **22D:** Flexão no prolongamento final da bactéria (seta em elipse). (Barras = 1,0 μ).

Na figura 21, é possível analisar imagens de MEV de *S. aureus*. O controle bacteriano mostra células que não foram submetidas a tratamento, e que aparecem na forma de um cocs com morfologia regular, diâmetro padrão e agrupamento regular (figura 21A). Após o tratamento com a fração metanólica, as células apresentam tamanho irregular e as paredes celulares apresentam alterações como rugosidade, principalmente sem a forma esférica; alguns com uma seção visível no eixo axial. A presença de uma substância extracelular pode ser notada (figura 22B). Essas diferenças não foram observadas nas bactérias controle. As

diferenças entre o controle e as células bacterianas tratadas podem ser indicativas de inibição do crescimento celular, configurando assim um perfil de atividade antimicrobiana.

Na figura 22, é possível analisar imagens de MEV de *E. coli*. No controle bacteriano, nas células não submetidas a nenhum tratamento a morfologia e forma de bastonete são regulares, com diâmetro padrão e agrupamento regular (figura 22A). Após o tratamento com a FMeOH350, as bactérias não apresentaram a conformação morfológica padrão. As células bacterianas, após tratamento, exibiram uma variedade de variações morfológicas relativas ao tamanho, assim como deformidades na parede celular (figura 22B-22D), confirmando o possível perfil de atividade antimicrobiana.

As imagens das figuras 21 e 22, analisadas por MEV evidenciam as alterações encontradas em *E. coli* e *S. aureus*, não tratadas e com tratamento. Portanto, conhecer as características morfológicas normais de cada bactéria, que as configuram como patogênicas, permitiu comparar e descrever as diferenças descobertas nesta análise.

A *S. aureus* é uma bactéria Gram e catalase positiva cujo tamanho varia de 0,5 a 1,5 μm de diâmetro. É imóvel, não encapsulado e apresenta-se com diversas formas: isolado, em pares, em cadeias curtas e em arranjos irregulares. No organismo humano saudável, é encontrado na pele e nas cavidades nasais e pode causar infecções como espinhas, furúnculos, celulite, pneumonia, meningite, endocardite, septicemia e síndrome do choque séptico, entre outros (SANTOS et al., 2007).

E. coli é uma bactéria Gram-negativa do tipo bastonete, não esporulada, com um metabolismo anaeróbico facultativo, cuja mobilidade é permitida pela presença de flagelos. Suas dimensões são de 1,1 a 1,5 μm por 2,0 a 6,0 μm é uma bactéria presente na flora intestinal de humanos e animais e não apresenta riscos para indivíduos saudáveis. No entanto, quando patogênico, como resultado da ingestão ou desequilíbrio do sistema imunológico, pode causar doenças dos sistemas gastrointestinal e urinário (CORRÊA, 2012).

Estudos com agentes antimicrobianos, de origem natural ou sintética (HARTMANN et al., 2010; TAYEL et al., 2018; YALEW et al., 2014) não apresentam alterações similares às observadas com o tratamento da fração metanólica do LP a 350 ° C, como mostradas nas figuras 21 e 22. Observou-se inibição do crescimento celular em ambas as bactérias submetidas ao tratamento. Embora não tenha sido possível determinar se esta atividade era bactericida ou bacteriostática, a relação dose/resposta apresentada na figura 20 demonstrou uma relação linear entre a dose e o efeito antimicrobiano, para ambas as bactérias testadas.

5.5.4. Análise do Perfil de Atividade Antimicrobiana

O potencial da atividade antimicrobiana oriunda de novas fontes de origem vegetal é importante por causa das infecções hospitalares relacionadas a essas duas bactérias,

especialmente em unidades de terapia intensiva. A etiologia da sepse em crianças e adolescentes está relacionada à patogenicidade bacteriana e pode causar a morte (DA COSTA SÃO PEDRO; MORCILLO; BARACAT, 2015).

Nas diretrizes MD100 ED28: 2018 do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), as quais são aceitas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), há categorias de definições para interpretar o ponto de interrupção dos valores do diâmetro do halo de inibição (mm) para categorizar um organismo como sensível (inibição de halo ≥ 20 mm), intermediário (inibição de halo entre 15-19 mm) ou resistente (inibição de halo ≤ 14 mm) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2003; WEINSTEIN et al., 2018).

Se um composto antimicrobiano é classificado como sensível, a infecção causada pela bactéria pode ser adequadamente tratada com o agente antimicrobiano na dose usada na terapia clínica; a categoria intermediária corresponde a infecções causadas pela bactéria que podem ser tratadas adequadamente em locais do corpo que fisiologicamente permitem o acúmulo do antimicrobiano utilizado no tratamento, ou para o qual uma dose maior pode ser utilizada na terapia clínica; a categoria resistente corresponde a infecções em que a ação do agente antimicrobiano, na sua dose e frequência habitual, não inibe a manifestação da infecção bacteriana, permitindo associar-se clinicamente com mecanismos de resistência microbiana (WEINSTEIN et al., 2018).

A análise da tabela 10 mostra que, para ambas as bactérias, doses de 0,125; 0,500 e 0,750 mg podem ser categorizadas como resistentes. Para *E. coli*, a dosagem de 1,000 mg e ampicilina é categorizada como intermediária. Para *S. aureus*, a dosagem de 1,000 mg é intermediária e a ampicilina é considerada sensível.

Tabela 10. Definições de categorias para interpretar o ponto de breakpoint do diâmetro halo de inibição (mm) da FMeOH2 e da ampicilina nas bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

TRATAMENTO	DOSE (mg)	MÉDIAS DOS VALORES DE INIBIÇÃO DE HALO (mm)					
		<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
		S*	I**	R***	S*	I**	R***
FMeOH2 (Fração Metanólica do Licor Pirolenhoso obtido a 350°C)	0,125	-	-	11,66	-	-	10,77
	0,500	-	-	13,42	-	-	12,74
	0,750	-	-	14,28	-	-	14,91
	1,000	-	16,73	-	-	16,95	-
Ampicilina	0,010	-	19,91	-	21,69	-	-

*Sensível **Intermediário ***Resistente

Uma vez que a categoria de quebra de halos de inibição é baseada em conjuntos de dados farmacológicos e clínicos obtidos a partir de avaliações *in vitro* e *in vivo*, eles são considerados preditores robustos de prováveis desfechos clínicos (WEINSTEIN et al., 2018).

A correlação da composição química com análises de MEV e os dados do teste de halo de inibição confirmam que a fração metanólica do licor pirolenhoso recuperado da pirólise de bambu a 350 ° C demonstra potencial como agente antimicrobiano para *S. aureus* e *E. coli*.

Deve ser apontado que a dosagem de FMeOH350 com efeito equivalente a ampicilina é 100 vezes maior, respectivamente 1,00 mg e 0,01 mg. À primeira vista, isso pode parecer um resultado desfavorável, mas é necessário considerar que o FMeOH350 é um extrato e a ampicilina é um antibiótico bem conhecido e sintetizado.

A possibilidade de integrar a ação antimicrobiana da FMeOH350 a um sistema conservante, de acordo com as normas e definições da ANVISA, nas indústrias química, alimentícia e cosmética, mesmo em dosagens mais altas quando comparadas à ampicilina, é viável, agregando valor a um subproduto da pirólise do bambu.

Contudo, estudos para minimizar características do perfil organoléptico da FMeOH350, principalmente odor e viscosidade, são necessários; visando diminuir o impacto deste num sistema conservante que possa ser empregado num cosmético, por exemplo. As perspectivas tecnológicas deste produto devem ser consideradas para ampliar o emprego desta fração no mercado consumidor.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1. PROSPECTIVAS TECNOLÓGICAS PARA O EMPREGO DA FRAÇÃO METANÓLICA DO LICOR PIROLENHOSO OBTIDO A 350°C

Os resultados deste estudo com o subproduto da pirólise, o licor pirolenhoso, corroboram seu emprego em diversas áreas nas indústrias farmacêuticas, químicas, alimentícias, veterinária e cosméticas, assim como na agricultura (LI et al., 2018a; MARUMOTO et al., 2012; NOPRIARDY; MULYADI; SETIAJI, 2019; SOUZA et al., 2018; SOUZA; RÉ-POPPI; RAPOSO, 2012).

A medicina utiliza para tratamento farmacológico, de humanos e animais, assim como cosméticos, compostos ativos ou princípios ativos isolados, prioritariamente oriundos da investigação do reino vegetal. Os metabólitos secundários encontrados em vegetais foram, na antiguidade, base da medicina ocidental e oriental, desde da arqueobotânica e etnobotânica até as atuais etnofarmacologia e farmacologia. Os atuais princípios de sustentabilidade e preservação do meio ambiente regulam e permitem que estes compostos ou princípios ativos sejam identificados, isolados e mapeados, quanto sua atividade farmacológica, para posterior síntese ou semi-síntese em laboratório, contudo poucos se tornam medicamentos fitoterápicos (DUNCAN, 2011; JANKOWSKY et al., 2017; KESKIN, 2018; LEONTIA; STICHERA; HEINRICHB, 2003; MILLER, 2011; SEN; CHAKRABORTY, 2017).

Os metabólitos primários em vegetais, cuja função fisiológica é essencial para vida destes, não são explorados pelos métodos tradicionais de extração, isolamento e identificação. Isto porque para que tais estudos sejam realizados os vegetais deveriam ser totalmente retirados de seu habitat, causando um desequilíbrio no meio ambiente ao qual pertence. No caso dos subprodutos da pirólise de biomassa lignocelulósica, assim como resíduos de descarte da indústria madeireira, são um fonte pouco explorada e de alto potencial para a pesquisa de compostos com atividade biológica (ALMEIDA, 2012; GALVÃO; JANKOWSKY, 1985; ITÔ; HINO, 2007; JANKOWSKY et al., 2017; MATHEW; ZAKARIA, 2014).

Estes subprodutos da pirólise, devido à complexidade química da matéria-prima lignocelulósica (celulose, hemicelulose e lignina), podem ser submetidos a temperaturas elevadas, acima de 150°C, e sua degradação não inativa a atividade biológica devido aos compostos secundários gerados desse processo. Tratando-se do bambu, as diferentes temperaturas da pirólise geram licores pirolenhosos cuja composição química apresenta similaridade, porém não são idênticas. O foco das atividades antifúngica, antimicrobiana e

antioxidante estão relacionadas principalmente aos compostos fenólicos e seus derivados (BRAGE; SJÖSTRÖM, 1991; LOO; JAIN; DARAH, 2008; SOUZA et al., 2018; THEAPPARAT; PONGLIMANONT; CHANDUMPAI, 2018; ZHAO et al., 2017).

O interesse da utilização de bambu como biomassa para geração de energia ou carvão vegetal é pouco explorada no Brasil, dado que os produtos madeireiros são os primeiros a serem utilizados neste quesito. No Brasil a Política Nacional de Incentivo ao Manejo e Cultivo de Bambu (PNIMCB), também conhecida como “Lei do Bambu”, preconizado em seu artigo 5º parágrafo I “incentivar a pesquisa e o desenvolvimento tecnológico, voltados para o manejo sustentado, o cultivo, os serviços ambientais e as aplicações dos produtos e subprodutos do bambu” (BRASIL, 2011). Devido a este incentivo diversas ações estão sendo mobilizadas para o uso das diversas espécies de bambu, em inúmeras aplicações, entre elas na área de construção civil, painéis de madeira, ambiental e fonte de energia calorífica (BRITO, 2013; BRITO; TOMAZELLO FILHO; SALGADO, 1987; COSTA, 2014; DE BRITO, 2013; PEREIRA; BERALDO, 2016; SOUZA, 2004).

Elaborada no incentivo a pesquisa e desenvolvimento tecnológico, com potencial valor agregado ao subproduto da pirólise, o licor pirolenhoso de bambu *D. asper* obtido a 350°C foi submetido a estudos de obtenção, armazenamento, fracionamento químico e perfil de atividade antimicrobiana. O processo de destilação, preconizado para a separação de compostos tóxicos como o alcatrão, não foi realizado com o intuito de evitar novo aquecimento da FMeOH350 e, evitar possíveis alterações químicas dos compostos. Para isso foi realizado um fracionamento com solventes orgânicos absolutos do LPI350, com polaridades opostas, visando separar os compostos tóxicos da fração com melhor perfil de atividade antimicrobiana e, desta forma, iniciar uma padronização fundamentada em reprodutibilidade e segurança.

Nos países orientais que utilizam largamente o bambu, como Japão, Indonésia entre outros, a produção de licor pirolenhoso desta biomassa é comercializada com padrões de qualidade, sendo inclusive empregadas para estudos de composição química e indicação de usos (LI et al., 2018b; MOKUSAKU, 2018).

No Brasil o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), na Instrução Normativa nº 46, de 22 de novembro de 2016, seção II de Registro de Produtos e Outras Exigências, descreve as exigências para o registro de produtos para agropecuária, entre eles o licor pirolenhoso (Anexo III de 2017), onde a composição química é incluída (MAPA, 2016, 2017). Contudo para aplicação em produtos farmacêuticos, cosméticos, alimentícios ou veterinários, não há padronização do processo como um todo. Isto quer dizer o material de origem do licor pirolenhoso, temperatura de obtenção, armazenamento, eliminação de compostos conhecidamente tóxicos (como os hidrocarbonetos policíclicos de cadeia aromática, ou HPAS, e seus derivados nitrogenados, os NHPAS) e formas de veiculação no

produto final. Estes parâmetros de segurança e qualidade visam minimizar a toxicidade, contaminação cruzada e maximizar as aplicações.

Um estudo de meta-análise evidencia o potencial de aplicação do licor pirolenhoso (SOUZA et al., 2018), conforme Figura 23.

Patent	Country	Title	Year	Antibacterial composition	Claimed
US4308293 ³⁸	United States	Antimicrobial treatment and preservation of animal feedstuffs	1981	Pyrolygneous acid and pyrolygneous acid complexes.	Preservative agents for the treatment of animal feedstuffs.
US4377187 ³⁹	United States	Liquid smoke impregnated fibrous food casing	1983	Liquid smoke.	A fibrous reinforced cellulosic food casing with the impregnated liquid smoke providing antimycotic quality.
US5043174 ⁴¹	United States	Meat processing with <i>Listeria monocytogene</i> re-inoculation control stage	1991	Liquid smoke derivative product containing a minimum of carbonyl and phenol.	Compositions for antimicrobial treatment of food products.
JP2000160476 (A) ⁴³	Japan	Production of carbon fiber and carbon fiber produced thereby	2000	Extract of mugwort (<i>Artemisia princeps</i>) and one of pyrolygneous acid from wood or bamboo.	Carbon fiber that has antimicrobial activity.
KR20030005075 (A) ⁴⁴	Korean	Cosmetic composition containing pyrolygneous acid solution	2003	The cosmetic composition contains 0.5 to 5.0% by weight of a pyrolygneous acid solution, based on the total weight of the composition.	A cosmetic composition containing a pyrolygneous acid solution with antimicrobial activity and antioxidant activity for protecting the skin.
KR20030014052 (A) ⁴⁵	Korean	Natural biodeodorizing agent composition	2003	The <i>Bacillus</i> strain has a final concentration of 0.5x10 ⁷ to 1x10 ⁷ , based on 3 to 5% pyrolygneous solution.	A biodeodorizing agent composition with an excellent antimicrobial activity against putrefactive or pathogenic bacteria and a long-lasting deodorizing effect.
US20050175746 A1 ⁴²	United States	Low flavor anti-microbials derived from smoke flavors	2005	Derivatives of liquid smoke.	Compositions for antimicrobial treatment of food products.
KR20060109757 (A) ⁵⁰	Korean	Silver-ionized wood vinegar having enhanced antimicrobial activity and use thereof for improving or preventing disease caused by pathogenic bacteria	2006	The silver-ionized wood vinegar is prepared by ionizing silver in wood vinegar with electrolysis.	Compositions for antimicrobial activity.
KR1020070042868 ⁴⁷	Korean	Pharmaceutical composition for ameliorating symptoms of atopic dermatitis without skin irritation Comprising refined nontoxic wood vinegar having no harmful materials	2007	Refined wood vinegar 24 wt.% of acetic acid, 0.05–0.15 wt.% of formic acid, 0.50–0.15 wt.% of propionic acid.	Pharmaceutical composition for ameliorating symptoms of atopic dermatitis and improving antimicrobial activity.
US20070212310 A1 ⁴⁸	United States	Antimicrobial smoke flavor for oral microflora control	2007	Compositions that include low flavor antimicrobial liquid smoke derivatives.	Compositions and methods for inhibiting the growth of oral microbes in a subject.
US20090011096 ⁴⁰	United States	Preservatives for food	2009	Combination of N long chain alkyl of di basic amino acid alkyl ester acid salt biocides with liquid smoke compositions.	Compositions for antimicrobial treatment of food products.

Figura 23. Dados de patentes, composições antibacterianas e alegações relacionadas à atividade antimicrobiana de extratos pirolenhosos (SOUZA et al., 2018).

O Brasil tem pouca, ou quase nenhuma, experiência na utilização do licor pirolenhoso, particularmente em relação às áreas biológicas, farmacêuticas e alimentícias. Considerando o incentivo a pesquisa e desenvolvimento tecnológico estimulado pela PNIMCB, as possíveis áreas de aplicação, os dados produzidos por outros estudos e os dados da fração metanólica do licor pirolenhoso obtido a 350°C, a necessidade de identificação química de seus compostos e a necessidade de padronização da cadeia produtiva do licor permitem indicar caminhos para a continuidade e o avanço nas pesquisas; com destaque para a aplicação de métodos em nanoescala na avaliação da referida fração para, posteriormente, desenvolver a aplicabilidade desta fração em diferentes produtos através das técnicas de nanotecnologia.

A microscopia de força atômica (AFM) inicialmente foi utilizada para medir propriedades como altura e deflexão de material sólido através da interação atômica entre o “probe” com a superfície da amostra, registrando a topografia do material. Com o avanço tecnológico foi introduzida a técnica de AFM com leitura de infravermelho (AFM-IR), no qual é possível a detecção de expansão térmica ocasionada pela absorção de ondas

infravermelho. Através desta técnica em nanoescala é possível analisar a topografia da amostra, criando imagens tridimensionais e também avaliar as características químicas pontuais pelo contato do “probe” (CAMPOS, 2017b; DAZZI et al., 2012; KOCHAN et al., 2018).

Considerando a fração metanólica do licor pirolenhoso (a 350°C), cujas características físicas podem ser uma restrição ao uso em sistemas conservantes devido sua viscosidade e cheiros característicos, é possível investir em estratégias de nanotecnologia para minimizar as características indesejáveis e otimizar os efeitos preteridos. Este é um campo recente nos estudos em escala nano, porém é possível realizar experimentos e análises no Laboratório Nacional de Nanotecnologia (Lnnano) e no Laboratório Nacional de Luz Síncronon (LNLS), com nanoespectrometria de infravermelho, ambos localizados no Centro Nacional em Pesquisa de Energia e Materiais (CNPEM-CAMPINAS).

Com estas técnicas é possível aliar as análises das bactérias *in situ* por MEV para avaliar a morfologia, topografia e química dos tratamentos utilizados, ampliando a gama de possíveis empregos do licor pirolenhoso do *D. asper*.

As perspectivas incluem o conhecimento da composição química do licor pirolenhoso, com mínimo emprego de processamentos químicos; pois o propósito não seria isolar um composto com atividade biológica, mas sim excluir os compostos potencialmente tóxicos. Este material então pode ser analisado sobre os aspectos nanotecnológicos, validando a segurança em seu emprego nas diversas áreas de conhecimento, como farmacêutica, veterinária, alimentos, sistemas conservantes, dentre outros.

Desta maneira as possibilidades de agregar valor econômico ao subproduto da pirólise, ao manejo sustentável do bambu e ao desenvolvimento e aplicação tecnológicos ainda pouco exploradas permitiriam a aplicabilidade dos estudos realizados, com segurança e baixa toxicidade.

7. CONCLUSÕES

A realização do estudo com o licor pirolenhoso oriundo da espécie de bambu *Dendrocalamus asper* (Schulther) Backer demonstrou que:

- I. Os rendimentos dos licores pirolenhosos obtidos nas temperaturas de 250°C, 350°C e 550°C são coerentes entre si, pois quanto maior a temperatura empregada para degradar o bambu em carvão vegetal, maior a quantidade de licor pirolenhoso oriundo do processo.
- II. Os licores pirolenhosos integrais são compostos majoritariamente por água, e nesta estão diluídos os compostos químicos.
- III. Através do fracionamento líquido-líquido de cada licor pirolenhoso integral, nas diferentes temperaturas de pirólise (250°C, 350°C e 550°C), foi possível obter frações de diferentes polaridades (FMeOH e FHex), respectivamente. O fracionamento permitiu a separação dos compostos químicos por afinidade a polaridade do solvente extrator. Esta análise foi confirmada por cromatografia de camada delgada.
- IV. Através do teste de difusão de disco foi confirmada o potencial antimicrobiano dos licores pirolenhosos integrais e suas respectivas frações, para as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, através da análise de inibição de halo.
- V. Os dados de rendimento, perfil químico encontrado na análise de CCD e a atividade biológica permitiram selecionar a fração metanólica FMeOH350 para estudos de cromatografia gasosa acoplada a espectômetro de massas, microscopia eletrônica de varredura e análise do perfil antimicrobiano, com potencial aplicabilidade em sistemas conservantes.
- VI. A composição química da FMeOH350 é complexa, apresentando 92 compostos diferentes. Os fenóis, os catecois e o ácido acético são os compostos mais relacionados na literatura com atividade antimicrobiana.
- VII. As análises de imagem obtidas por microscopia eletrônica de varredura evidenciam as alterações que a FMeOH350 promove na parede celular de ambas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, apesar da sua diferença química e estrutural (Gram negativa e Gram positiva, respectivamente).

- VIII. A curva dose-resposta da FMeOH350 é dose-dependente, tendo aplicabilidade em sistemas conservantes em diversas áreas, tais como farmacêutica, química, cosmética, veterinária e alimentícia.

REFERÊNCIAS

- ABERNETHY, J. et al. Epidemiology of Escherichia coli bacteraemia in England: results of an enhanced sentinel surveillance programme. **Journal of Hospital Infection**, v. 95, n. 4, p. 365–375, 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Oitava Edição. **Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI**, v. 23, n. 1, p. 1–58, 2003.
- AKIRA, A. et al. Bambu - Dossiê Técnico. **Intituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR**, p. 1–2, Ago. 2007.
- ALMEIDA, R. **Potencial do licor pirolenhoso da madeira de eucalipto como agente conservante de cosméticos e saneantes**. [s.l.] Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - Universidade de São Paulo, 2012.
- ALSALH, I M. S. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using Pimpinella anisum seeds: Antimicrobial activity and cytotoxicity on human neonatal skin stromal cells and colon cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 4439–4449, 2016.
- ANVISA. **Resolução N° 79 de 25 de agosto de 2000** Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasil Ministério da Saúde, , 2010. Disponível em: <<http://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/13356>>
- BALAT, M. et al. Main routes for the thermo-conversion of biomass into fuels and chemicals. Part 1: Pyrolysis systems. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 12, p. 3147–3157, 2009.
- BERNADINO, C. A. R. **Obtenção do Carvão de Pirólise a partir da Torta de Filtro Proveniente de Usinas Sucroalcooleiras**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.
- BRAGE, C.; SJÖSTRÖM, K. Separation of phenols and aromatic hydrocarbons from biomass tar using aminopropylsilane normal-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 538, n. 2, p. 303–310, 1991.
- BRASIL. **LEI N° 12.484, DE 8 DE SETEMBRO DE 2011**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2011/Lei/L12484.htm>.
- BRITO, F. M. S. **Efeito da Termorreificação nas Propriedades Tecnológicas do Bambu**. [s.l.] Universidade do Espírito Santo, 2013.
- BRITO, F. M. S. **Produção e avaliação da qualidade de painéis aglomerados constituídos por partículas de bagaço de cana-de-açúcar e bambu Piracicaba 2018**. [s.l.] Universidade de São Paulo - Usp, 2018.
- BRITO, J. O. Princípios de Produção e Utilização de Carvão Vegetal de Madeira. **Documentos Florestas**, n. 9, p. 1–19, 1990.
- BRITO, J. O.; TOMAZELLO FILHO, M.; SALGADO, A. L. DE B. Produção e caracterização do carvão vegetal de espécies e variedades de bambu. **Ipef, ...**, v. 36, p. 13–17, 1987.
- BUDYKO, M. I. Climate prediction based on past and current analogues. **Climate change. Proc. 2nd World Climate Conference, Geneva, 1990**, v. 103, n. May, p. 225–229, 1991.
- CAI, J. et al. Review of Physicochemical Properties and Analytical Characterization of Lignocellulosic Biomass. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 76, p. 309–322, 2017.
- CAMPOS, Â. D. Técnicas para Produção de Extrato Pirolenhoso para Uso Agrícola. **Circular Técnica EMBRAPA**, n. 65, p. 1–8, 2007.
- CAMPOS, J. V. DE. **Avaliação da atividade antimicrobiana e análise morfológica por microscopia de força**

- atômica (AFM) da ação de extratos de própolisverde sobre Staphylococcus aureus e Escherichia coli.** [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2017a.
- CAMPOS, J. V. Avaliação da atividade antimicrobiana e análise morfológica por microscopia de força atômica (AFM) da ação de extratos de própolis verde sobre Staphylococcus aureus e Escherichia coli.** [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2017b.
- CARTAXO, R. T. Fracionamento bioguiado e caracterização química de composto com atividade antimicrobiana de geoprópolis de Uruçu Nordestina: abelha indígena sem ferrão Melipona scutellaris.** [s.l.] Universidade Federal de Alfenas, 2012.
- CARVALHO, A. S. Estudo Prospectivo de Colonização por Staphylococcus aureus Resistente à Meticilina um Serviço de Medicina Interna: População, Factores de Risco e Implicações.** *Medicina Interna*, v. 24, n. 3, p. 208–216, 2017.
- CHALLAGUNDLA, L. et al. Range Expansion and the Origin of USA300 North American Epidemic Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus.** *mBio*, v. 8, n. 1, p. e02016-17, 2018.
- COLYE, M. S. et al. Manual of antimicrobial Susceptibility Testing.** (M. B. Coyle, Ed.) Journal of Experimental Psychology: General. *Anais...American Society for Microbiology*, 2005
- Conservantes. Cosméticos e Conservantes.** v. 44, p. 25, 2011.
- CORRÊA, F. A. F. Características dos patótipos de E. coli e implicações de E. coli patogênica para aves em achados de abatedouros frigoríficos.** [s.l.] Universidade Federal de Goiás, 2012.
- COSTA, R. DE S. M. O Bambu: potencialidades técnicas e sociais e a políticas de incentivo ao manejo sustentado.** [s.l.] Universidade Federal Fluminense, 2014.
- Cromatografia de Camada Delgada - CCD.** São Paulo Instituto de Química - USP, , 2013. Disponível em: <http://www.iq.usp.br/wjbaader/qf12343/Coloquio_CCD_2013.pdf>
- DA COSTA SÃO PEDRO, T.; MORCILLO, A. M.; BARACAT, E. C. E. Etiology and prognostic factors of sepsis among children and adolescents admitted to the intensive care unit.** *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v. 27, n. 3, p. 240–246, 2015.
- DA SILVA, V. C.; RODRIGUES, C. M. Natural products: an extraordinary source of value-added compounds from diverse biomasses in Brazil.** *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, v. 1, n. 1, p. 1–6, 2014.
- DAZZI, A. et al. AFM-IR: Combining atomic force microscopy and infrared spectroscopy for nanoscale chemical characterization.** *Applied Spectroscopy*, v. 66, n. 12, p. 1365–1384, 2012.
- DE BRITO, J. S. Utilização do broto de bambu como possibilidade de diversificação alimentar no município de Taquara/RS.** [s.l.] Faculdade de Ciências Econômicas da UFRGS, 2013.
- DE OLIVEIRA SOUZA, C. et al. Escherichia coli enteropatogênica: uma categoria diarreio gênica versátil.** *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 2, n. 7, p. 1–2, 2016.
- DEMIRBAS, A. Reuse of wood wastes for energy generation.** *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects*, v. 31, n. 19, p. 1687–1693, 2009.
- DIAS, A. F. et al. Pyrolysis and wood by-products of species from the Brazilian semi-arid region.** *Scientia Forestalis/Forest Sciences*, v. 46, n. 117, 2018.
- DOS REIS, G. V. Isolamento bioguiado de compostos de actinobactérias com atividade fungitóxica.** [s.l.] Escola Superior de Agricultura «Luiz de Queiroz», Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), 2017.
- DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials,**

- antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, n. 1, p. 1–24, 2011.
- EPAND, R. M. et al. Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics ☆. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1858, n. 5, p. 980–987, 2016.
- EVANS JR, D. J.; EVANS, D. . G. Escherichia coli in diarrheal disease. Em: **Medical Microbiology**. [s.l: s.n.]. p. Chapter 25.
- FANI, M. Conservação de alimentos por aditivos químicos. **Food Ingredients Brasil**, v. XIV, n. 22, p. 35–42, 2012.
- FELISBERTO, M. H. F. et al. Young bamboo culm: Potential food as source of fiber and starch. **Food Research International**, v. 101, n. September, p. 96–102, 2017.
- FERREIRA, F. DE S. Aditivos Alimentares E Suas Reações Adversas No Consumo. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 13, n. 1, p. 397–407, 2015.
- FERREIRA, L. F. B.; SARAIVA, L. M.; PEDROSO, N. **Cromatografia em Camada Delgada** AraraquaraUNESP, , 2018.
- FOSTER, T. Staphylococcus. Em: BARON, S. (Ed.). . **Medical Microbiolog**. 4 ed. ed. Galviston: University of Texas Medical Branch at Galveston,, 1996.
- GALVÃO, A. P. M.; JANKOWSKY, I. P. **Secagem Racional de Madeira**. 1 ed ed. São Paulo: Nobel, 1985.
- GHAVAMI, K. Bamboo as reinforcement in structural concrete elements. **Cement and Concrete Composites**, v. 27, n. 6, p. 637–649, 2005.
- GOMES, A. B. Alergia a cosméticos. **Aditivos Cosméticos**, Mar. 2017.
- GRECO, T. M.; CROMBERG, M. **Bambu: cultivo e manejo**. Florianópolis: Insular, 2011.
- GUARNETTI, R. L. **Cogeração De Eletricidade Utilizando Bambu No Brasil: Aspectos Técnicos Econômicos e Ambientais**. [s.l.] Faculdade de Economia e Administração-Instituto de Energia e Ambiente, 2013.
- GUENTZEL, M. N. Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, and Proteus. Em: BARON, S. (Ed.). . **Medical Microbiology**. 4 ed. ed. Galveston (TX): Medical Microbiology, 1996.
- HADI, S.; BREMNER, J. B. Initial studies on alkaloids from Lombok medicinal plants. **Molecules**, v. 6, n. 2, p. 117–129, 2001.
- HARRIS, L. G. et al. An introduction to Staphylococcus aureus, and techniques for identifying and quantifying S. aureus adhesins in relation to adhesion to biomaterials: Review. **European Cells and Materials**, v. 4, p. 39–60, 2002.
- HARTMANN, M. et al. Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 8, p. 3132–3142, 2010.
- HO, C. L. et al. Bamboo Vinegar Decreases Inflammatory Mediator Expression and NLRP3 Inflammasome Activation by Inhibiting Reactive Oxygen Species Generation and Protein Kinase C- α/δ Activation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 2013.
- IBGE, I. B. DE G. E E.-. Produção da extração vegetal e silvicultura. **Produção de Extração Vegetal e da Silvicultura**, v. 31, n. Rio de Janeiro, p. 55, 2016.
- ITÔ, H.; HINO, T. Dwarf bamboo as an ecological filter for forest regeneration. **Ecological Research**, v. 22, n. 4, p. 706–711, 2007.
- JANKOWSKY, L. et al. Use of Solid Timber Waste as Potential Raw Material for Novel Herbal Drugs : Use of

Solid Timber Waste as Potential Raw Material for Novel Herbal Drugs : Multidisciplinary Research , Development , and Innovation. v. 1992, n. October, p. 3–8, 2017.

JANKOWSKY, L. et al. Antimicrobial Activity of the Methanolic Fraction of Bamboo Pyrolytic Liquor. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, n. 10, p. 924–934, 2018.

KAN, T.; STREZOV, V.; EVANS, T. J. Lignocellulosic biomass pyrolysis: A review of product properties and effects of pyrolysis parameters. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, n. 57, p. 1126–1140, 2016.

KESKIN, C. Medicinal Plants and their Traditional Uses. **Journal of Advances in Plant Biology**, v. 1, n. 2, p. 8–12, 2018.

KOCHAN, K. et al. In vivo atomic force microscopy-infrared spectroscopy of bacteria. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 15, n. 140, 2018.

KRAKER, M. E. A. et al. Mortality and Hospital Stay Associated with Resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Bacteremia: Estimating the Burden of Antibiotic Resistance in Europe. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e1001104, 2011.

LEONTIA, M.; STICHERA, O.; HEINRICHB, M. Antiquity of medicinal plant usage in two Macro-Mayan ethnic groups (México). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 2–3, p. 119–124, 2003.

LEPAGE, E. S. et al. **Manual de Preservação de Madeiras**. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT, 1986.

LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 16 ed. ed. New Your: Artmed, 2011.

LI, R. et al. Antiviral Activity of Phenolic Derivatives in Pyrolytic Acid from Hardwood, Softwood, and Bamboo. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 6, n. 1, p. 119–126, 2018a.

LI, R. et al. Structure-dependent antiviral activity of catechol derivatives in pyrolytic acid against the encephalomyocarditis virus. **RSC Advances**, v. 8, n. 63, p. 35888–35896, 2018b.

LINI, R. S. et al. Caracterização de fármacos por cromatografia em camada delgada. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 95, n. 1, p. 485–498, 2014.

LOO, A. Y.; JAIN, K.; DARAH, I. Antioxidant activity of compounds isolated from the pyrolytic acid, *Rhizophora apiculata*. **Food Chemistry**, v. 107, n. 3, p. 1151–1160, 2008.

MACDOUGALL, C. et al. Hospital and Community Fluoroquinolone Use and Resistance in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in 17 US Hospitals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 435–440, 2005.

MAHDAVI, M.; CLOUSTON, P.; ARWADE, S. Development of laminated bamboo lumber: review of processing, performance, and economical considerations. **Journal of Materials in Civil Engineering**, v. 23, n. 7, p. 1036–1042, 2011.

MALANOVIC, N.; LOHNER, K. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, p. 936–946, 2016.

MANSUR, D. et al. Production of ketones from pyrolytic acid of woody biomass pyrolysis over an iron-oxide catalyst. **Fuel**, v. 103, p. 130–134, 2011.

MAPA. **Instrução Normativa Nº 46, De 22 De Novembro De 2016.**, 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-46-de-22-11-2016-fert-minerais-dou-7-12-16.pdf>>

MAPA. **Anexo III - Aditivos Autorizados Para Uso em Fertilizantes Minerais**, 2017.

MARINHO, N. P. et al. *Dendrocalamus giganteus*). **Ciência Florestal**, v. 22, n. 2, p. 413–418, 2012.

- MARINHO, N. P.; NISGOSKI, S.; DE MUÑIZ, G. I. B. Avaliação das dimensões das fibras de colmos de bambu, *Dendrocalamus giganteus* (Wall) Munro, em diferentes idades. **Ciencia Florestal**, v. 24, n. 1, p. 251–256, 2014.
- MARUMOTO, S. et al. Identification of a germicidal compound against picornavirus in bamboo pyroigneous acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 9106–9111, 2012.
- MATHEW, S.; ZAKARIA, Z. A. Pyroigneous acid—the smoky acidic liquid from plant biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 2, p. 611–622, 2014.
- MENA, L. E. H. **Estudo Experimental da Pirólise lenta de Bambu (*Dendrocalamus giganteus* Munro) e Caracterização do Carvão Vegetal**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas - Unicamp, 2014.
- MILLER, J. S. The discovery of medicines from plants: A current biological perspective. **Economic Botany**, v. 64, n. 4, p. 396–307, 2011.
- MOGNON, F. et al. Alocação e modelagem da biomassa em: *Dendrocalamus asper*. **Floresta**, v. 45, n. 1, p. 1–10, 2015.
- MOKUSAKU. **PROVEN EFFECTS OF WOOD VINEGAR TO WOOD VINEGAR**.
- MOTA, F. DE A. DA S. et al. Pirólise Da Biomassa Lignocelulósica: Uma Revisão Pyrolysis of Lignocellulose Biomass: a Review. **Revista Geintec**, v. 5, n. 4, p. 2511–2525, 2015.
- MULYONO, N. et al. Antibacterial activity of petung bamboo (*Dendrocalamus asper*) leaf extract against pathogenic *Escherichia coli* and their chemical identification. **International Journal of Pharmaceutical and Biological Archives**, v. 3, n. 4, p. 770–778, 2012.
- NOPRIARDY, F.; MULYADI, H.; SETIAJI, B. Liquid Smoke: Rebung Preservation in Canned Food for ASEAN Food Marketing. **KnE Social Sciences**, v. 3, n. 5, p. 239, 2019.
- OLIVEIRA, A. C. et al. Análise de risco econômico de dois sistemas produtivos de carvão vegetal. **Floresta e Ambiente**, v. 24, n. May, 2017.
- OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.
- PEREIRA, M. A. DOS R.; BERALDO, A. L. **Bambu de corpo e alma**. 2. ed. Bauru, São Paulo: Canal6, 2016.
- PETENÁ, G. et al. Scanning electron microscopy of leaf and petal cuts of citrus trees fertigated with two nitrogen sources. **Citrus Research & Technology**, v. 37, n. 2, p. 218–225, 2016.
- PETTY, N. K. et al. Global dissemination of a multidrug resistant *Escherichia coli* clone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 15, p. 5694–5699, 2014.
- QUEIROZ, M. B.; FERREIRA, M.; RAMBO, M. Correlação entre o poder calorífico e a composição química de biomassas lignocelulósicas. **Sociedade Brasileira de Química**, n. 1c, p. 1, 2013.
- RABELO, C. B. **Estudo de caso do consumo de energia verde em uma multinacional do ramo de cosméticos**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2018.
- RAMBO, M. K. D. et al. Estudo de análise termogravimétrica de diferentes biomassas lignocelulósicas utilizando a análise por componentes principais. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 3, p. 862–868, 2015.
- ROSA, R. A. **Caracterização Do Bambu Laminado Colado Como Alternativa Tecnológica Industrial**. [s.l.] Universidade Federal do Espírito Santo, 2013.
- SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiros de Patologia e Medicinal Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413–423, 2007.

- SANTOS, D. R. DE S. et al. Potencial de espécies de Bambu como fonte energética. **Scientia Forestalis/Forest Sciences**, v. 44, n. 111, p. 751–758, 2016.
- SCOZZAFAVA, A. et al. Carbonic anhydrase inhibitors: Guaiacol and catechol derivatives effectively inhibit certain human carbonic anhydrase isoenzymes (hCA I, II, IX and XII). **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 586–591, 2015.
- SEN, S.; CHAKRABORTY, R. Revival, modernization and integration of Indian traditional herbal medicine in clinical practice: Importance, challenges and future. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 7, n. 2, p. 234–244, 2017.
- SENA, M. F. M. DE et al. Potencialidades do extrato pirolenhoso: práticas de caracterização. **Revista Eletronica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental - REGET**, v. 18, p. 41–44, 2014.
- SILVA, M. **A relação entre o hábito e a composição da parede celular de bambus nativos**. [s.l.] Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, 2017.
- SILVA NETO, J. M. et al. Potencial de Fibras Lignocelulósicas para a Produção de Etanol de Segunda Geração. **5. Encontro Regional de Química e 4. Encontro Nacional de Química**, v. 3, n. 1, p. 1038–1047, Nov. 2015.
- SNIF. Os Biomas e Suas Florestas - Sistema Nacional de Informações Florestais. **Sistema Nacional de Informações Florestais**, p. 1–9, 2016.
- SOARES, S. G. DE S. C. et al. Characterization of the infections related to health care in a teaching hospital in the Northeastern of Brazil. **Revista de Enfermagem da UFPI**, v. 6, n. 2, p. 37–43, 2017.
- SOUZA, A. P. C. C. Bambu na habitação de interesse social no Brasil. **Cadernos de Arquitetura e Urbanismo**, v. 11, n. 12, p. 217–245, 2004.
- SOUZA, J. L. S. DE et al. Antimicrobial potential of pyrolytic extracts – a systematic review and technological prospecting. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 128–139, 2018.
- SOUZA, J. B. G.; RÉ-POPPI, N.; RAPOSO, J. L. Characterization of pyrolytic acid used in agriculture by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 4, p. 610–617, 2012.
- SOUZA, V. M. A questão da toxicidade nos cosméticos e o aumento dos consumo de cosméticos infantis. **Aditivos Cosméticos**, 2014.
- STOESSER, N. et al. Genomic epidemiology of global *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Escherichia coli*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.
- SUMANATRAKUL, P. et al. Utilization of *Dendrocalamus Asper* Backer Bamboo Charcoal and Pyrolytic Acid. **Energy Procedia**, v. 79, p. 691–696, 2015.
- TAYEL, A. A. et al. Bioactivity and application of plant seeds' extracts to fight resistant strains of *Staphylococcus aureus*. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 63, n. 1, p. 47–53, 2018.
- THEAPPARAT, Y. et al. Physicochemical Characteristics of Wood Vinegars from Carbonization of *Leucaena leucocephala*, *Azadirachta indica*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Hevea brasiliensis* and *Dendrocalamus asper*. **Kasetsart J. (Nat. Sci)**, v. 48, p. 916–928, 2014.
- THEAPPARAT, Y. et al. Pyrolytic acids from carbonisation of wood and bamboo: Their components and antifungal activity. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 27, n. 4, p. 517–526, 2015.
- THEAPPARAT, Y.; PONGLIMANONT, C.; CHANDUMPAI, A. In vitro Antioxidant Evaluation of Wood Vinegars from Carbonization of Wood and Bamboo. v. 45, n. 2, p. 868–880, 2018.
- TOMBOLATO, A. F. C.; GRECO, T. M.; PINTO, M. M. Dez espécies de bambus exóticos mais comuns no

- paisagismo no Brasil. **Revista Brasileira de Horticultura Ornamental**, v. 18, n. 2, p. 105–114, 2012.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- VIEIRA, G. E. G. et al. Biomassa: uma visão dos processos de pirólise. **Revista Liberato**, v. 15, n. 24, p. 168–177, 2014.
- VIEIRA, P. N.; VICENTINO VIEIRA, S. L. Uso Irracional E Resistência a Antimicrobianos Em Hospitais. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 21, n. 3, p. 209–212, 2018.
- WEINSTEIN, M. P. et al. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing - ED28/2018**. Disponível em: <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI_M100_ED28:2018&scope=user>. Acesso em: 25 jun. 2018.
- YALEW, R. et al. Antibacterial effects of the tellurium compound OTD on E. coli isolates. **Archives of Microbiology**, v. 196, n. 1, p. 51–61, 2014.
- YU, X. Bamboo: Structure and Culture. p. 196, 2008.
- ZANETTI, M. et al. Uso de subprodutos de carvão vegetal na formação do porta-enxerto limoeiro «cravo» em ambiente protegido. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 25, n. 3, p. 508–512, 2003.
- ZETOLA, N. et al. Community-acquired meticillin-resistant Staphylococcus aureus: an emerging threat Nicola. **Lancet Infect Dis**, v. 5, p. 15275–286, 2005.
- ZHAO, D. et al. Intracellular antioxidant effect of vanillin, 4-methylguaiacol and 4-ethylguaiacol: Three components in Chinese Baijiu. **RSC Advances**, v. 7, n. 73, p. 46395–46405, 2017.
- ZHOU, Y. K.; SHEN, X. Y.; HOU, C. L. Diversity and antimicrobial activity of culturable fungi from fishscale bamboo (*Phyllostachys heteroclada*) in China. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 6, p. 1–7, 2017.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Relatório da análise por CG/EM da fração metanólica do licor pirolenhoso obtido à 350°C, da Central Analítica (UNICAMP/SP).



Central Analítica - Instituto de Química - UNICAMP CA 052/18

RESULTADO DE ANÁLISE CA 052/18

Empresa	Instituto de Pesquisas Estudos Florestais - IPEF
Endereço	Via Comendador Pedro Marganti, 3.500 - Bairro Monte Alegre CEP: 13415-000 - Piracicaba/SP
A/C	Luciana Jankowsky
E-mail	lujankowsky@usp.br
Telefone	(19) 9-9146-1290

1. OBJETIVO

Análise qualitativa por cromatografia a gás com espectrometria de massas e obtenção do espectro de absorção na região do infravermelho de duas amostras.

2. AMOSTRAS

As amostras foram recebidas em 24 de Janeiro de 2018 e foram armazenadas na geladeira. A amostragem foi de responsabilidade do cliente e as identificações das amostras estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Legenda de identificação das amostras.

Central Analítica	Cliente
AM 0256/18	Matriz - 1,5 g
AM 0257/18	Metanol

3. MÉTODOS DE ANÁLISE

3.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio: Os espectros foram obtidos em espectrômetro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) na região de 4.000 a 450 cm^{-1} , utilizando-se acessório para refletância total atenuada (ATR).

Equipamento: Cary 630 - FTIR Spectrometer - Agilent.

3.2 Cromatografia a gás com detector de massas: As amostras analisadas em cromatógrafo a gás com detector de massas nas seguintes condições:

Coluna	: Stabilwax, (30 m x 0,25 mm; 0,25 μm)
Gás de arraste	: He (99,9999); 1,0 mL/min
Injetor	: 280 °C, Split 50:1
Forno	: 62 °C (6 min) \rightarrow 115 °C (10 °C/min) \rightarrow 215 °C (3 °C/min) (15 min).
Detector	: Espectrômetro de massas tipo quadrupolo linear Fonte de Ionização: Ionização por elétrons (70 eV) Modo varredura (0,5 seg/scan) Filamento: desligado a 2,1 min



Faixa de massas: 33 - 550 daltons; Linha transferência: 280 °C
 Equipamento : Cromatógrafo a gás com espectrômetro de massas tipo quadrupolo linear modelo 5975C, Agilent.

4. RESULTADOS

Os espectros de absorção na região do infravermelho médio encontram-se anexos.

Para a identificação dos compostos detectados nos cromatogramas obtidos utilizou-se a base de dados de espectros de massas NIST11 e o programa (AMDIS Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System). As Tabelas 2 e 3 resumem os resultados obtidos. Os cromatogramas e espectros de massas encontram-se anexos.

Tabela 2. Compostos detectados na amostra Matriz.

# Pico ¹	t _R ²	Nome do Composto ³	% A ⁴	Qualidade ⁵
1	2,327	Metoxi tetrahidrofurano	0,14	87
2	2,552	Não determinado	1,00	-
3	7,190	Tetrahidrofurano Cloreto de Carbonila	0,10	78
4	7,797	Hidroxi Propanona	0,83	72
5	9,088	Ciclopentenona	0,27	96
6	9,318	Metil Ciclopentenona	0,14	90
7	9,408	Hidroxi Butanona	0,72	86
8	9,650	Glicolato de Metila	0,25	95
9	10,054	Não determinado	0,24	-
10	10,930	Acido Acético	1,12	94
11	11,104	Acetil Oxi Propanona	0,93	AMDIS
12	11,739	Anídrido Butírico	2,43	-
13	12,036	Metil Ciclopentenona	0,79	97
14	12,120	Não determinado	0,17	-
15	12,193	Não determinado	0,33	-
16	12,384	Metil Heptino	0,25	83
17	12,811	Ester Metílico do Acido Oxi Pentanóico	0,19	91
18	13,002	Metil Furancarboxaldeído	0,16	96
19	13,154	Metoxi Piridina	0,45	91
20	13,659	Não determinado	0,24	-
21	14,041	Butirolactona	2,71	93
22	14,383	Dihidro Dimetil Furanona	0,25	89
23	14,557	Furanmetanol	3,08	97
24	15,276	Não determinado	0,28	-
25	15,866	Metil Furanona	0,21	91
26	15,950	Etil hidroxi ciclopentenona	0,23	78
27	16,697	Furanona	0,54	94
28	16,843	Metil Hidroxi butirato	0,33	83
29	17,107	Não determinado	0,18	-
30	17,556	Hidroxi Dimetil Ciclopentenona	0,29	83



# Pico ¹	t _R ²	Nome do Composto ³	% A ⁴	Qualidade ⁵
31	17,859	Tetrahydro Piranona	0,26	91
32	18,426	Hidroxi Metil Ciclopentenona	2,83	95
33	18,864	Dihidro Dimetil Furanona	0,21	86
34	19,100	Metoxi Fenol	2,40	97
35	19,763	Não determinado	0,66	-
36	20,027	Etil Hidroxi Ciclopentenona	1,14	96
37	21,588	Creosol	0,66	96
38	22,071	Hidroxi Propil Ciclopentenona	0,27	92
39	22,323	Maltol	0,45	94
40	22,492	Não determinado	0,48	-
41	22,952	Fenol	3,85	95
42	23,525	Etil Metoxi Fenol	0,59	91
43	24,182	Não determinado	0,48	-
44	24,384	Não determinado	0,36	-
45	24,693	Metil Butenino	0,27	89
46	25,333	Não determinado	9,33	-
47	25,631	Não determinado	0,16	-
48	27,624	Etil Fenol	3,10	95
49	28,197	Metoxi Vinil Fenol	1,32	93
50	28,377	Não determinado	0,82	-
51	28,624	Bromo Pentano	0,71	72
52	28,843	Não determinado	0,34	-
53	29,859	Não determinado	0,67	-
54	30,179	Dimetoxi Fenol	6,81	97
55	30,606	Não determinado	0,39	-
56	31,196	Propil Butirato	3,61	AMDIS
57	31,589	Glicerina	0,26	78
58	31,987	Anidrido Isobutírico	0,92	-
59	32,291	Trans Isoeugenol	0,29	98
60	32,465	Acido Hidroxi Metoxi Benzóico	1,80	72
61	33,520	Dianidro Alfa Glicopirranose	2,14	96
62	33,616	Dihidro Benzofurano	2,12	72
63	33,953	Terc Butil Pirrogolol	1,28	72
64	34,408	Piridinol	1,43	94
65	34,941	Não determinado	0,16	-
66	35,795	Hidroxi Metil Dihidrofuranona	1,50	93
67	36,412	Metoxi Benzenodiol	4,25	96
68	37,047	Propenil Fenol	0,22	92
69	37,367	Dimetoxi Propenil Fenol	0,26	97
70	38,001	Vanilina	0,28	97
71	38,355	Não determinado	0,25	-
72	38,518	Dimetoxi Fenol	0,82	91
73	38,821	Apocinina	0,28	91
74	39,844	Não determinado	0,25	-
75	40,163	Metil Vanilil Cetona	1,32	AMDIS
76	40,371	Trihidroxi Fenil Etanona	0,60	80



# Pico ¹	t _R ²	Nome do Composto ³	% A ⁴	Qualidade ⁵
77	40,607	Metil Benzenodiol	0,79	97
78	41,348	Catecol	5,16	95
79	42,213	Dimetoxi Propenil Fenol	0,82	95
80	43,128	Metil Benzenodiol	1,46	97
81	45,425	Etil Catecol	0,62	87
82	45,734	Não determinado	0,36	-
83	46,082	Metil Hidroxi Fenil Acetato	0,40	94
84	46,374	Não determinado	0,39	-
85	46,666	Não determinado	0,30	-
86	47,766	Não determinado	0,83	-
87	48,042	Hidroxi Benzaldeido	0,63	94
88	49,934	Não determinado	2,25	-
89	51,006	Hidroquinona	1,88	91
90	51,411	Não determinado	0,91	-
91	51,922	Não determinado	0,86	-
92	53,747	Não determinado	0,79	-

Tabela 3. Compostos detectados na amostra Metanol.

# Pico ¹	t _R ²	Nome do Composto ³	% A ⁴	Qualidade ⁵
1	2,552	Não determinado	100,0	-

¹ Número do pico pela ordem de eluição da coluna.

² t_R = Tempo de retenção do composto na coluna em minutos.

³ Nome mais comum do composto identificado.

⁴ %A = Porcentagem de área normalizada a qual indica a distribuição relativa dos compostos na amostra.

⁵ Qualidade = índice de pesquisa na base de dados que reflete a similaridade do espectro de massas obtido com os registrados nas bibliotecas utilizadas. Foram adotados índices de qualidade > 70.

Obs.1: Os resultados referem-se exclusivamente à análise em amostras entregues pelo cliente à Central Analítica - IQ/UNICAMP.

Obs.2: Fica o cliente notificado que o uso do nome do Instituto de Química da UNICAMP e a reprodução deste resultado de análise somente podem ser feitos sob prévia autorização.

Obs.3: O conteúdo e as conclusões aqui apresentadas são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a compromete.

Campinas, 23 de Março de 2018.


 Assinado de forma digital por Sabrina Barboza Rosa
 Dados: 2018.03.23 00:08:09 -03'00'
Sabrina Barboza Rosa
 Química Responsável - Signatária Autorizada
 CRQ: 04263563 - 4ª Região

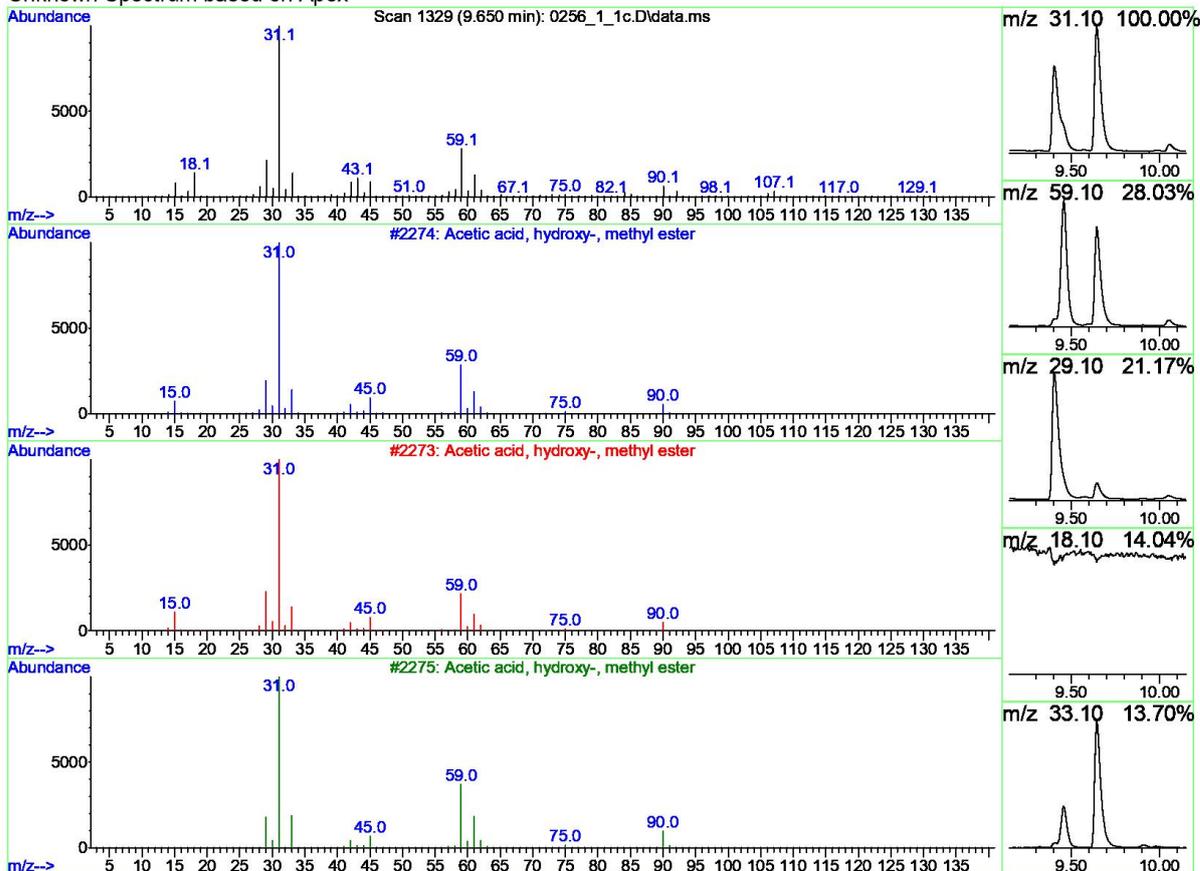
Central Analítica
 Universidade Estadual de Campinas
 Instituto de Química - CP 6154 - 13084-971 - Campinas, SP
 Fone: (019) 3521-0219
 E-mail: ca@iqm.unicamp.br

APÊNDICE B.
obtido à 350°C.

Espectros de massas da análise por CG/EM, da fração metanólica do licor pirolenhos

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

Peak Number: 8 at 9.650 min Area: 49023897 Area % 0.25

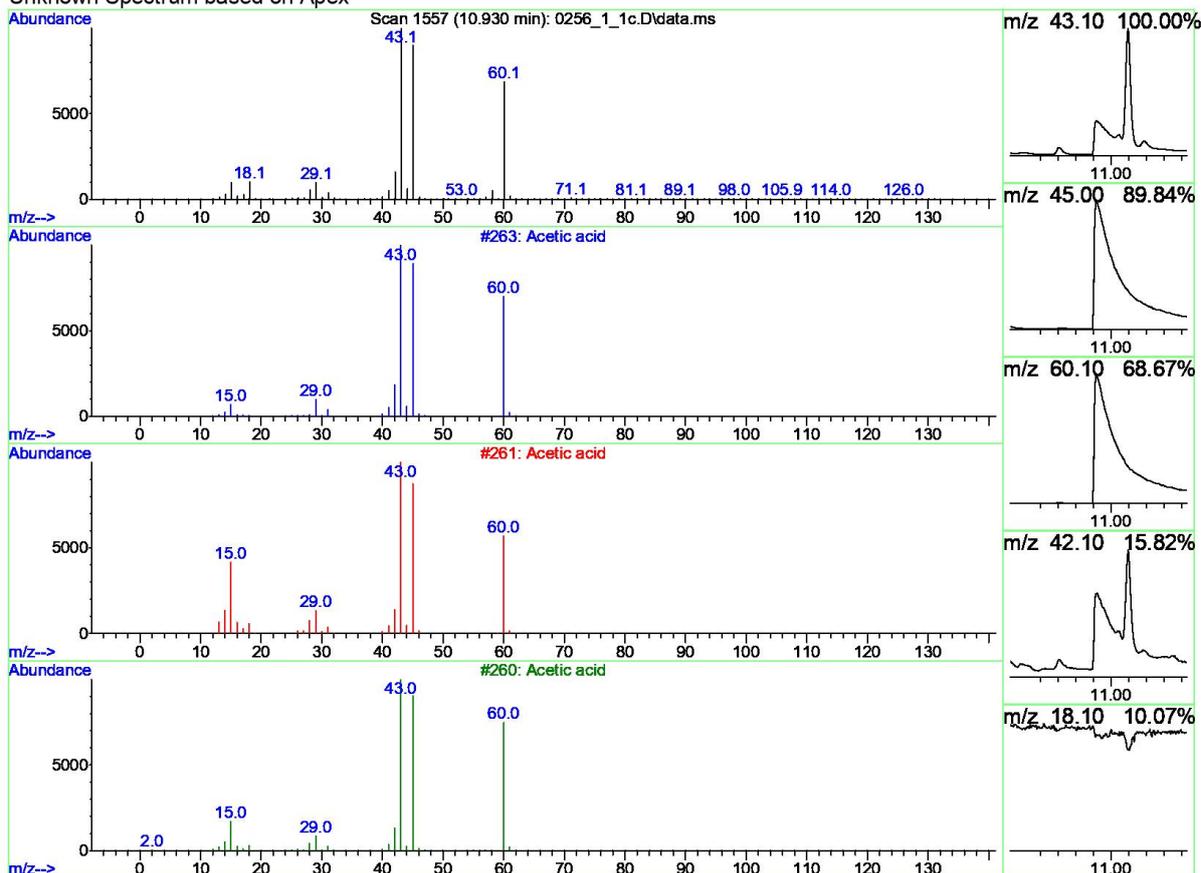
The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

C:\Database\NIST11.L

1	Acetic acid, hydroxy-, methyl ester	2274	000096-35-5	95
2	Acetic acid, hydroxy-, methyl ester	2273	000096-35-5	95
3	Acetic acid, hydroxy-, methyl ester	2275	000096-35-5	58

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

Peak Number: 10 at 10.930 min Area: 222640508 Area % 1.12

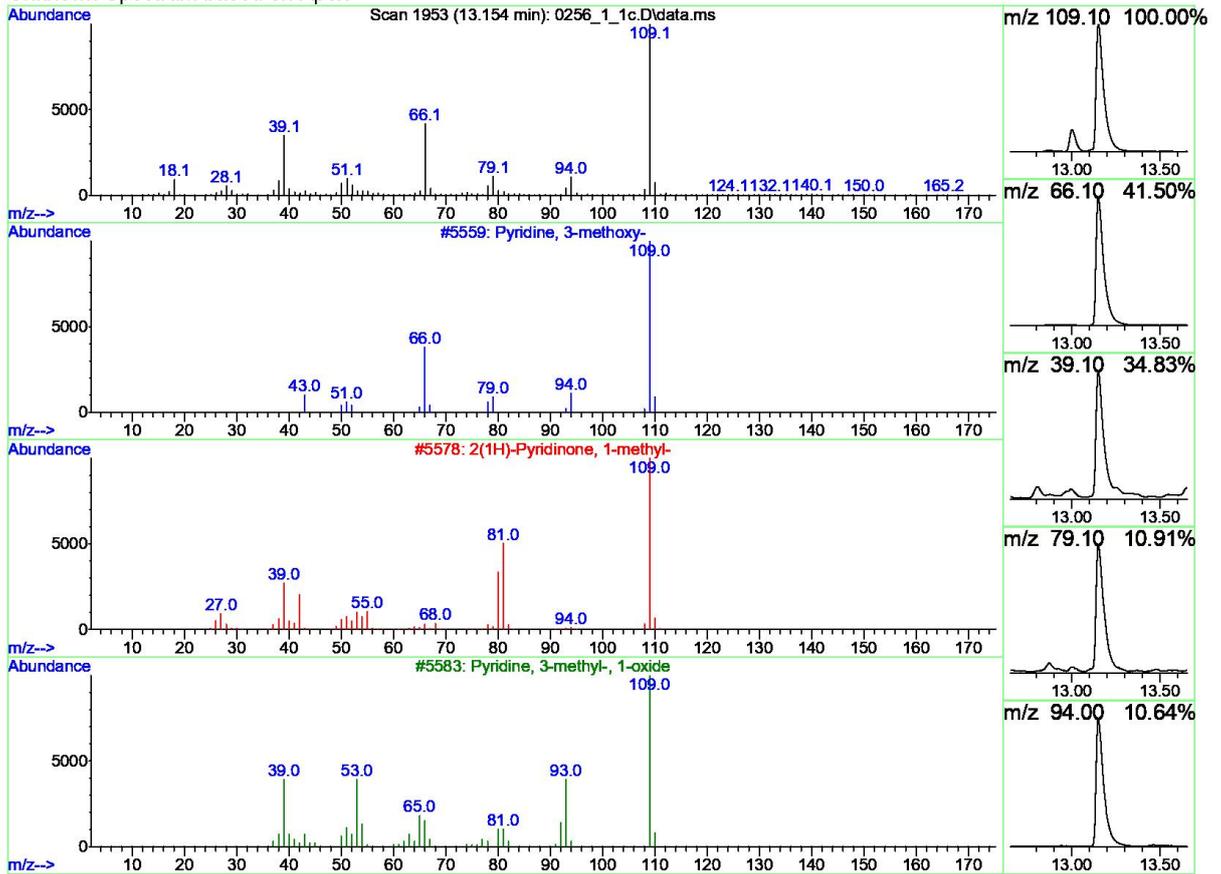
The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

C:\Database\NIST11.L

1 Acetic acid	263	000064-19-7	94
2 Acetic acid	261	000064-19-7	91
3 Acetic acid	260	000064-19-7	91

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

Peak Number: 19 at 13.154 min Area: 89602226 Area % 0.45

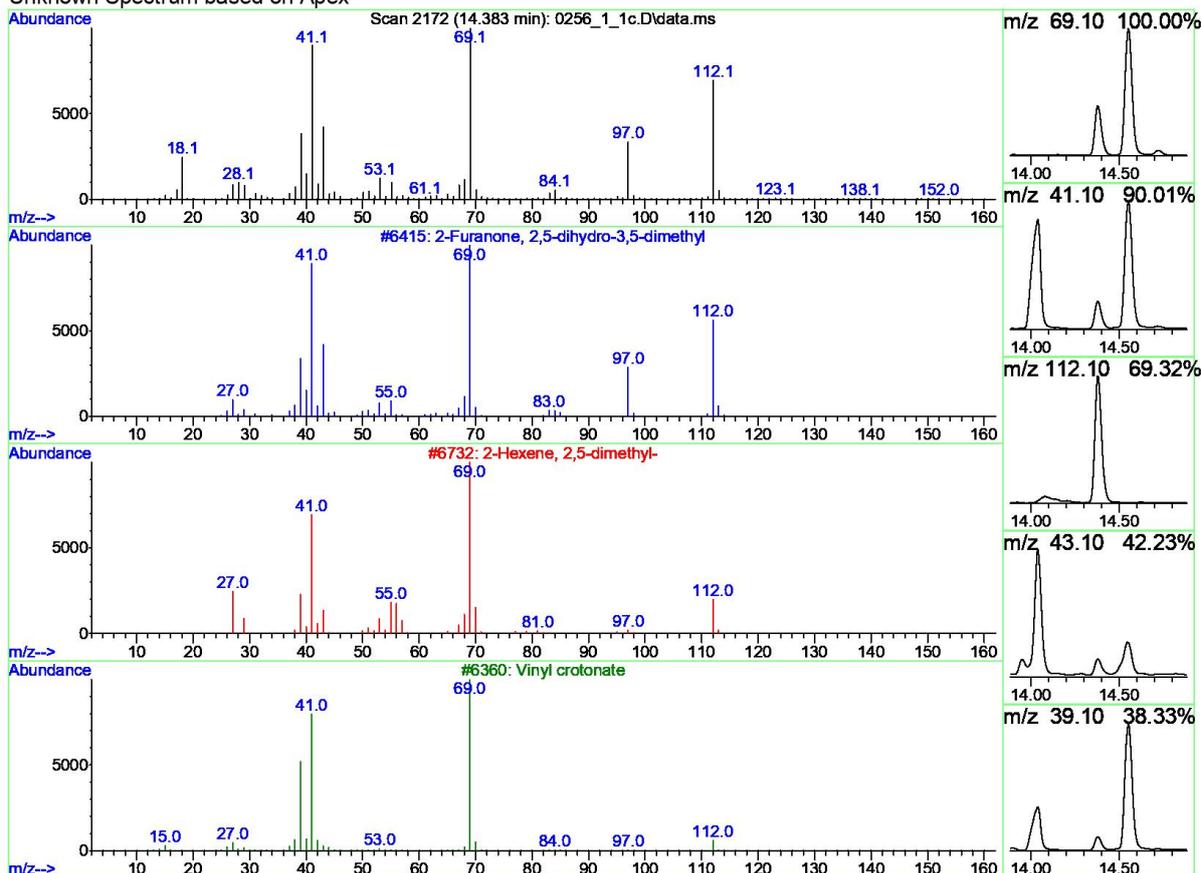
The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

C:\Database\NIST11.L

1 Pyridine, 3-methoxy-	5559	007295-76-3	91
2 2(1H)-Pyridinone, 1-methyl-	5578	000694-85-9	22
3 Pyridine, 3-methyl-, 1-oxide	5583	001003-73-2	12

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

Peak Number: 22 at 14.383 min Area: 50389471 Area % 0.25

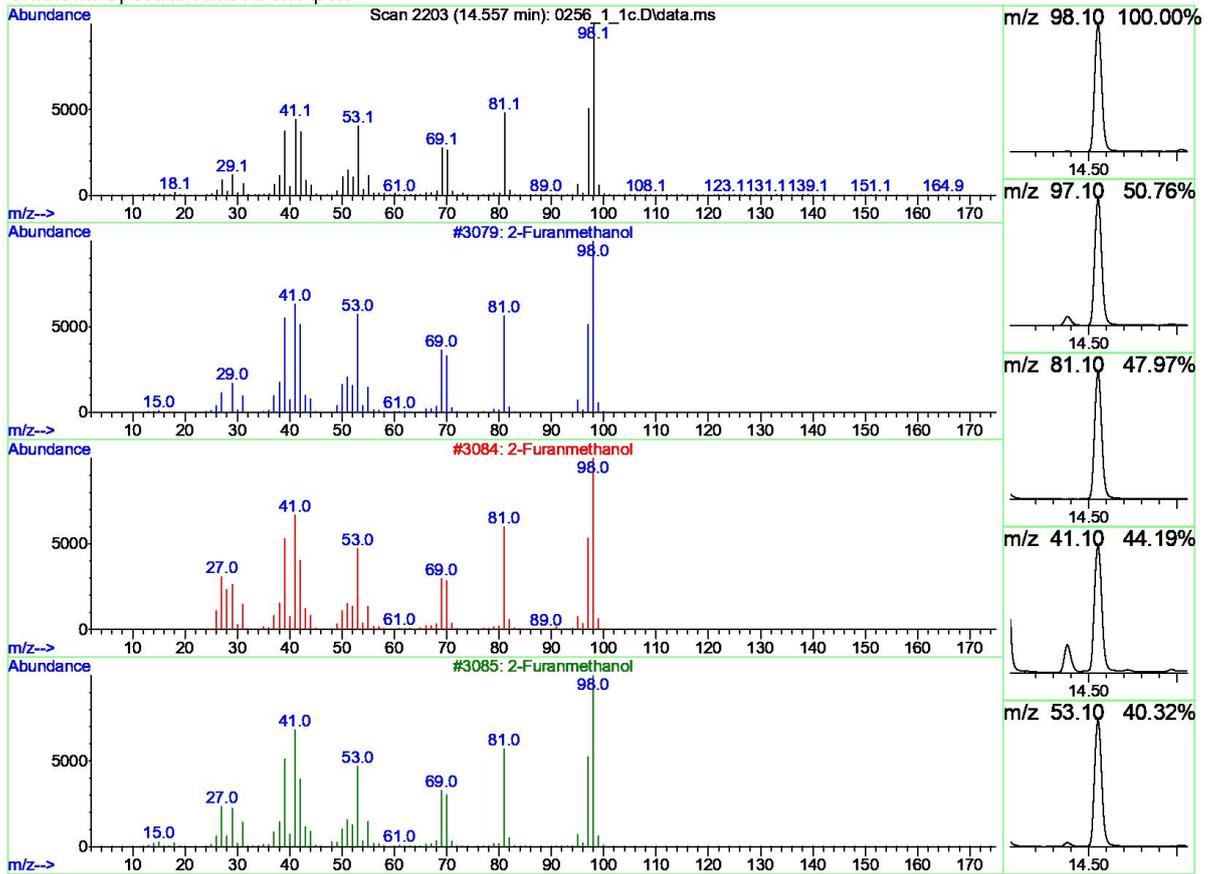
The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

C:\Database\NIST11.L

1	2-Furanone, 2,5-dihydro-3,5-dime...	6415	1000196-88-1	89
2	2-Hexene, 2,5-dimethyl-	6732	003404-78-2	50
3	Vinyl crotonate	6360	014861-06-4	47

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

Peak Number: 23 at 14.557 min Area: 609869639 Area % 3.08

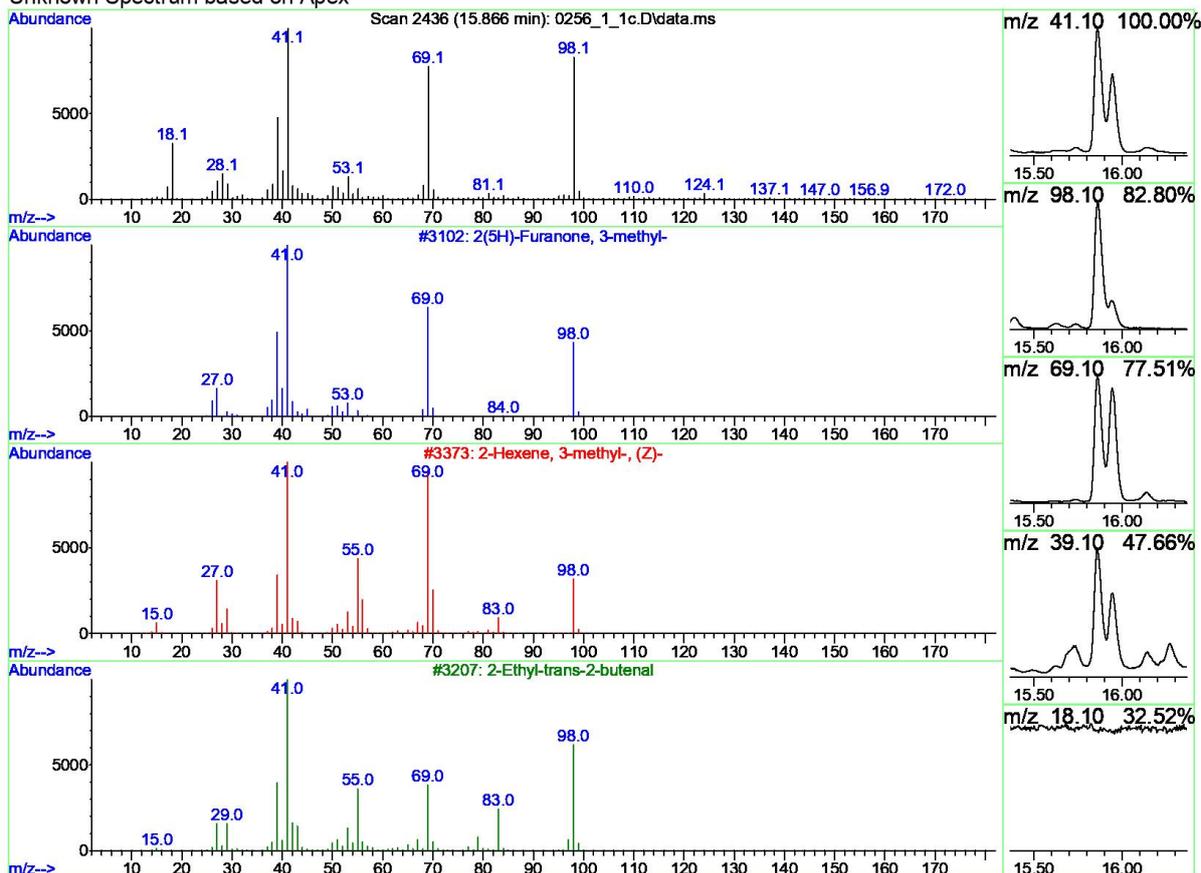
The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

C:\Database\NIST11.L

1	2-Furanmethanol	3079	000098-00-0	97
2	2-Furanmethanol	3084	000098-00-0	95
3	2-Furanmethanol	3085	000098-00-0	94

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

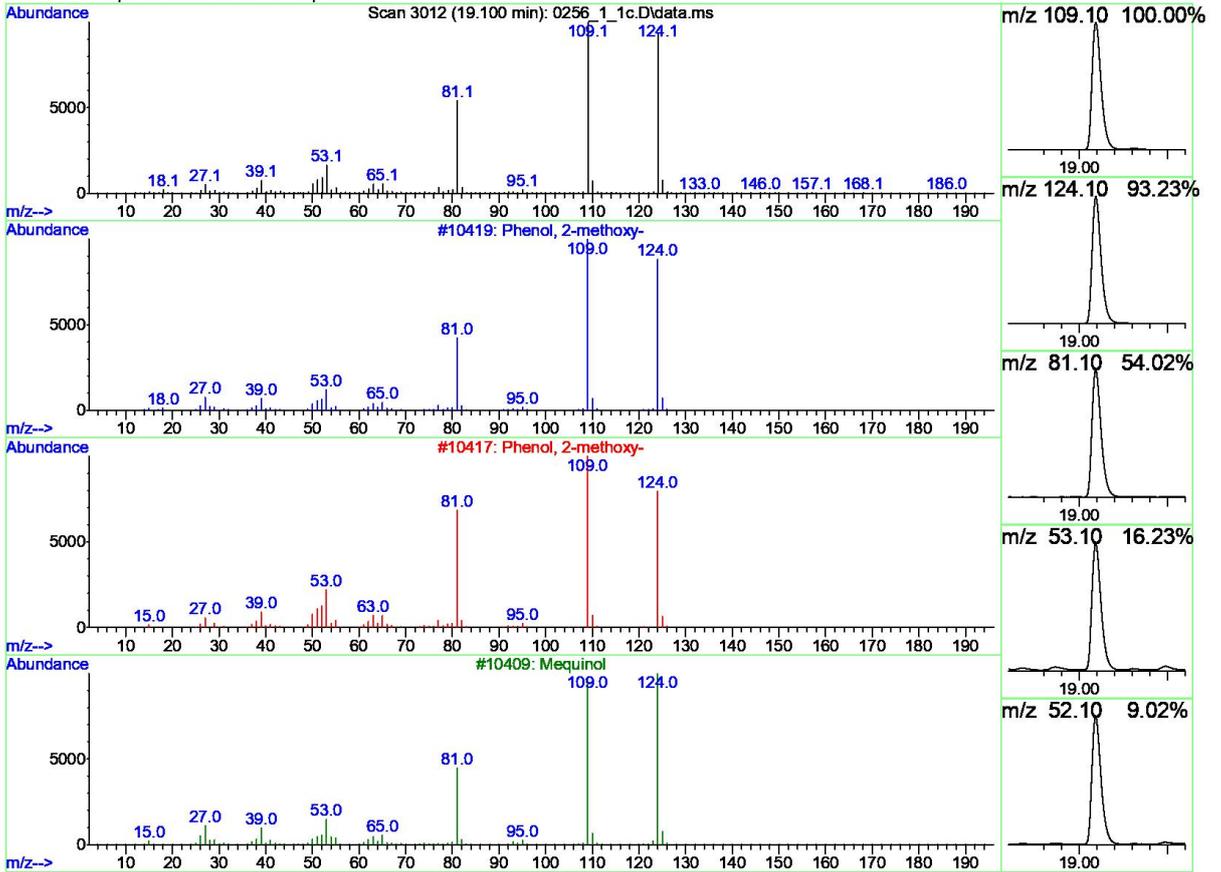
Peak Number: 25 at 15.866 min Area: 42105691 Area % 0.21

The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

Library	Ref#	CAS#	Qual
C:\Database\NIST11.L			
1 2(5H)-Furanone, 3-methyl-	3102	022122-36-7	91
2 2-Hexene, 3-methyl-, (Z)-	3373	010574-36-4	64
3 2-Ethyl-trans-2-butenal	3207	063883-69-2	50

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



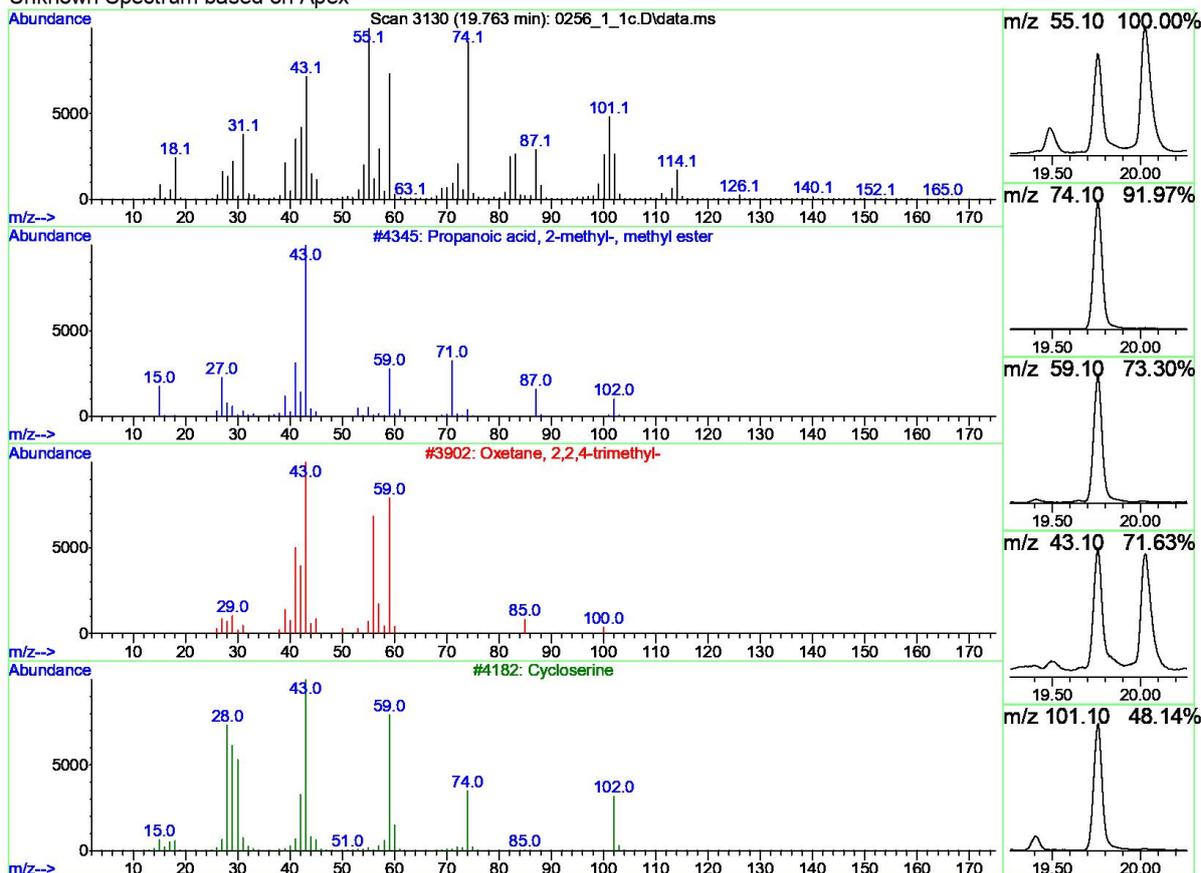
Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D
 Sample : 0256_1_1

Peak Number: 34 at 19.100 min Area: 476368770 Area % 2.40

The 3 best hits from each library.	Ref#	CAS#	Qual
C:\Database\NIST11.L			
1 Phenol, 2-methoxy-	10419	000090-05-1	97
2 Phenol, 2-methoxy-	10417	000090-05-1	94
3 Mequinol	10409	000150-76-5	93

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

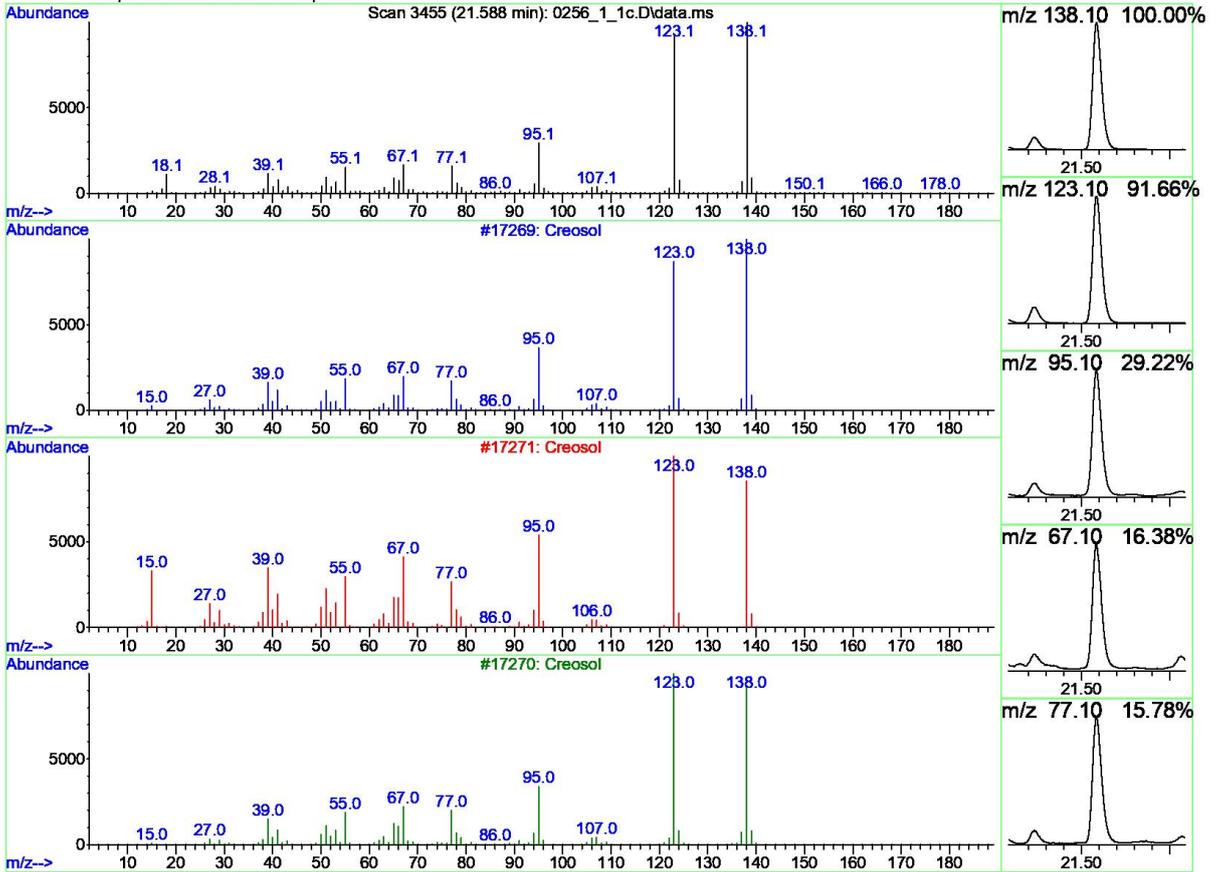
Peak Number: 35 at 19.763 min Area: 130920759 Area % 0.66

The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

Library	Ref#	CAS#	Qual
C:\Database\NIST11.L			
1 Propanoic acid, 2-methyl-, methy...	4345	000547-63-7	27
2 Oxetane, 2,2,4-trimethyl-	3902	023120-44-7	27
3 Cycloserine	4182	000068-41-7	27

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D
 Sample : 0256_1_1

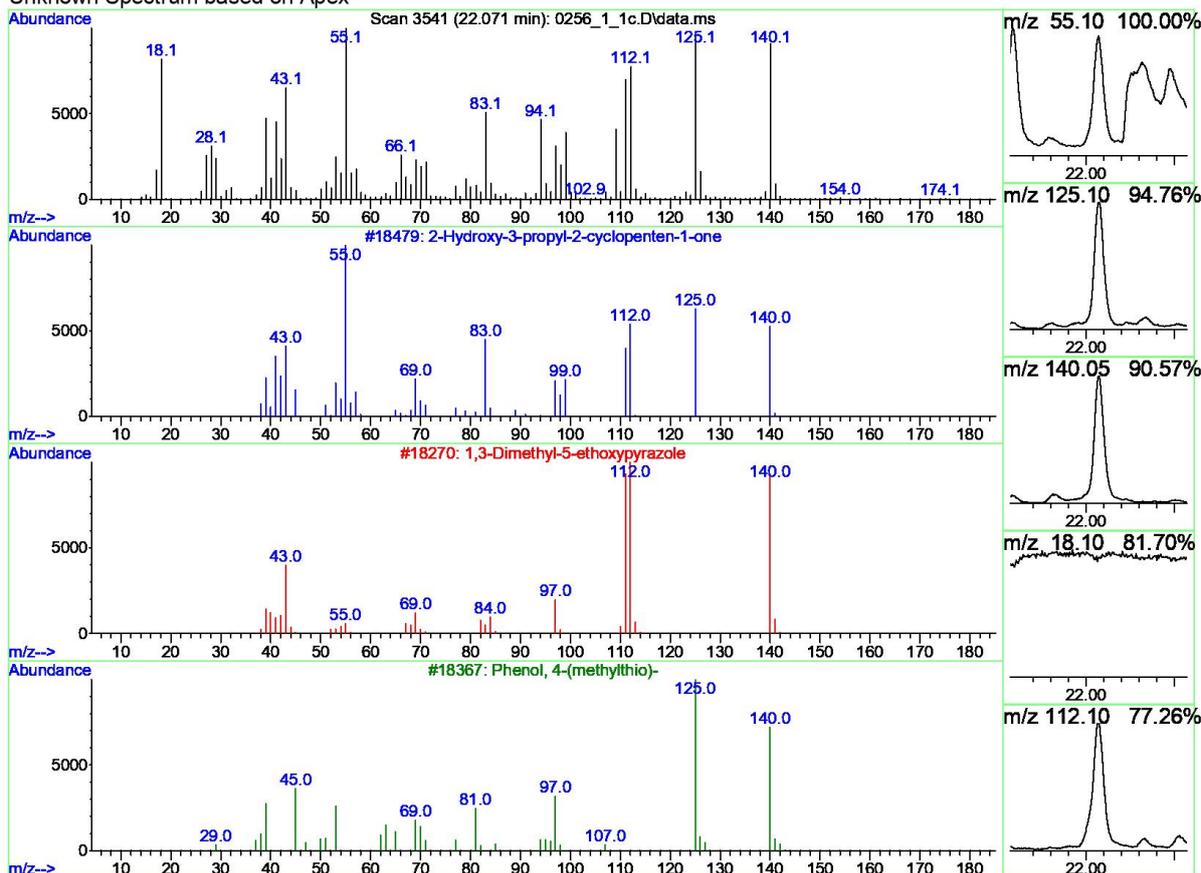
Peak Number: 37 at 21.588 min Area: 130193366 Area % 0.66

The 3 best hits from each library.	Ref#	CAS#	Qual

C:\Database\NIST11.L			
1 Creosol	17269	000093-51-6	96
2 Creosol	17271	000093-51-6	95
3 Creosol	17270	000093-51-6	95

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

Peak Number: 38 at 22.071 min Area: 54356531 Area % 0.27

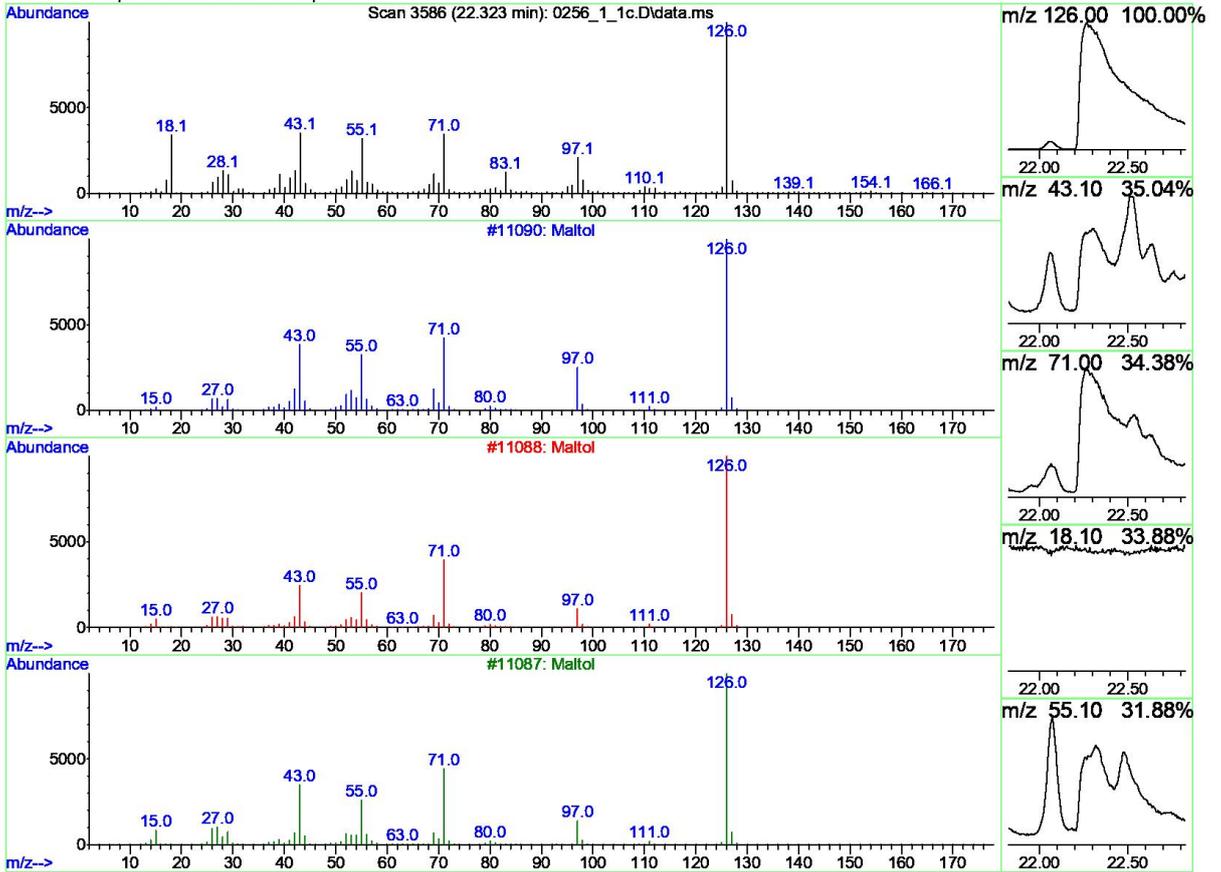
The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

C:\Database\NIST11.L

Rank	Library Name	Ref#	CAS#	Qual
1	2-Hydroxy-3-propyl-2-cyclopenten...	18479	025684-04-2	92
2	1,3-Dimethyl-5-ethoxypyrazole	18270	1000306-48-4	42
3	Phenol, 4-(methylthio)-	18367	001073-72-9	30

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D
 Sample : 0256_1_1

Peak Number: 39 at 22.323 min Area: 88353448 Area % 0.45

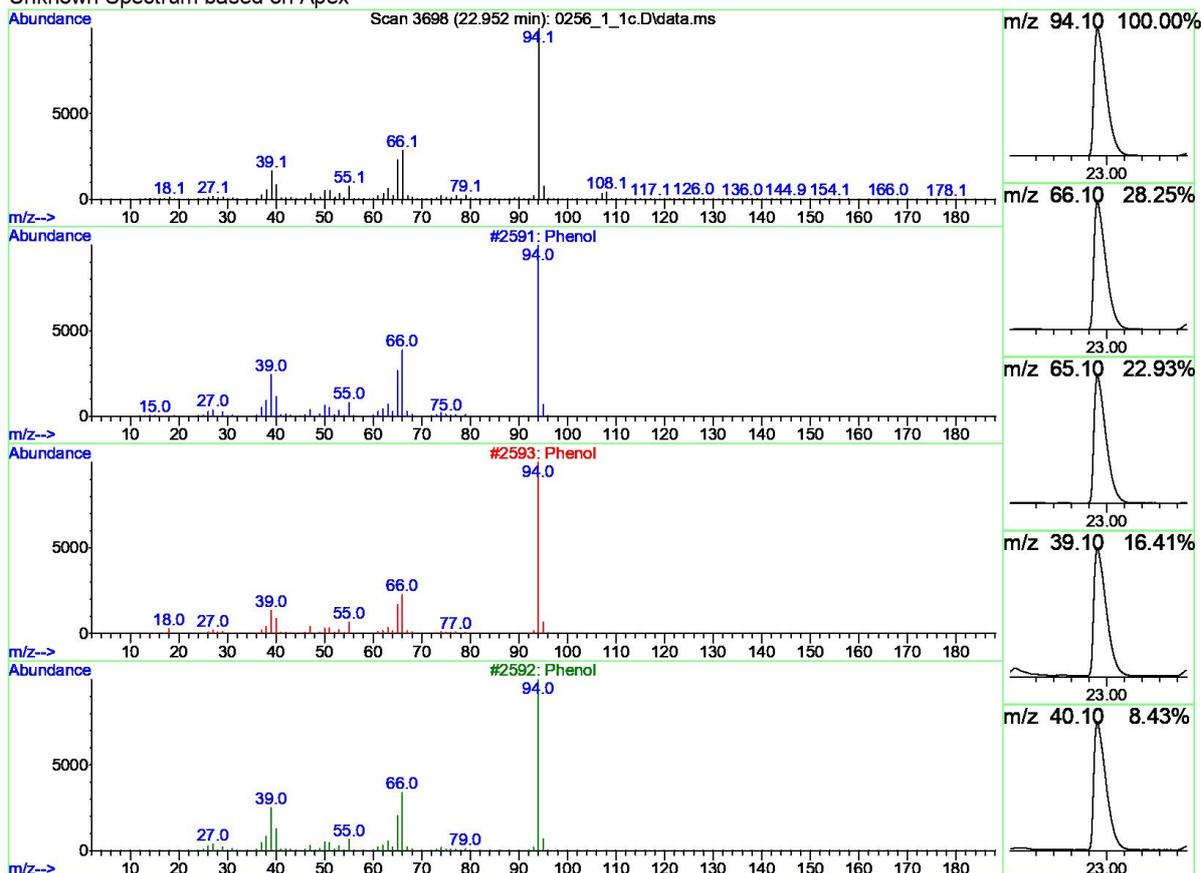
The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

C:\Database\NIST11.L

1 Maltol	11090	000118-71-8	94
2 Maltol	11088	000118-71-8	62
3 Maltol	11087	000118-71-8	62

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

Peak Number: 41 at 22.952 min Area: 763832598 Area % 3.85

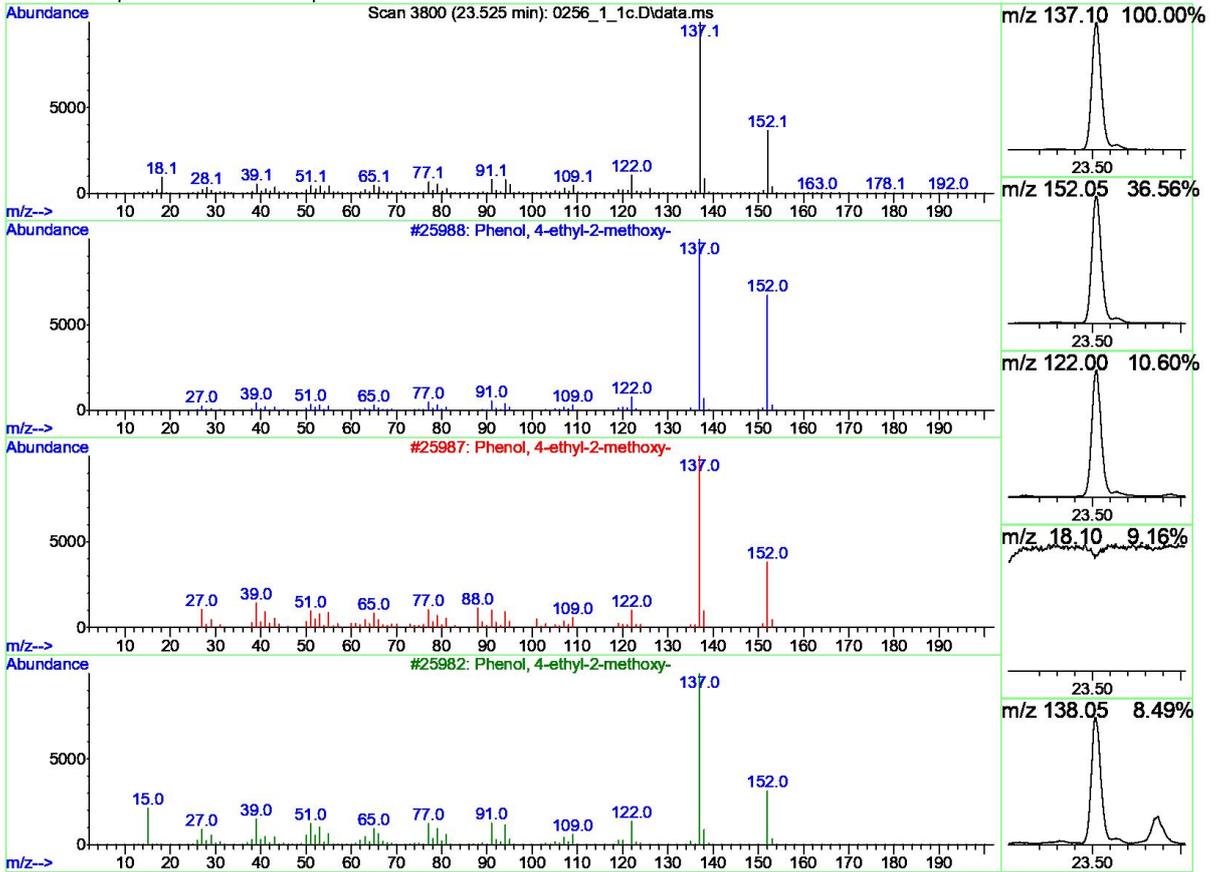
The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

C:\Database\NIST11.L

1 Phenol	2591	000108-95-2	95
2 Phenol	2593	000108-95-2	91
3 Phenol	2592	000108-95-2	90

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



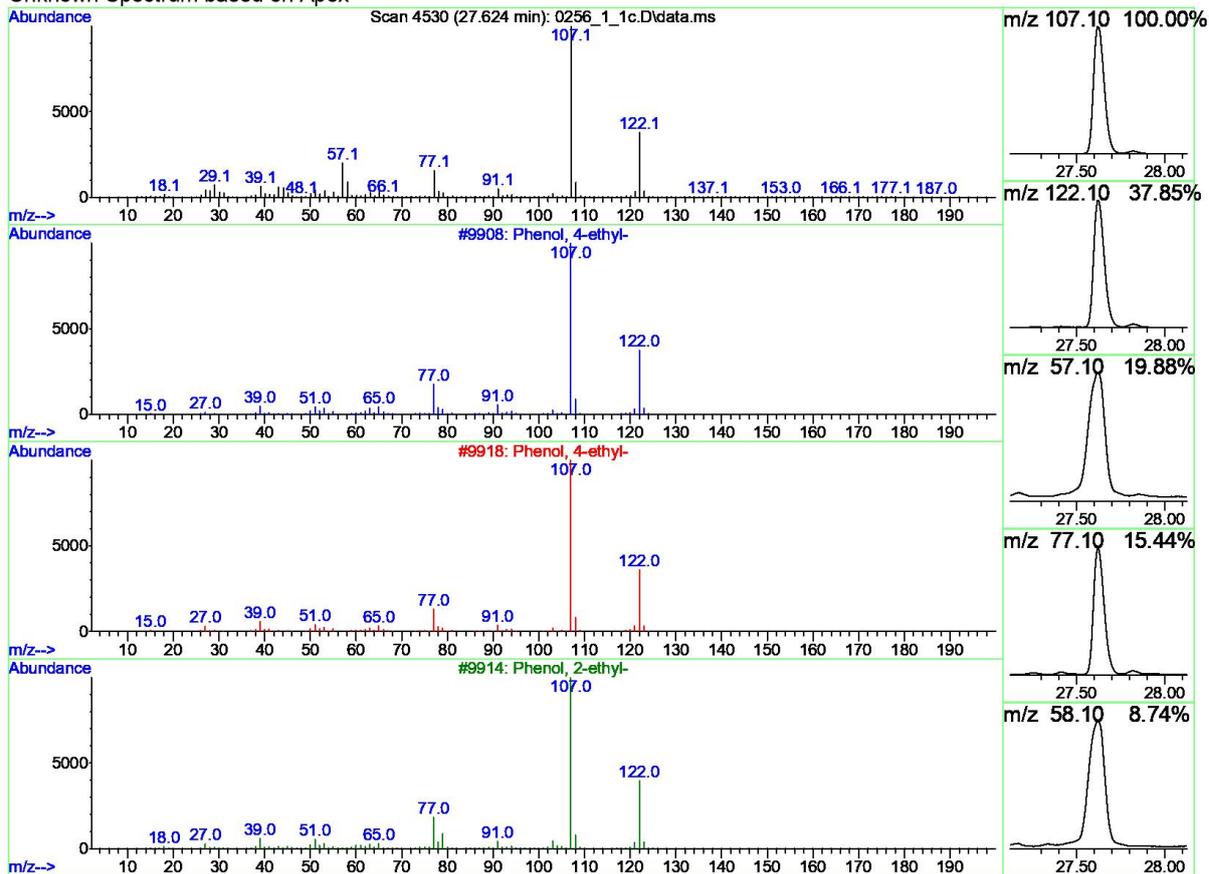
Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D
 Sample : 0256_1_1

Peak Number: 42 at 23.525 min Area: 117721921 Area % 0.59

The 3 best hits from each library.	Ref#	CAS#	Qual
C:\Database\NIST11.L			
1 Phenol, 4-ethyl-2-methoxy-	25988	002785-89-9	91
2 Phenol, 4-ethyl-2-methoxy-	25987	002785-89-9	91
3 Phenol, 4-ethyl-2-methoxy-	25982	002785-89-9	90

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

Peak Number: 48 at 27.624 min Area: 614425262 Area % 3.10

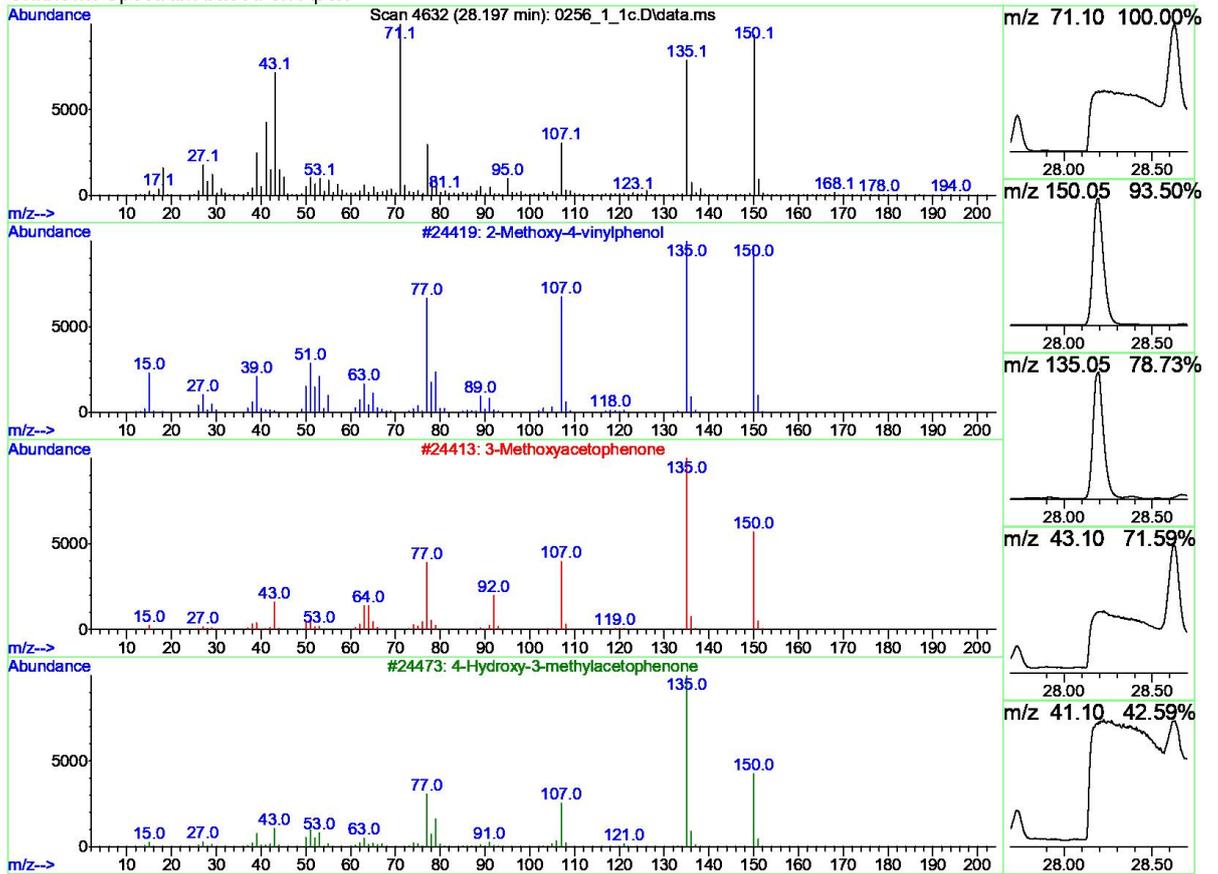
The 3 best hits from each library.

Ref#	CAS#	Qual

C:\Database\NIST11.L		
1	9908 000123-07-9	95
2	9918 000123-07-9	94
3	9914 000090-00-6	91

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D
 Sample : 0256_1_1

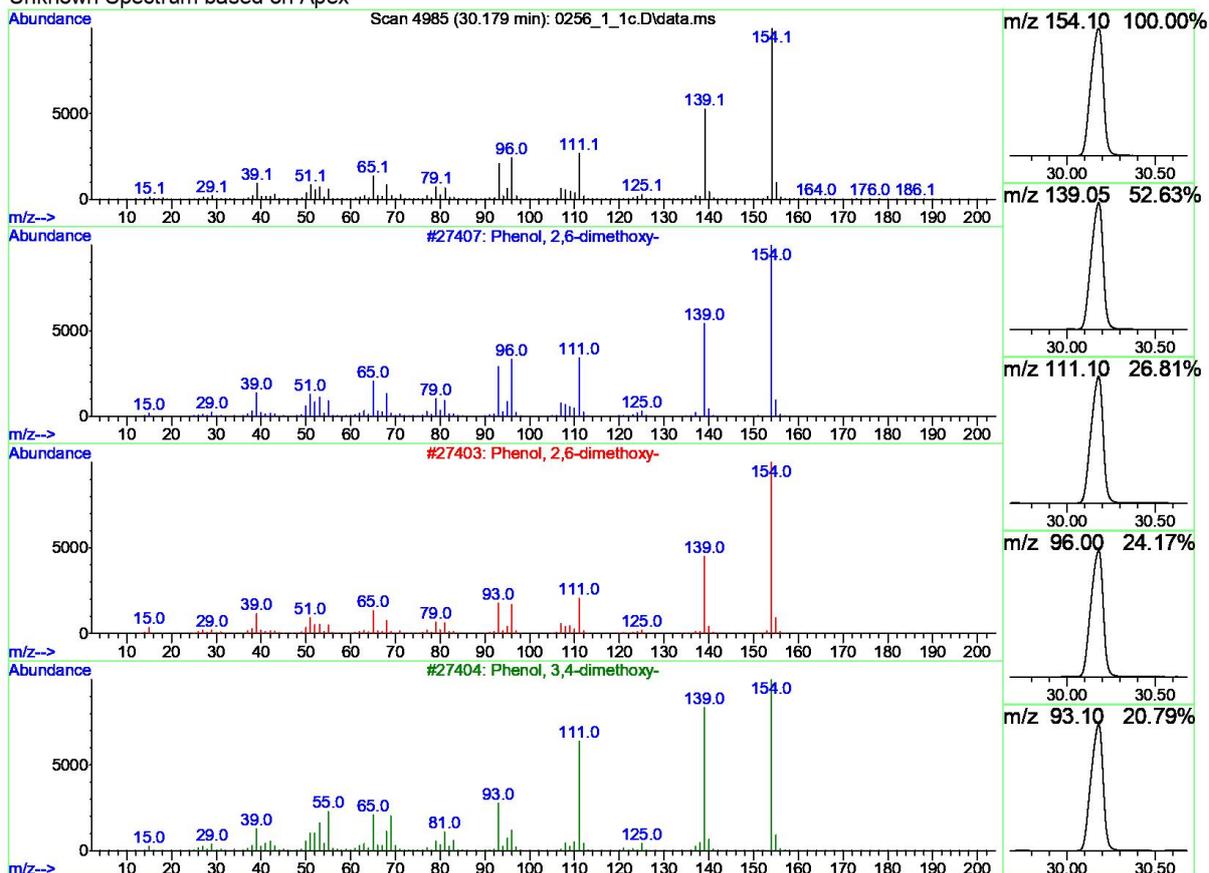
Peak Number: 49 at 28.197 min Area: 260931915 Area % 1.32

The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

Library Name	Ref#	CAS#	Qual
C:\Database\NIST11.L			
1 2-Methoxy-4-vinylphenol	24419	007786-61-0	93
2 3-Methoxyacetophenone	24413	000586-37-8	50
3 4-Hydroxy-3-methylacetophenone	24473	000876-02-8	38

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

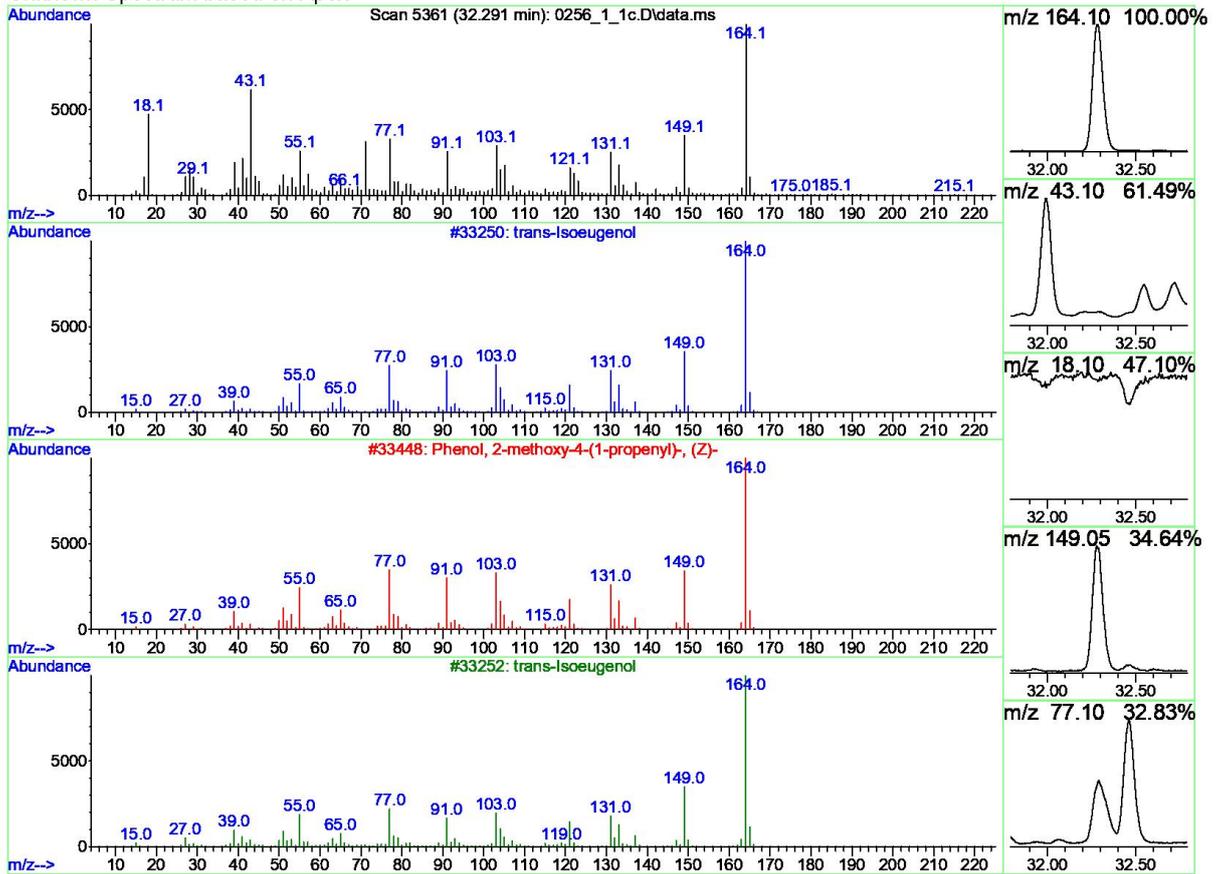
Peak Number: 54 at 30.179 min Area: 1350581042 Area % 6.81

The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

Library	Ref#	CAS#	Qual
C:\Database\NIST11.L			
1 Phenol, 2,6-dimethoxy-	27407	000091-10-1	97
2 Phenol, 2,6-dimethoxy-	27403	000091-10-1	96
3 Phenol, 3,4-dimethoxy-	27404	002033-89-8	83

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



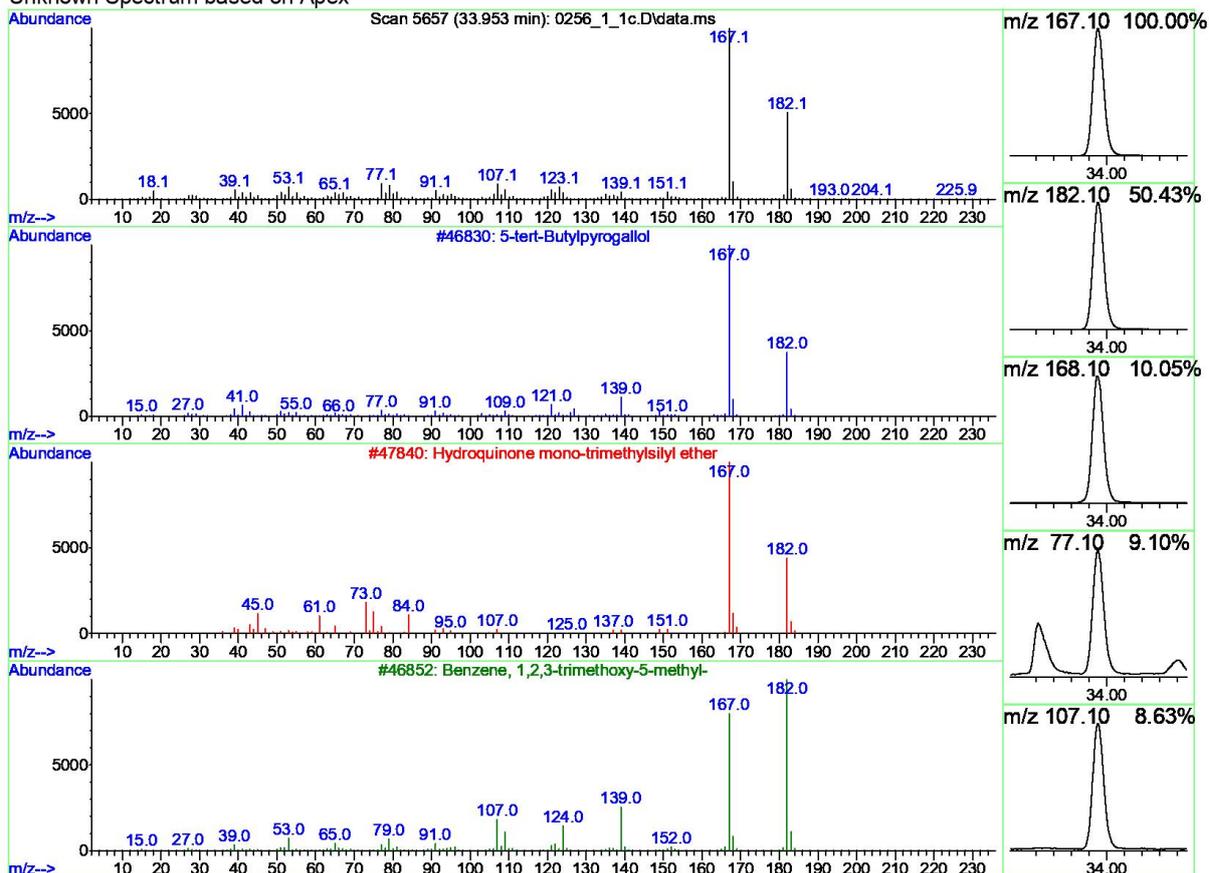
Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D
 Sample : 0256_1_1

Peak Number: 59 at 32.291 min Area: 56937503 Area % 0.29

The 3 best hits from each library.	Ref#	CAS#	Qual
C:\Database\NIST11.L			
1 trans-Isoeugenol	33250	005932-68-3	98
2 Phenol, 2-methoxy-4-(1-propenyl)...	33448	005912-86-7	98
3 trans-Isoeugenol	33252	005932-68-3	97

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

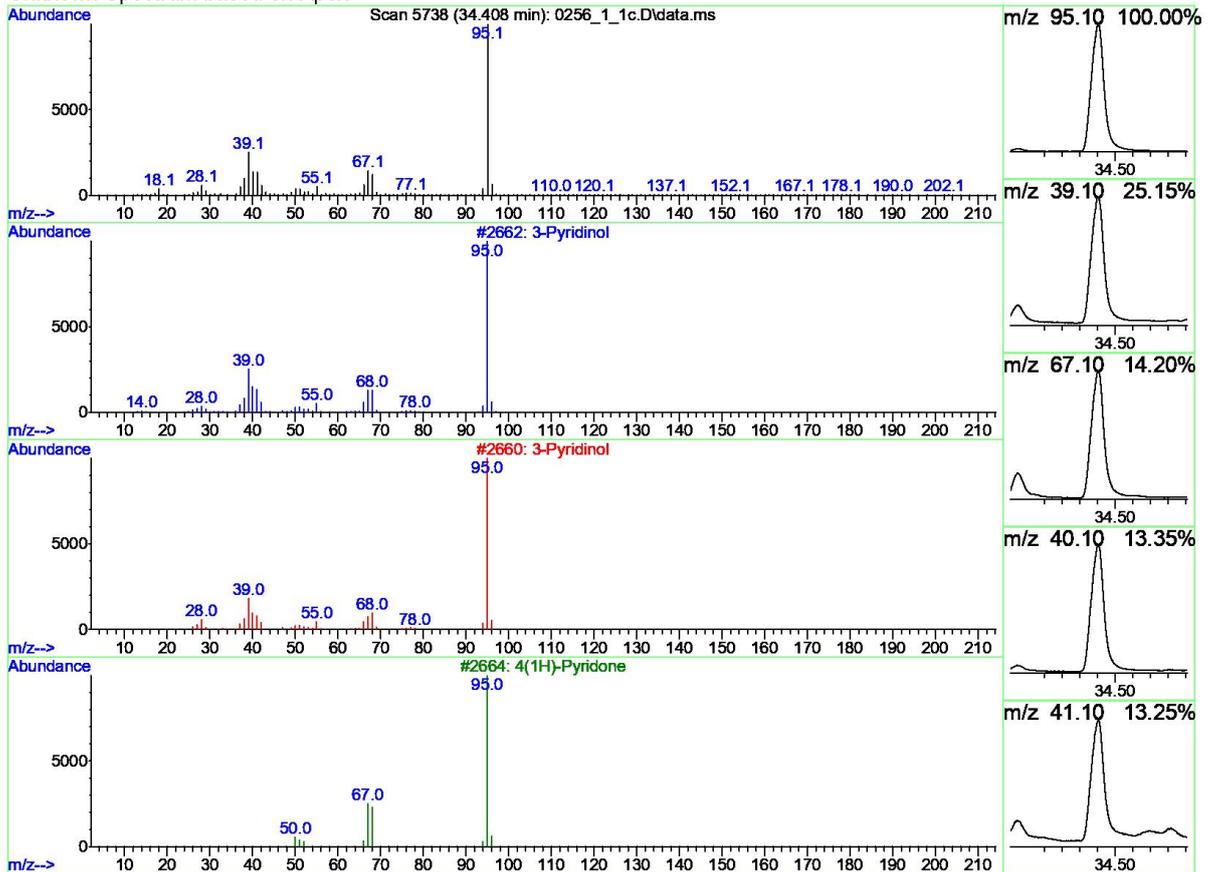
Peak Number: 63 at 33.953 min Area: 254643333 Area % 1.28

The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

Library	Ref#	CAS#	Qual
C:\Database\NIST11.L	1	5-tert-Butylpyrogallol	46830 020481-17-8 72
	2	Hydroquinone mono-trimethylsilyl...	47840 017881-87-7 72
	3	Benzene, 1,2,3-trimethoxy-5-methyl-	46852 006443-69-2 72

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D
 Sample : 0256_1_1

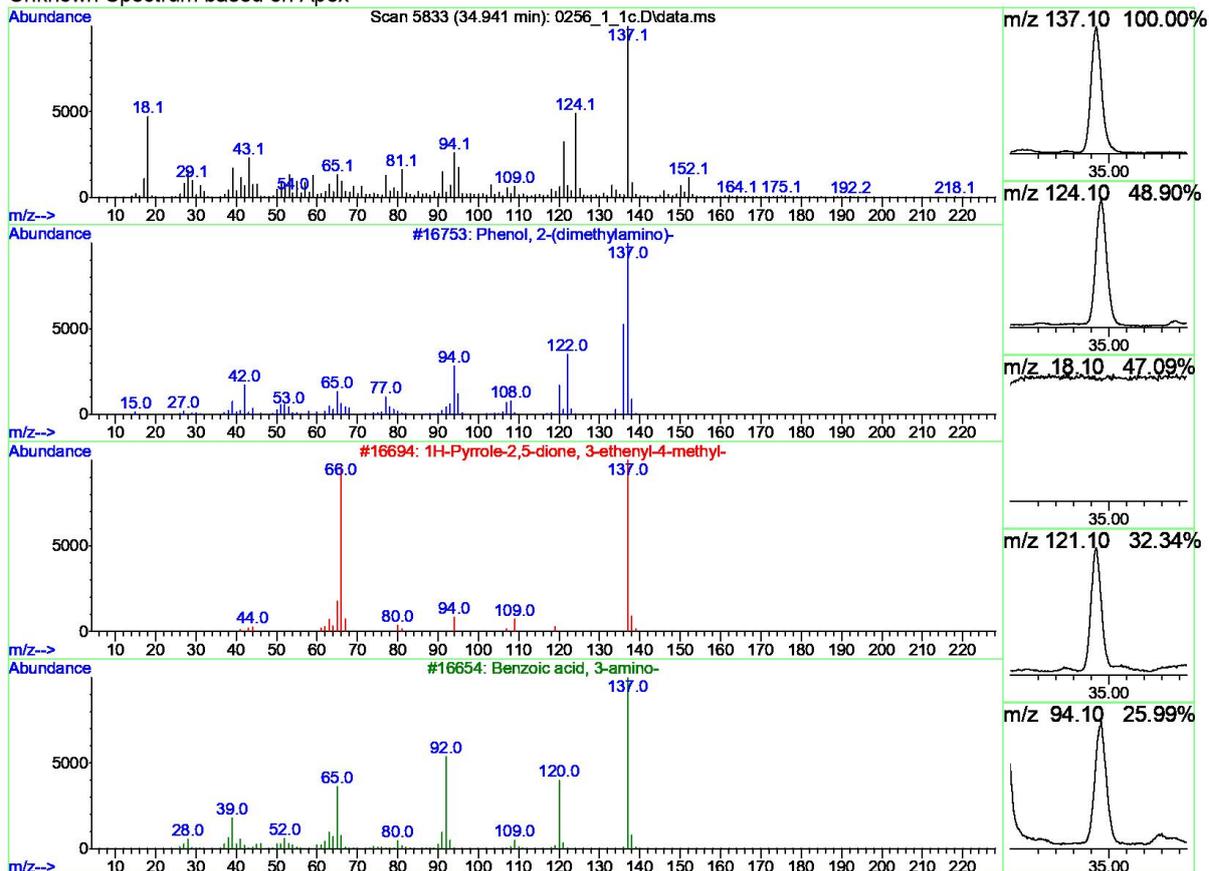
Peak Number: 64 at 34.408 min Area: 284036100 Area % 1.43

The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

C:\Database\NIST11.L			
1	3-Pyridinol	2662 000109-00-2	94
2	3-Pyridinol	2660 000109-00-2	91
3	4(1H)-Pyridone	2664 000108-96-3	83

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

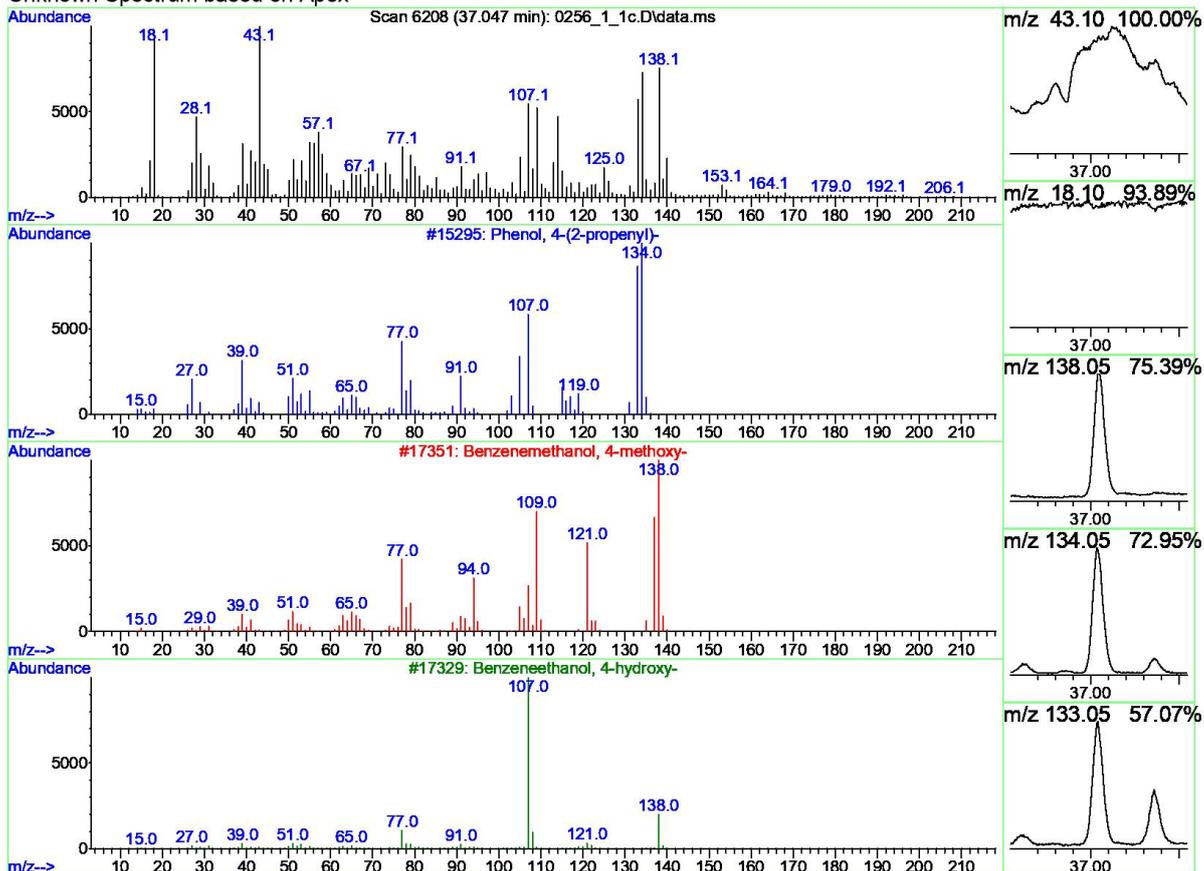
Peak Number: 65 at 34.941 min Area: 31307477 Area % 0.16

The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

Library	Ref#	CAS#	Qual
C:\Database\NIST11.L			
1 Phenol, 2-(dimethylamino)-	16753	003743-22-4	52
2 1H-Pyrrole-2,5-dione, 3-ethenyl-...	16694	021494-57-5	46
3 Benzoic acid, 3-amino-	16654	000099-05-8	38

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

Peak Number: 68 at 37.047 min Area: 43260207 Area % 0.22

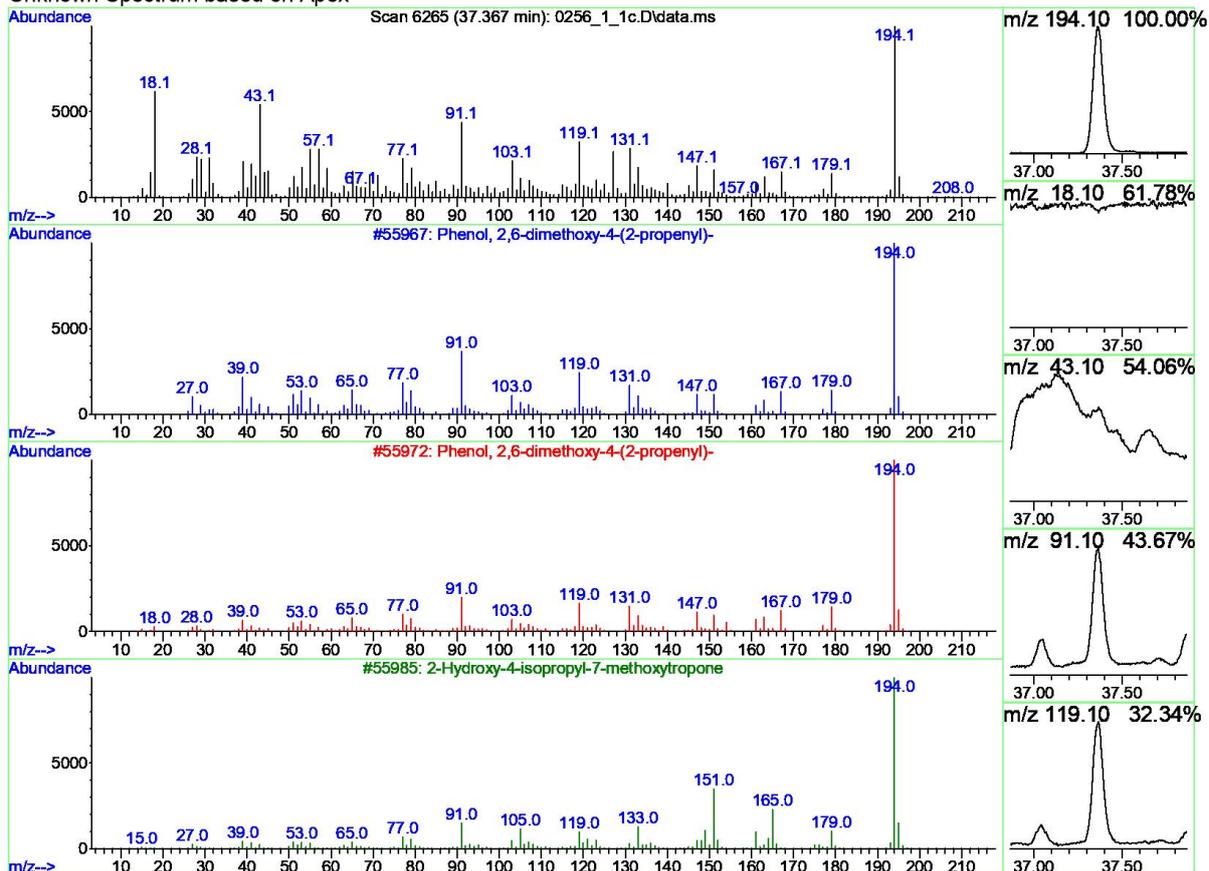
The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

C:\Database\NIST11.L

Ref#	CAS#	Qual
1	15295 000501-92-8	92
2	17351 000105-13-5	38
3	17329 000501-94-0	38

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

Peak Number: 69 at 37.367 min Area: 51066684 Area % 0.26

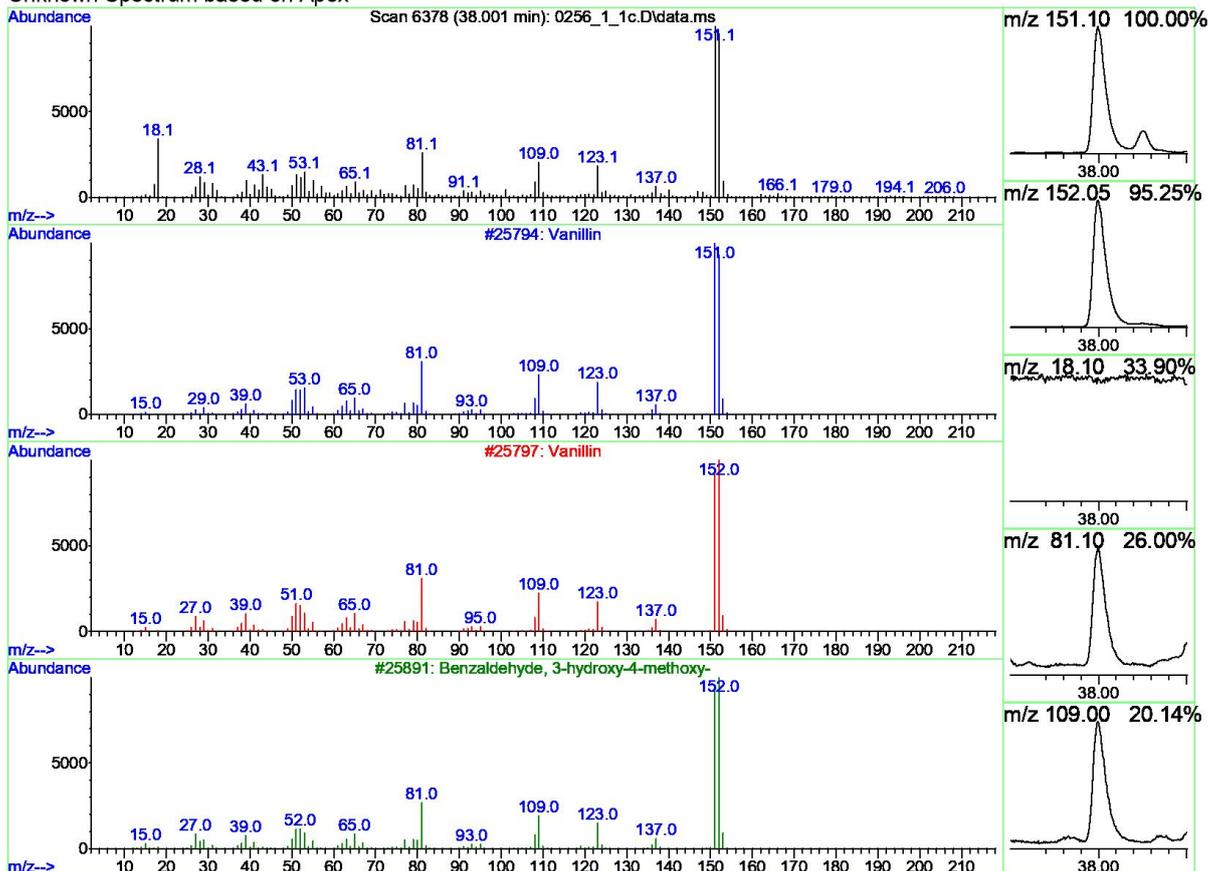
The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

C:\Database\NIST11.L

Ref#	CAS#	Qual
1	55967 006627-88-9	97
2	55972 006627-88-9	93
3	55985 089647-85-8	49

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

Peak Number: 70 at 38.001 min Area: 55523189 Area % 0.28

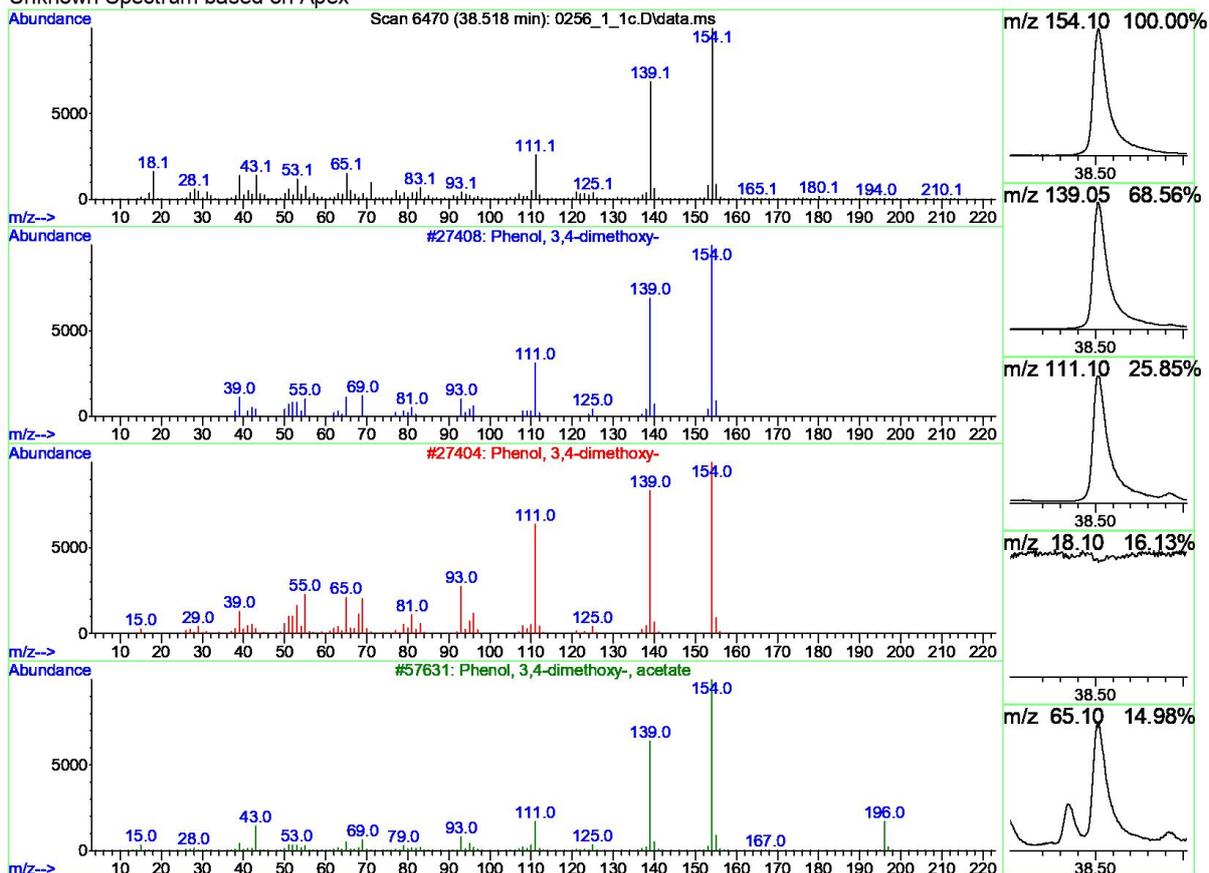
The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

C:\Database\NIST11.L

1	Vanillin	25794	000121-33-5	97
2	Vanillin	25797	000121-33-5	97
3	Benzaldehyde, 3-hydroxy-4-methoxy-	25891	000621-59-0	96

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

Peak Number: 72 at 38.518 min Area: 161809156 Area % 0.82

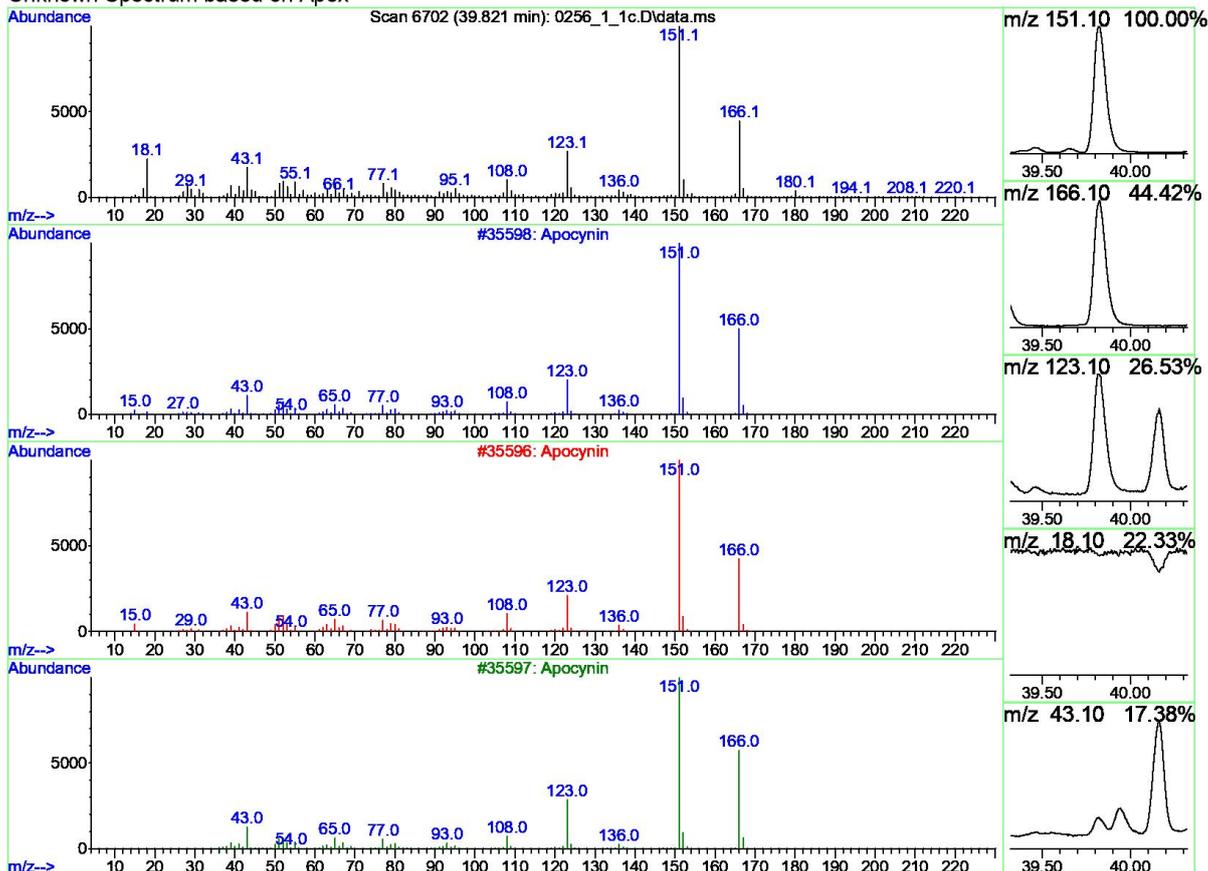
The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

C:\Database\NIST11.L

1	Phenol, 3,4-dimethoxy-	27408	002033-89-8	91
2	Phenol, 3,4-dimethoxy-	27404	002033-89-8	87
3	Phenol, 3,4-dimethoxy-, acetate	57631	007203-46-5	83

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

Peak Number: 73 at 39.821 min Area: 56012713 Area % 0.28

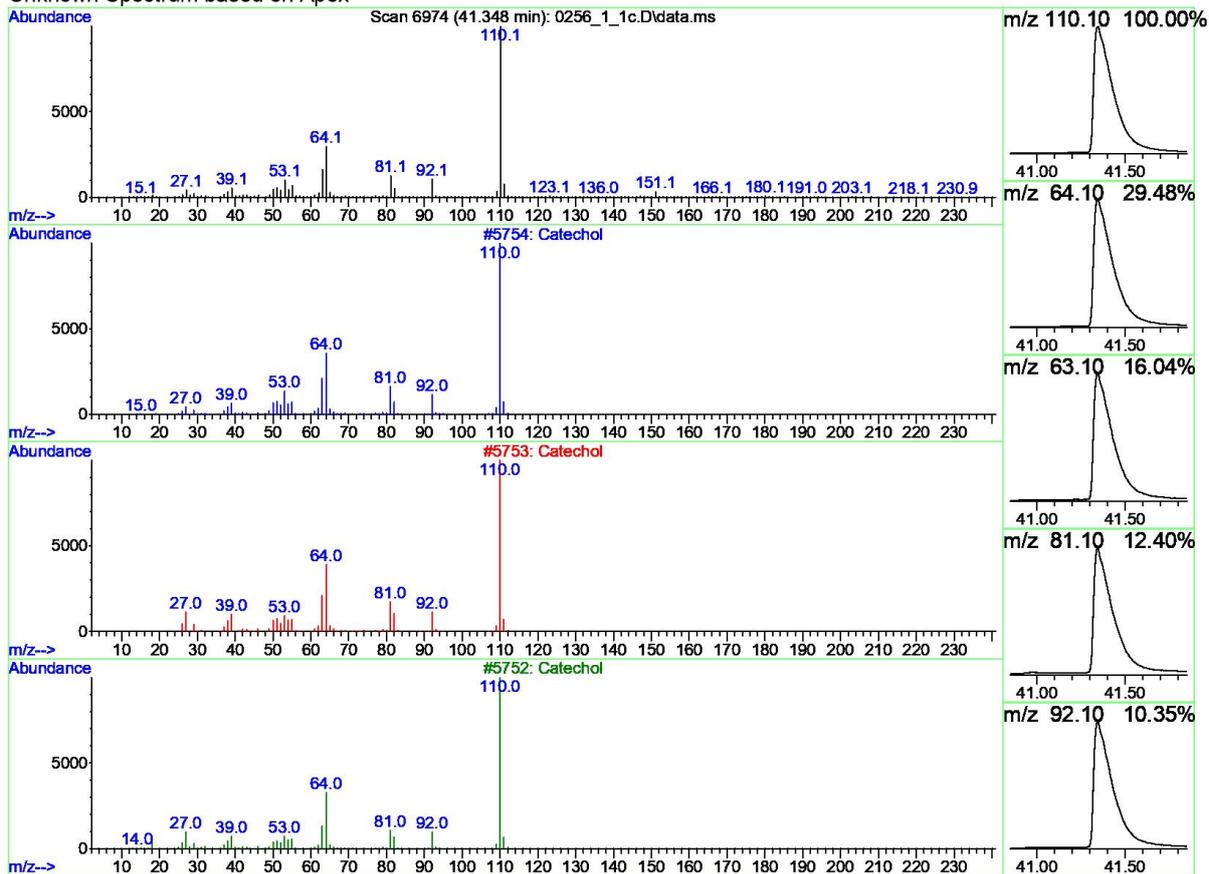
The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

C:\Database\NIST11.L

Ref#	CAS#	Qual
1	35598 000498-02-2	91
2	35596 000498-02-2	91
3	35597 000498-02-2	91

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

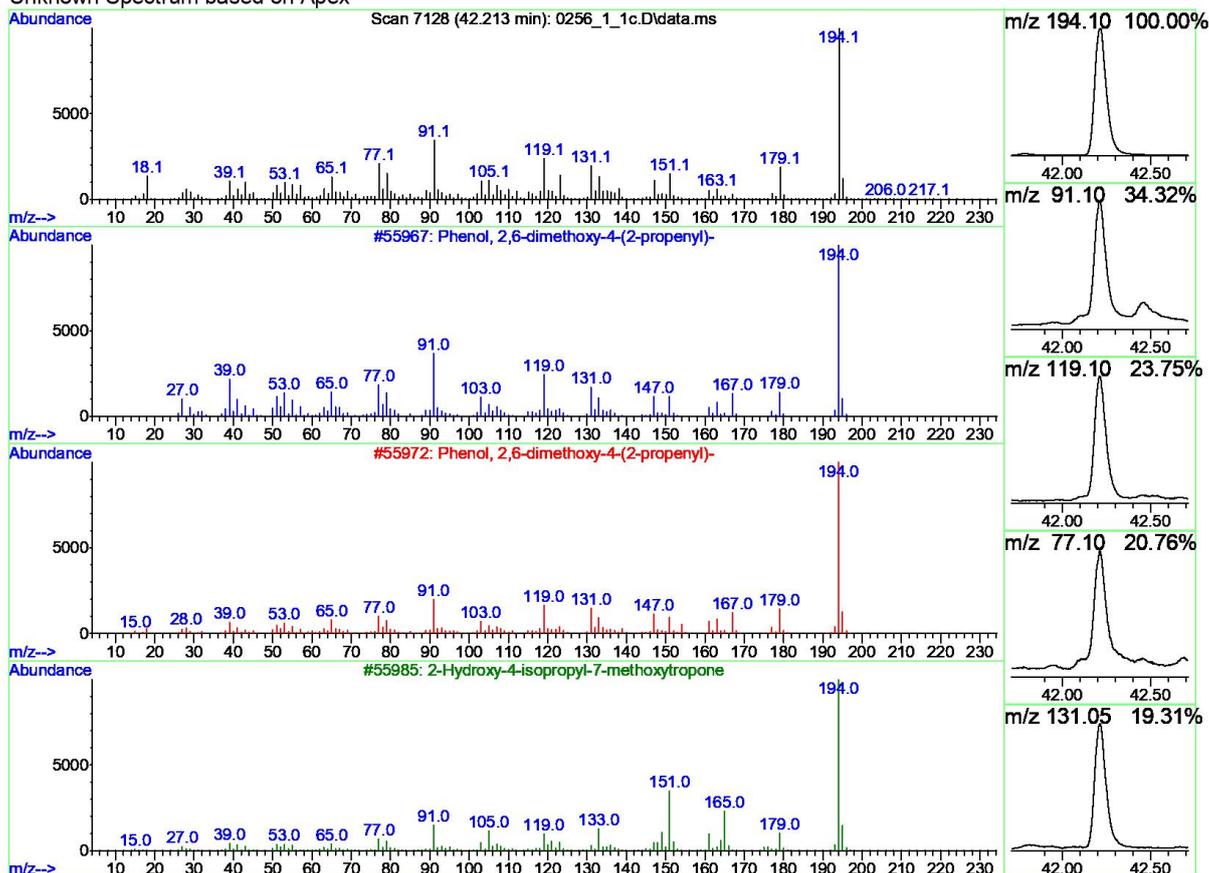
Peak Number: 78 at 41.348 min Area: 1022882711 Area % 5.16

The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

Library	Ref#	CAS#	Qual
C:\Database\NIST11.L			
1 Catechol	5754	000120-80-9	95
2 Catechol	5753	000120-80-9	93
3 Catechol	5752	000120-80-9	91

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

Peak Number: 79 at 42.213 min Area: 162423567 Area % 0.82

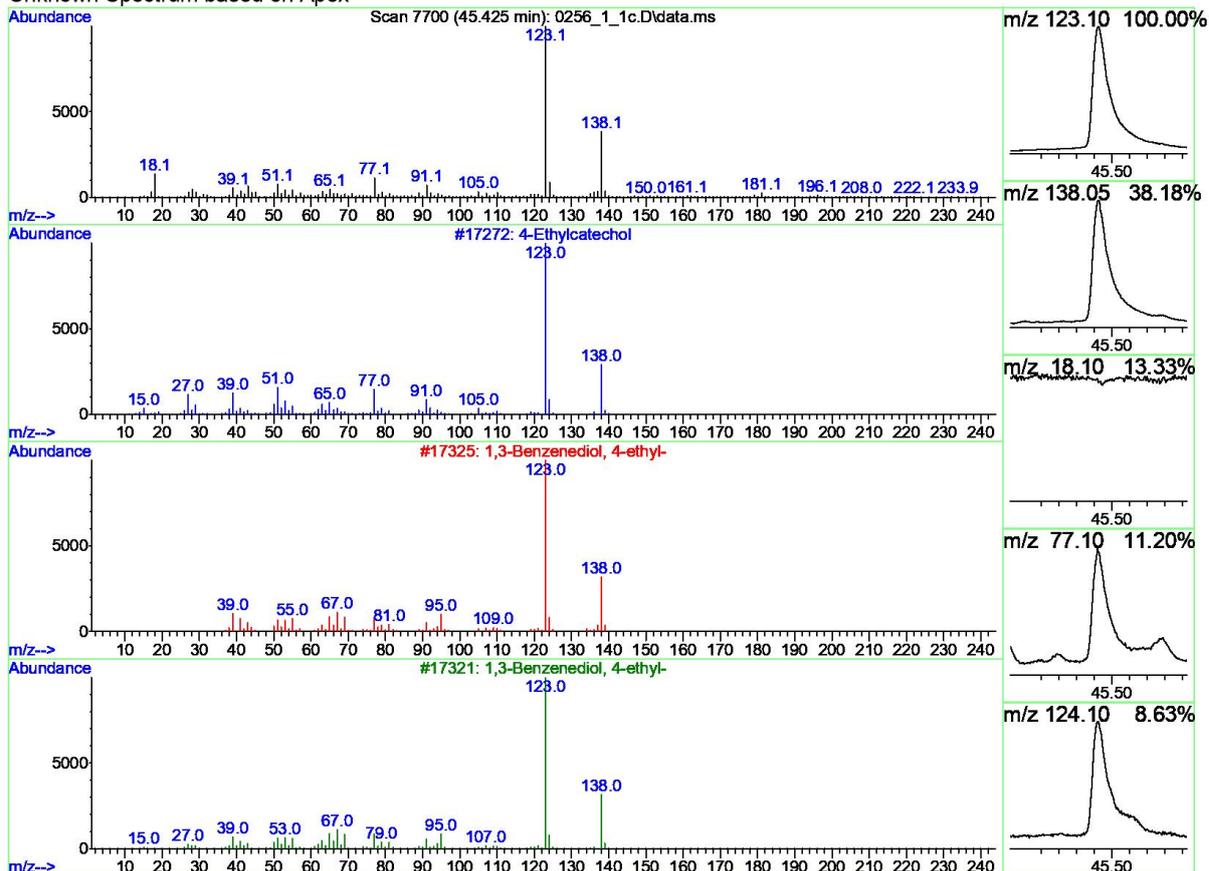
The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

C:\Database\NIST11.L

1	Phenol, 2,6-dimethoxy-4-(2-prope...	55967	006627-88-9	95
2	Phenol, 2,6-dimethoxy-4-(2-prope...	55972	006627-88-9	94
3	2-Hydroxy-4-isopropyl-7-methoxyt...	55985	089647-85-8	58

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

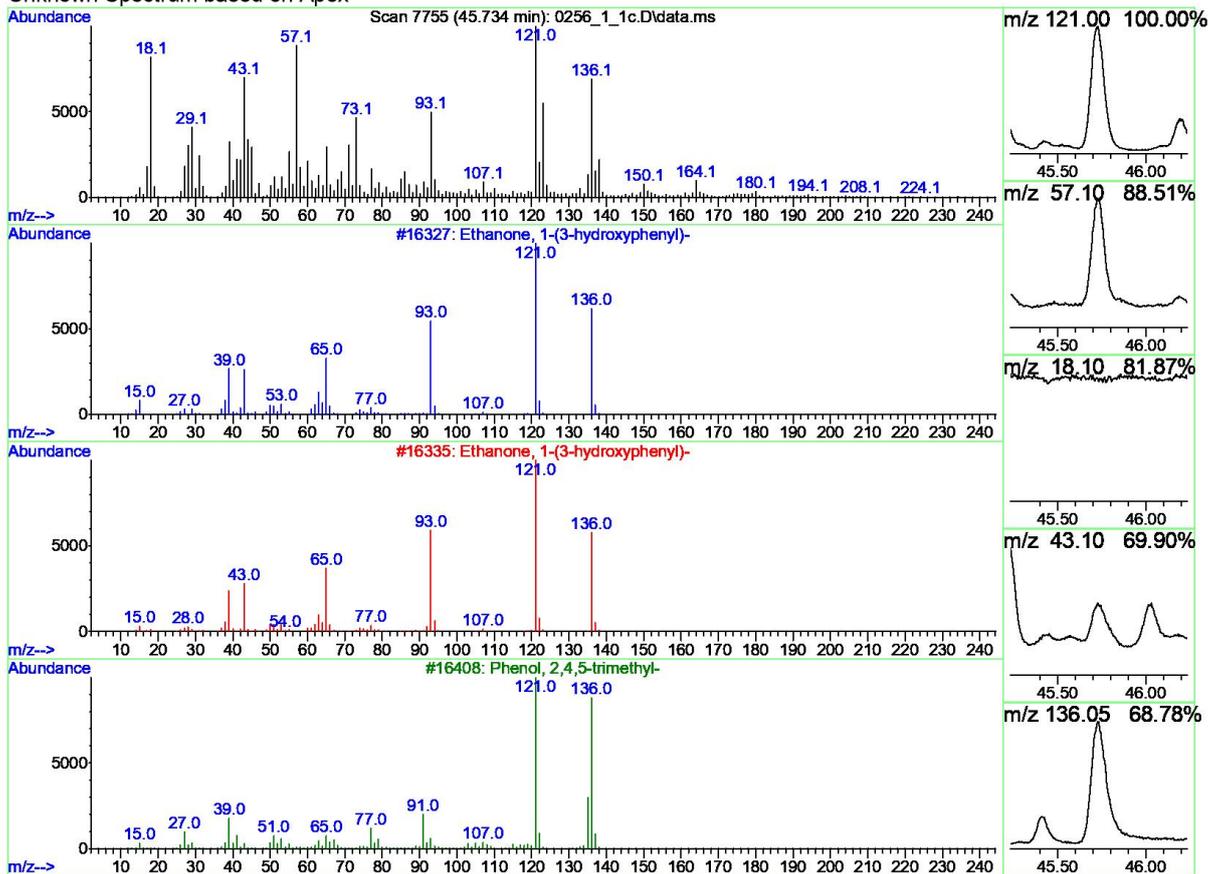
Peak Number: 81 at 45.425 min Area: 122583633 Area % 0.62

The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

Library	Ref#	CAS#	Qual
C:\Database\NIST11.L			
1 4-Ethylcatechol	17272	001124-39-6	87
2 1,3-Benzenediol, 4-ethyl-	17325	002896-60-8	80
3 1,3-Benzenediol, 4-ethyl-	17321	002896-60-8	80

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D
 Sample : 0256_1_1

Peak Number: 82 at 45.734 min Area: 71971679 Area % 0.36

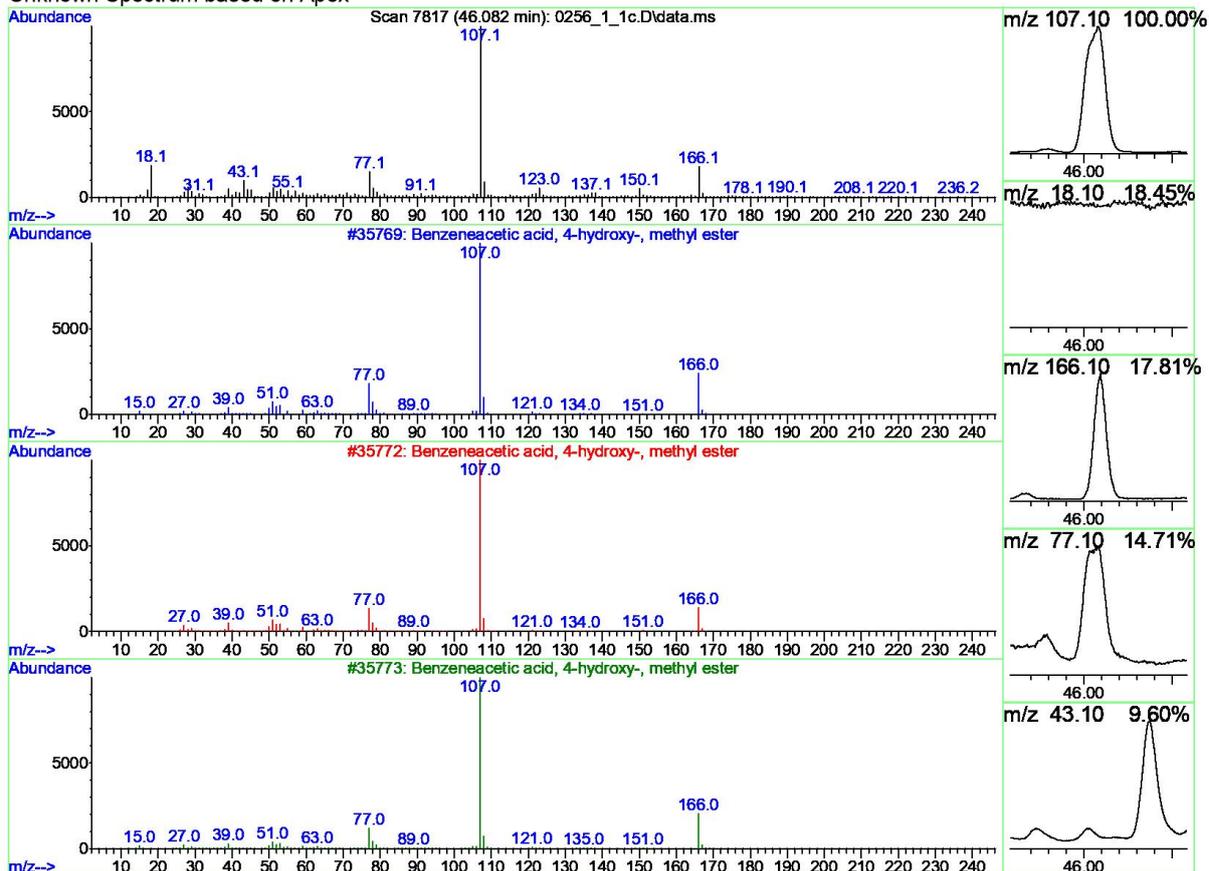
The 3 best hits from each library.

	Ref#	CAS#	Qual

C:\Database\NIST11.L			
1		Ethanone, 1-(3-hydroxyphenyl)-	16327 000121-71-1 55
2		Ethanone, 1-(3-hydroxyphenyl)-	16335 000121-71-1 53
3		Phenol, 2,4,5-trimethyl-	16408 000496-78-6 46

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

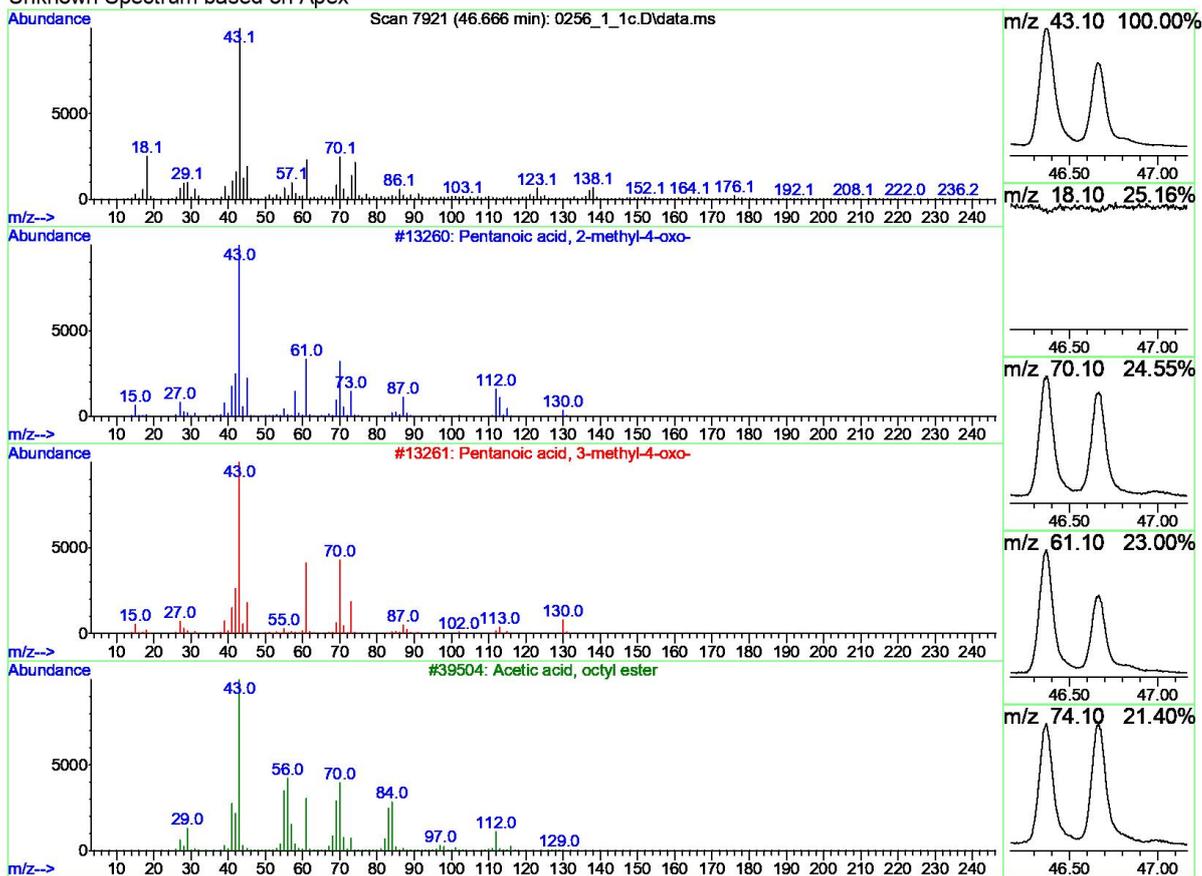
Peak Number: 83 at 46.082 min Area: 79685699 Area % 0.40

The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

Library	Ref#	CAS#	Qual
C:\Database\NIST11.L	1	35769 014199-15-6	94
C:\Database\NIST11.L	2	35772 014199-15-6	87
C:\Database\NIST11.L	3	35773 014199-15-6	87

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D
 Sample : 0256_1_1

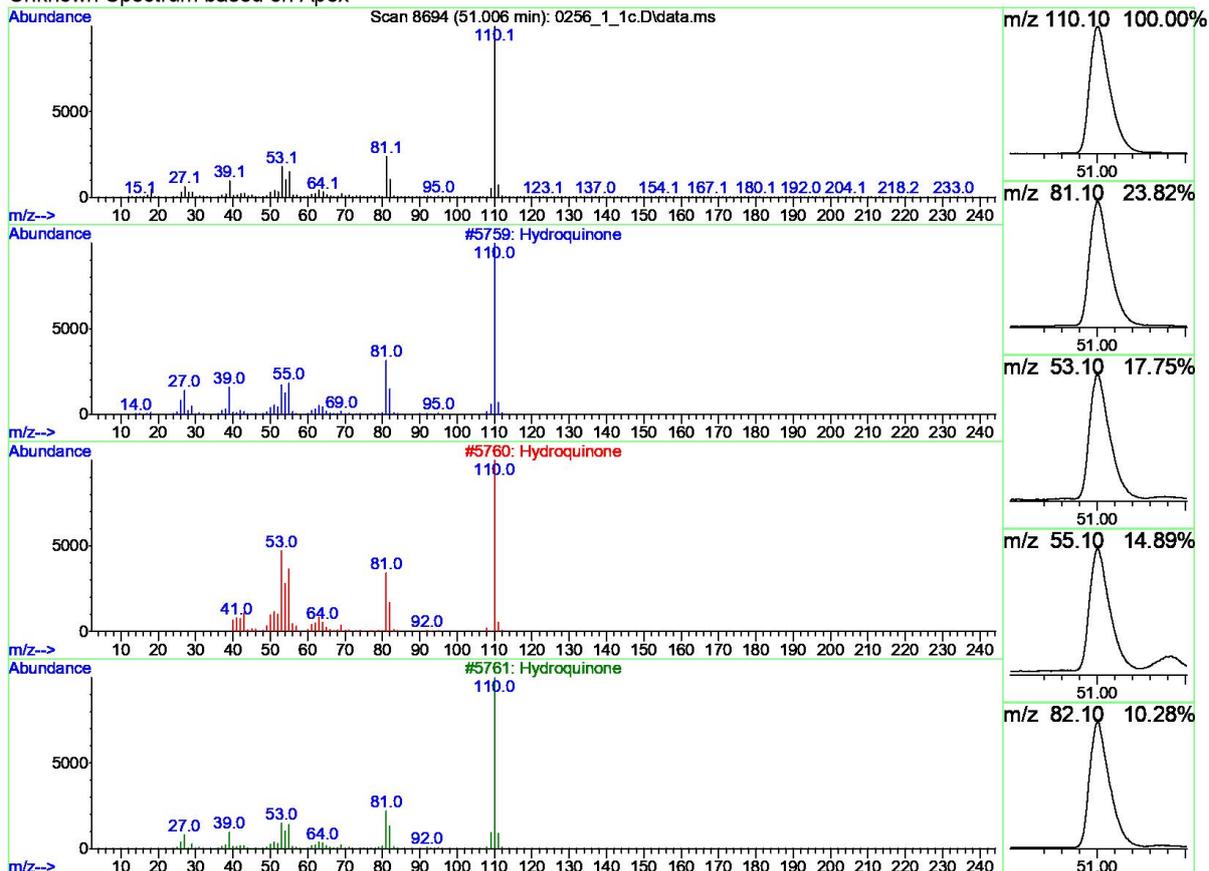
Peak Number: 85 at 46.666 min Area: 59563293 Area % 0.30

The 3 best hits from each library.	Ref#	CAS#	Qual

C:\Database\NIST11.L			
1 Pentanoic acid, 2-methyl-4-oxo-	13260	006641-83-4	37
2 Pentanoic acid, 3-methyl-4-oxo-	13261	006628-79-1	25
3 Acetic acid, octyl ester	39504	000112-14-1	23

Library Search Report - ChemStation Integrator

Unknown Spectrum based on Apex



Data File: C:\msdchem\1\data\0256_1_1c.D

Sample : 0256_1_1

Peak Number: 89 at 51.006 min Area: 372028724 Area % 1.88

The 3 best hits from each library. Ref# CAS# Qual

C:\Database\NIST11.L

1 Hydroquinone	5759	000123-31-9	91
2 Hydroquinone	5760	000123-31-9	87
3 Hydroquinone	5761	000123-31-9	80

Os espectos de massas dos demais compostos químicos identificados pela análise de CG/EM estão disponíveis caso necessidade de consulta. [Contato: ludharma@gmail.com](mailto:ludharma@gmail.com)

Journal of Pharmacy and Pharmacology 6 (2018) 924-934
doi: 10.17265/2328-2150/2018.10.005



Antimicrobial Activity of the Methanolic Fraction of Bamboo Pyroigneous Liquor

Luciana Jankowsky^{1,2,3}, Simone Possedente de Lira², Francisco André Ossamu Tanaka³, Ivaldo Pontes Jankowsky¹ and José Otávio Brito^{1,4}

1. Department of Forest Sciences, College of Agriculture "Luiz de Queiroz", University of São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba, P.O. Box 09, Brazil

2. Department of Exact Sciences, College of Agriculture "Luiz de Queiroz", University of São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba P.O. Box 09, Brazil

3. Department Phytopathology and Nematology, College of Agriculture "Luiz de Queiroz", University of São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba P.O. Box 09, Brazil

4. Forestry Science and Research Institute (IPEF), Piracicaba P.O. Box 13415-000, Brazil

Abstract: Considering that the pyroigneous liquor obtained from pyrolysis of various types of biomass has antiviral activity, the main objective of the present study was to evaluate the antimicrobial action of the methanolic fraction extracted from bamboo (*Dendrocalamus asper*) pyroigneous liquor in relation to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria. The pyroigneous liquor was recovered by laboratorial bamboo pyrolysis at 350 °C and then fractioned by liquid-liquid separation with methanol and hexane. After solvent evaporation, we collected the methanolic extract, which was later diluted in methanol and used in the diffusion disc assay of *E. coli* and *S. aureus* at concentrations of 0.125, 0.500, 0.750 and 1.000 mg. Through GC/MS analysis, it was possible to qualitatively identify 92 chemical compounds in the methanolic fraction. Treatment with the methanolic fraction inhibited cellular growth and caused a variety of morphological variations in size as well as deformities in the bacterial cell walls, establishing an antimicrobial activity profile. This finding supports the National Policy for Incentives for Sustainable Management and Cultivation of Bamboo (PNMCB) and has benefits to the society and environment as a whole, as it demonstrates the possibility of adding value to a byproduct of pyrolysis.

Key words: *Dendrocalamus asper*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

1. Introduction

The overuse of antibiotics increases bacterial resistance, promoting an increase in infections, especially in the hospital context. Bacteria such as *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* represent pathogenicity, and studies of new chemical compounds with antimicrobial activity are imperative for community health. Considering the action profile of these compounds as potential preservatives makes possible their application in the food, cosmetic, and chemical industries, among others [1-3]. For this

reason, the exploration of undiscovered treatment possibilities is needed.

Crude pyroigneous liquor is a source of chemical compounds with a diversity of applications, mostly as liquid smoke. It is characterized as a brown liquid containing two distinct fractions: a water-soluble substance which may contain more than 200 chemical compounds, and a lipid-soluble substance containing tar [4-7].

Dendrocalamus asper (Schult & Schult) Backer ex. K. Heyneke is an important bamboo species in Brazil that is commonly misidentified as *Dendrocalamus giganteus* because both species are a kind of giant bamboo with large culm diameters [8, 9].

Corresponding author: Luciana Jankowsky, Ph.D. student, research fields: phytochemistry, antimicrobial activity, pharmaceutical application.

In Brazil, various programs exist to research and develop the use of bamboo fibers for home building, either alone or as reinforcement in different types of matrices, such as soil and cement composites [9-11]. These kinds of incentives were established by Law 12,484/2011, which established the National Policy for Incentives for Sustainable Management and Cultivation of Bamboo [12], aiming to promote the development of bamboo culture in Brazil as well to incentivize research on this non-timber product of lignocellulosic constitution as a source of biomass for charcoal production and other diverse applications.

Of major interest is the use of bamboo as an alternative raw material to produce charcoal, torrefied biomass, and activated carbon, in contrast to the relative disinterest in other products of pyrolysis [13] such as pyrolygneous liquor (PL).

Several properties of bamboo leaves and stem are already recognized [14, 15]. A study conducted on methanolic extracts of *D. asper* leaves and pathogenic *E. coli* demonstrated its potential antimicrobial activity [16].

The antimicrobial activity of chemical composites obtained from pyrolygneous liquor is poorly studied; however, a comparative study of different lignocellulosic biomasses, including bamboo, its pyrolygneous liquor showed antiviral activity [17].

Variables such as lignocellulosic material, temperature used to obtain crude pyrolygneous liquor, chemical treatment, and pharmacological activation of the PL are even less well-explored.

The aim of this original study was to determine the antimicrobial activity toward two different pathogenic bacteria of the methanolic fraction obtained at 350 °C of the pyrolygneous liquor from *D. asper*, a low-value byproduct obtained in the production of charcoal via pyrolysis.

2. Materials and Methods

2.1 Obtaining the Timber Material

D. asper was collected at the Research and

Development Unit of the Agronomic Institute of Campinas, located in the city of Tatuí, State of São Paulo. Culms 3.0 m long were cut from bamboo clumps older than three years and transported to the Department of Forest Sciences facilities. The culms were ripped into small pieces, milled in a Wiley mill (mesh 0.85), and oven-dried to approximately 0% moisture content.

2.2 Preparation of the Methanolic Fraction of the Pyrolygneous Liquor of *D. asper*

The milled and dried material was submitted to a pyrolysis process at a controlled temperature of 350 °C, and pyrolygneous liquor was obtained by condensation of the volatile gases within 4 hours of reaching the desired pyrolytic temperature.

The pyrolygneous liquor was fractionated by chemical liquid-liquid separation, utilizing methanol and hexane [20:100 mL (3 times)] as organic solvents (Merck, Sigma-Aldrich). Solvents were evaporated at 40 °C in a rotary evaporator, and the extracted fractions were stored at 4 °C.

The obtained pyrolygneous methanolic fraction (PMF) was a dark brown liquid, with high viscosity and the characteristic smelt of liquid smoke; and highly soluble in methanol.

2.3 GC/MS Analysis

This methanolic fraction was analyzed by GC/MS quadrupole mass spectrometer with linear type model 5975C (Agilent) fitted with an injector at 280 °C, column 30 m long × 0.25 mm i.d., and 0.25 µm film thickness (Stabilwax). The GC oven temperature program was held at 62 °C for 6 min, and then increased to 110 °C at a rate of 10 °C/min and finally to 215 °C at a rate of 3 °C/min for 15 min. The other GC/MS parameters employed were an injection and ion source temperature of 280 °C, helium carrier gas at 1.0 mL/min, an injection volume of 1.0 µL, a split ratio of 50:1, ion source energy of 70 eV, and a mass range of m/z 33–550 Da.

For identification of the compounds detected in the chromatograms, the NIST11 mass spectral database and the Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS) programs were used.

2.4 Diffusion Disc Assay

Diffusion disc assay is accepted by the ANVISA (National Agency of Sanitary Vigilance), FDA (Food and Drug Administration), and NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) [18–20]. All materials used in the tests were autoclaved at 110 °C for 20 min. Two strains *Escherichia coli* (ATCC 23282) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 35696) were used for research in Applied Microbiology Laboratory.

First, the bacteria were defrosted from -80 °C, and a volume of 50 µL at room temperature was inoculated in liquid Luria-Bertani (LB) culture medium at 37 °C for 24 hours in a shaking incubator. Simultaneously, the same LB medium, now containing agar, was poured into Petri dishes (15 cm diameter) inside the laminar flow chamber. Next, the plates were incubated in a chemical oxygen demand incubator (ODI) at 37 °C for 24 hours. After the incubation period, 100 µL of each bacterium was inoculated by scattering in the Petri dishes, remaining in residence for 15 min in the ODI for adhesion and growth of the bacteria.

2.4.1 Application of Samples

For the diffusion disc assay, a standardized paper disc (6.0 mm diameter) impregnated with 0.01 mg of ampicillin (Cefar Diagnóstica Ltda), produced according to the parameters established by the Clinical & Laboratorial Standards Institute (CLSI), was used as a positive control; and methanol was used as a negative control.

Samples of methanolic fraction were diluted and homogenized in methanol at four different concentrations (0.25, 1.0, 1.5 and 2.0 mg/µL). From each one solution, 0.5 µL was added with a volumetric pipette onto paper discs (6.0 mm diameter) inside the

laminar flow chamber. Discs samples of PMF and negative control with methanol were submitted to an evaporation process to eliminate the solvent.

After the solvent evaporation, the disc samples impregnated with concentrations of 0.25, 1.0, 1.5 and 2.0 mg/µL give a PMF content of 0.125, 0.500, 0.750 and 1.000 mg per disc, respectively.

Then, the discs were inoculated onto the Petri dishes, previously prepared as described above, and then incubated in an ODI for 24 hours.

Absence of bacteria radial growth around the paper discs was measured using two perpendicular measurements of the inhibition halo diameter with an electronic pachymeter (Mitutoyo).

2.5 Scanning Electron Microscopy Imaging

A sample of 0.25 mg/µL (0.125 mg) collected at the end of the disk diffusion assay was infiltrated in Karnovsky fixative and stored at 4 °C. The cell pellet of each bacteria to be analyzed was homogenized in the Karnovsky fixative and 5 µL was added to a glass grid covered with ϵ -poly-L-lysine for 15 min, followed by an ethanol dehydration sequence in series concentrations [30, 50, 70, 90, and 100% (3 times)] for 10 min at each stage. Soon after, they were dried to the critical point using liquid CO₂, glued to stubs, and metalized with gold. The samples were then analyzed by scanning electron microscopy (SEM, model LEO 435VP, Zeiss, Germany) to produce images saved in TIFF format [20].

2.6 Statistical Analyses

The statistical delineation adopted was a factorial 2 × 5 (bacteria × concentration) design with 4 replications. ANOVA was applied to the total results and the Tukey test was used to compare means. The relationship between inhibition halo diameter and PMF concentration was analyzed by linear regression.

3. Results

The GC/MS results were expressed according to the

following parameters: retention time (t_R) of each compound in the chromatogram, expressed in minutes; percentage of normalized area (A%), which indicates the relative distribution of the compounds; and qualitative analysis (QA, with score ranging from 0 to 100), which is the mass spectra database that reflects the similarity of the mass spectrum obtained with those registered in the used libraries, and considering as a limit for compound identification a score equal or greater than 70.

Through GC/MS analysis it was possible to qualitatively identify 92 chemical compounds in the

methanolic fraction of the pyrolytic liquor obtained at 350 °C, as can be observed in the obtained chromatogram (Fig. 1). The phenols and derivative compounds present in the methanolic fraction are related in Table 1.

A concentration of 0.25 mg/μL (0.125 mg) was initially used in a comparative screening of the PL methanol and hexane fractions at 350 °C, in the disk diffusion test, to assess possible antimicrobial activity. The results allowed us to select the most suitable fractionation and to determine the concentrations to be subsequently evaluated.

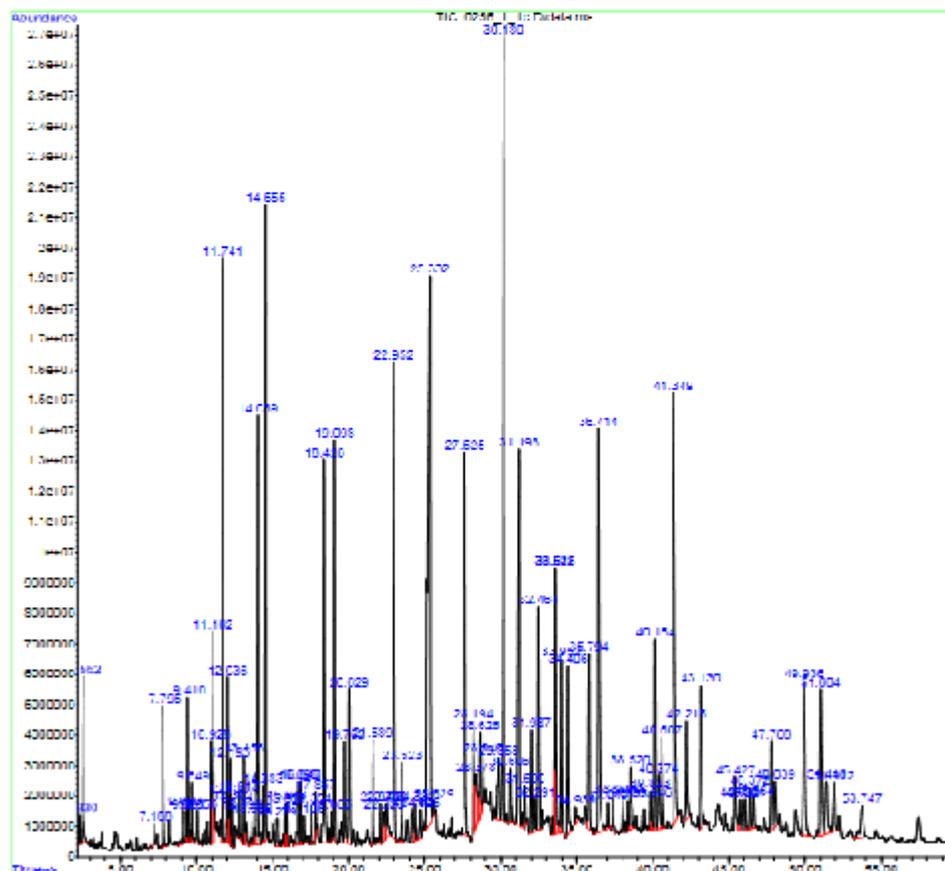


Fig. 1 Chromatogram of chemical compounds identified through GC/MS analysis.

Table 1 The phenols and derivatives of chemical composts found in the GC/MS of the methanolic fraction of pyrolygneous liquor of *Dendrocalamus asper* obtained at 350 °C.

Phenolic compost and derivatives	T _r (min)	A%	QA
Methoxyphenol (guaiacol)	19.1	2.4	97
Creosol	21.588	0.66	96
Maltol	22.323	0.45	94
Phenol	22.952	3.85	95
Dimethoxyphenol	30.179	6.81	97
Dimethoxy-4-propenylphenol	37.367	0.26	97
Vanillin	38.001	0.28	97
Catechol	41.348	5.16	95

t_r: retention time; A%: percentage of normalized area; QA: Score of qualitative analysis.

The results of the diffusion disk assay, which are presented in Table 2, corroborate the antimicrobial effect of the PMF on the growth of *E. coli* and *S. aureus*. These results clearly demonstrate that the effects of the methanolic fraction at different concentrations, as well as the ampicillin effect, are similar for both bacteria (*E. coli* and *S. aureus*).

In relation to *E. coli*, statistical analysis showed that PMF at 0.125, 0.500 and 0.750 mg has similar antimicrobial action, and that the same interpretation can be applied to concentrations of 0.500, 0.750 and 1.000 mg. Only the higher PMF dosage, 1.000 mg, is statistically equivalent to ampicillin.

The results obtained with *S. aureus* are very similar. Methanolic extract at 0.125 and 0.500 mg showed the same effect, according to the Tukey test; and dosages of 0.500 and 0.750 mg, as well dosages of 0.750 and 1.000 mg, were equivalent.

The statistical equivalence between PMF dosage of 1.000 mg and ampicillin dosage of 0.010 mg in relation to *E. coli* was not observed on *S. aureus*.

The values from Table 2 also make evident a direct relationship between methanolic extract concentration and inhibition halo diameter, which is analyzed in Fig. 2. The linear regression analysis showed that for both bacteria, the inhibition halo diameter increased mainly as a response to the increase in concentration, and the linear equation that expresses this relationship has a coefficient of determination (R^2) greater than 0.75 ($p < 0.01$). This result can be interpreted as evidence of the microbial action of the methanolic extract.

Samples collected at the edges of the inhibition halo initially used in the screening, 0.25 mg/μL (0.125 mg), were analyzed by SEM, verifying the morphological differences between the control (untreated) bacteria and the bacteria submitted to treatment with the methanolic fraction, as demonstrated in Figs. 3 and 4. To make these comparisons, it is necessary to know the normal morphological patterns of the bacteria, in which they manifest their pathogenicity.

In Fig. 3, it is possible to analyze SEM images of *S. aureus*. The bacterial control shows cells that were not subjected to any treatment, which appear in the shape of a coccus with regular morphology, standard diameter, and regular grouping (Fig. 3A). After treatment with the methanolic fraction, the cells are irregular in size and cell walls present alterations as rugosity, mostly without the spherical shape; some with a visible section in the axial axis. The presence of an extracellular substance can be noted (Fig. 3B). Those differences were not observed in the control bacteria. Differences between control and treated bacterial cells may be indicative of cell growth inhibition, thus configuring an antimicrobial activity profile.

In Fig. 4, it is possible to analyze SEM images of *E. coli*. In the bacterial control, cells that were not subjected to any treatment have regular morphology and rod shape, with standard diameter and regular grouping (Fig. 4A).

After treatment with the PMF, the bacteria did not present the standard morphological conformation.

Table 2 Mean diameter (mm) of the inhibition halo (absence of bacteria radial growth) due to the presence of the methanolic fraction and ampicillin.

Bacteria	Dosage (mg)				Ampicillin
	Pyroligneous Methanolic Extract				
	0.125	0.500	0.750	1.000	0.010
<i>E. coli</i>	11.66 ^{A*}	13.42 ^{AA*}	14.28 ^{AA*}	16.73 ^{AA*}	19.91 ^{A*}
<i>S. aureus</i>	10.77 ^{A*}	12.74 ^{AA*}	14.91 ^{AA*}	16.95 ^{A*}	21.69 ^{A*}

Means with the same capital letter in the vertical direction do not differ among itself, Tukey test, $p < 0.05$.

Means with same small letter in horizontal direction do not differ among itself, Tukey test, $p < 0.05$.

ANOVA (5, 10) = 58.98, $p < 0.01$.

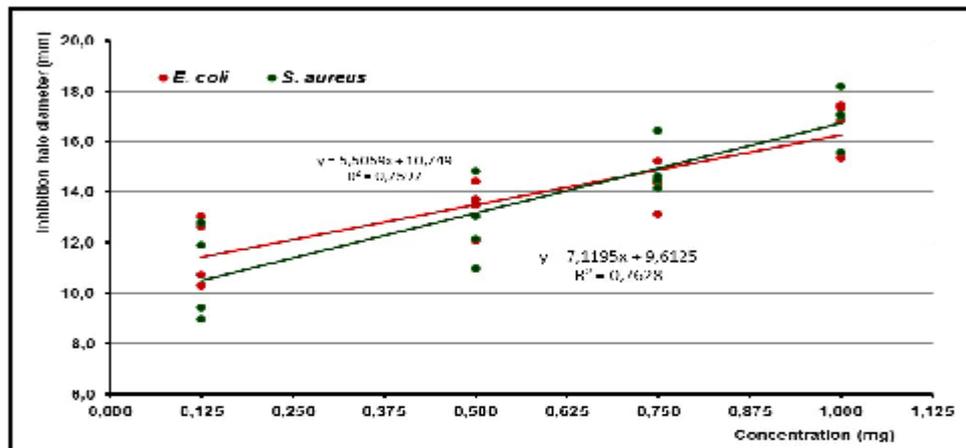


Fig. 2 Linear regression analysis applied to the relationship between methanolic extract concentration and inhibition halo diameter.

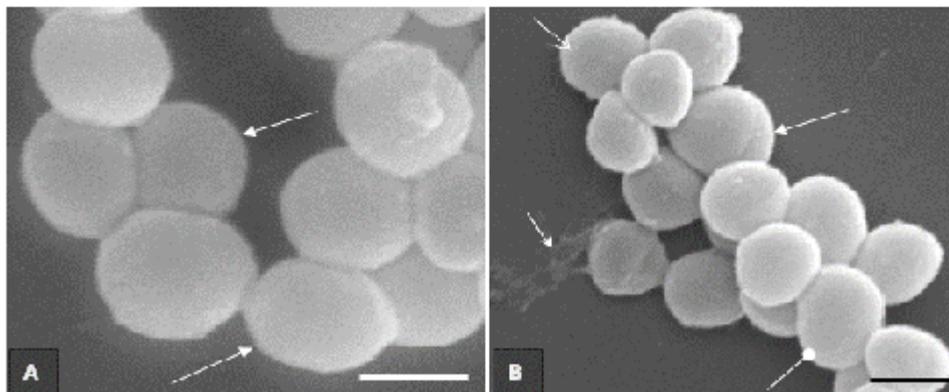


Fig. 3 Scanning electron microscopy: *Staphylococcus aureus*.

3A: Bacteria without treatment; cocci show spherical form and normal sizes (arrows). 3B Bacteria submitted to treatment with the methanolic fraction, with oval coccus morphology (arrow in ellipse); a seccional line in a cell of abnormal size and form (arrow); rugosity in the coccus cellular wall (open arrow); and an extracellular substance (furtive arrow). (Bars = 0.5 μ m).

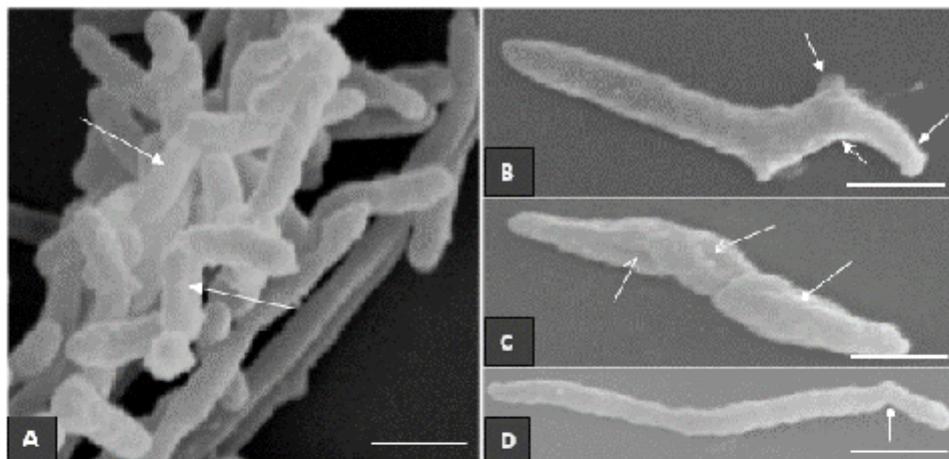


Fig. 4 Scanning electron microscopy: *Escherichia coli*.

4A: Bacteria without treatment showing rod form and normal size (arrow). 4B, 4C, and 4D: Bacteria submitted to treatment with the methanolic fraction. 3B: Deformations in the bacterium, whose normal rod morphology is modified, showing curves (arrow). 4C: Presence of longitudinal sections in the bacterium as well as rugosity in the total extension of the cellular wall (open arrow). 4D: Bending in the final prolongation of the bacterium (arrow in ellipse). (Bars = 1.0 μm).

Bacterial cells, after treatment, exhibited a variety of morphological variations in size and deformities in the cell wall (Figs. 4B–4D), confirming the antimicrobial activity profile.

4. Discussion

Bamboo species are classified as grasses, having many lignocellulosic similarities with wood, except for the alkaline extracts, ashes, and silica, which are present in greater quantity in the bamboos. Its chemical composition has as its main components cellulose (55%) and lignin (25%), and it also contains hemicellulose, resins, tannic acid, waxes, and organic acids [21, 22].

Differences in chemical composition of the lignocellulosic material and pyrolysis temperature have qualitative and quantitative effects on the chemical composition of the pyrolygneous liquor.

Biological activity studies are performed with crude PL, indifferent to lignocellulosic material [16, 17, 27, 28], or temperature. The temperature at 350 $^{\circ}\text{C}$ shows an exothermic process, the composition of the

condensable gases containing hundreds of organic (some recoverable) chemical components [29].

The liquid-liquid fractionation was performed with the organic solvents methanol and hexane. Methanol is a polar solvent, which extracts by affinity compounds with more polar or medium polarity characteristics from crude PL. Hexane, due to its nonpolar characteristics, extracts compounds of similar polarity. Using this fractionation, the most toxic compounds, such as tar and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), are excluded from the methanolic fraction. For this reason, the methanolic fraction was selected for the proposed tests.

The chromatogram in Fig. 1 shows all 92 chemical compounds are identified through absorbance of the methanolic fraction; including phenolic compounds, ketones, aldehydes and lactones, among others. However, the compounds with greater focus in the literature are the phenolic.

Previous studies on crude bamboo PL have focused on phenolic compounds. Most phenolic compounds present an aromatic ring and a short carbon chain,

including guaiacol, vanillin, and apocin, among others, whose antimicrobial activities and employment by food companies are widely known [14, 22–26]. Table 1 highlights the phenolic compounds whose qualitative identification by MS are comparable to those ones described by other authors.

Many of the phenolic compounds present in the PMF show pharmacological activity in diverse organic systems; however, other chemical compounds may be related to antimicrobial activity, as shown in Table 2. In a fraction of such chemical complexity, it is impossible to assign this activity to a single chemical compound.

The images in Figs. 3 and 4 from SEM evidence the alterations found in *E. coli* and *S. aureus*, untreated and with treatment. Therefore, to know the normal morphological characteristics of each bacterium, which configure them as pathogenic, allowed comparing and describing the differences discovered in this analysis.

S. aureus is a Gram and catalase-positive bacterium whose size varies from 0.5 to 1.5 μm in diameter. It is unmoving, not encapsulated, and presents itself with diverse forms: isolated, in pairs, in short chains, and in irregular arrangements. In the healthy human organism, it is found in the skin and nasal cavities and can cause infections such as spines, furuncles, cellulites, pneumonia, meningitis, endocarditis, septicemia, and syndrome of septic shock, among others [30].

E. coli it is a Gram-negative bacterium of the rod type, not sporulated, with a facultative anaerobic metabolism, whose mobility is allowed by the presence of flagella. Its dimensions are 1.1 to 1.5 μm by 2.0 to 6.0 μm is a bacterium present in the intestinal flora of humans and animals and does not present risks to healthy individuals. However, when pathogenic as a result of ingestion or immune system disequilibrium, it may cause diseases of the gastrointestinal and urinary systems [31].

Studies with antimicrobial agents, of natural or

synthetic origin [32–34], do not present the same alterations discovery with the treatment of the PMF at 350 °C, as show in Figs. 3 and 4. The inhibition of cell growth was observed in both bacteria submitted to treatment. Although it was not possible to determine whether this activity was bactericidal or bacteriostatic, the dose/response relationship presented in Fig. 2 proved a linear relationship between dose and the antimicrobial effect, for both bacteria tested.

This antimicrobial activity is important because of hospital infections related to these two bacteria, especially in intensive therapy units. The etiology of sepsis in children and adolescents is related to bacterial pathogenicity and can cause death [35].

Along with hospital infections, other items such as personal hygiene products, cosmetics, perfumes, and foods can also cause bacterial pathogenicity in humans. In Brazil, according to ANVISA Resolution no. 79, those items should incorporate a preservative, which is defined as “a chemical compound, of natural or synthetic origin, that acts as a preservative system, whose intention is to guarantee the integrity of the individuals as well as of products” [36].

In the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) MD100 ED28: 2018 guidelines, there are categories of definitions to interpret the breakpoint of inhibition halo diameter values (mm) in order to categorize an organism as sensitive (inhibition of halo ≥ 20 mm), intermediate (inhibition of halo 15–19 mm), or resistant (inhibition of halo ≤ 14 mm) [36].

If an antimicrobial compound is categorized as sensitive, the infection caused by the bacteria can be properly treated with the antimicrobial agent at the dose used in clinical therapy; the intermediary category corresponds to infections caused by the bacterium that can be treated appropriately in places of the body that physiologically allow the accumulation of the antimicrobial used in treatment, or for which a greater dose can be used in clinical therapy; the resistant category corresponds to infections in which the action of the antimicrobial agent, at its habitual dose and

Table 3 Categories definitions to interpret the breakpoint of inhibition halo diameter values (mm) of PMF and ampicillin in bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Treatment	Dosage (mg)	Mean values of the inhibition halo diameter (mm)					
		<i>Escherichia coli</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
		S*	I**	R***	S*	I**	R***
PMF (Pyrolyneous methanolic fraction)	0.125	-	-	11.66	-	-	10.77
	0.500	-	-	13.42	-	-	12.74
	0.750	-	-	14.28	-	-	14.91
Ampicillin	1.000	-	16.73	-	-	16.95	-
	0.010	-	19.91	-	21.69	-	-

* Sensitive; ** Intermediate; *** Resistant.

frequency, does not inhibit the manifestation of the bacterial infection, thus allowing it to be associated clinically with mechanisms of microbial resistance [37].

Analysis of Table 3 shows that, for both bacteria, dosage of 0.125, 5.000 and 7.500 mg could be categorized as resistant. For *E. coli*, the dosage of 1.000 mg and ampicillin are categorized as intermediate. For *S. aureus*, the dosage of 1.000 mg is intermediate and ampicillin is considered sensitive.

Since the breakpoint category of inhibition halos is based on pharmacological and clinical data sets obtained from *in vitro* and *in vivo* evaluations, they are considered robust predictors of probable clinical outcomes [33].

It should be pointed that the dosage of PMF with effect equivalent to ampicillin is 100 times greater, respectively 1.00 mg and 0.01 mg. At first sight this may seem an unfavorable result, but it is necessary to consider that the PMF is an extract and ampicillin is a well known synthesized antibiotic.

Even in higher dosages when compared to ampicillin, the antimicrobial action of PMF allows its use as a preservative in the food, cosmetic, and chemical industries; adding value to a byproduct of bamboo pyrolysis.

The correlation of chemical composition with SEM analyses and data from the inhibition halo test confirm that the methanolic fraction of pyrolyneous liquor recovered from bamboo pyrolysis at 350°C demonstrates potential as an antimicrobial agent for *S.*

aureus and *E. coli*.

6. Conclusions

The unpublished results obtained from the methanolic fraction of *D. asper* pyrolyneous liquor obtained at 350 °C demonstrate complexity in its chemical composition, with emphasis on the phenolic compounds. A dose-response relationship was found in the four different concentrations evaluated, confirming antimicrobial activity. Through SEM analysis, it was possible to verify morphological differences between the controls and treated *S. aureus* and *E. coli*. This finding supports the National Policy for Incentives for Sustainable Management and Cultivation of Bamboo (PNMBCB), and has benefits to society and to the environment as a whole because it demonstrates the possibility of adding value to a byproduct of pyrolysis.

Acknowledgments

This study was conducted with the financial support of the Forestry Science and Research Institute (IPEF) and the Research Support Foundation (FAPESP) grant process number 2016/14058-9 and 2014/15760-3, and with the technical assistance of Prof. Dr. Luiz Humberto Gomes, Felipe Gabriel Andrino, and Alex Canale. All bamboo was donated by the Research and Development Unit of the Agronomic Institute of Campinas (IAC), located in the city of Tatui, São Paulo. Cefar Diagnostic Ltda provided all Gram-positive and Gram-negative antimicrobial kits.

References

- [1] Soares, S. G. S. C., Mascarenhas, M. D. M., Moura, L. N. B., and Machado, A. F. M. 2017. "Characterization of the Infections Related to Health Care in a Teaching Hospital in the Northeastern of Brazil." *Revista de Enfermagem da UFPI* 6 (2): 37-43.
- [2] Vieira, P. N., and Vieira, S. L. V. 2017. "Uso Irracional e Resistência a Antimicrobianos em Hospitais." *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR* 21 (3): 209-12.
- [3] ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. 2000. "Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 79, de 28 de agosto de 2000." Accessed January 28, 2018. <http://www.anvisa.gov.br/>.
- [4] Maekawa, K. 2002. "Curso Sobre Produção de Carvão, Licor Prolenhoso e Seu uso na Agricultura." *APAN-Associação de Produtores de Agricultura Natural*.
- [5] Zanetti, M., Cazetta, J. O., De Mattos Júnior, D., and Carvalho, S. A. 2003. "Uso De Subprodutos de Carvão Vegetal na Formação do Porta-Enxerto Limoeiro 'cravo' em Ambiente Protegido." *Revista Brasileira de Fruticultura* 25 (3): 508-12.
- [6] Alvez, H. S. 2005. "Sequenciamento e Análise do Genoma Cloroplastidial de Eucalipto (*Eucalyptus grandis*)." Master's dissertation, University of Agriculture, Luiz de Queiroz/University of São Paulo (ESALQ/USP).
- [7] Mungkumkamchao, T., Kesmla, T., Pimratch, S., Toomsan, B., and Jothityangkoon, D. 2013. "Wood Vinegar and Fermented Bioextracts: Natural Products to Enhance Growth and Yield of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.)." *Scientia Horticulturae* 154: 66-72.
- [8] Akira, A., Sakuma, A. C., Dambiski, L., and Moretti, T. V. (2007). *Bambu*. Technical dossier reported by the Paraná Institute of Technology, Brazil.
- [9] Felizberto, M. H. F., Beraldo, A. L., and Clerici, M. T. P. S. 2017. "Young Bamboo Culm Flour of *Dendrocalamus asper*: Technological Properties for Food Applications." *LWT-Food Science and Technology* 76: 230-35.
- [10] Khosrow, G. 2005. "Bamboo as Reinforcement in Structural Concrete Elements." *Cement Concrete Composites* 27 (6): 637-49.
- [11] Souza, A. P. C. C. 2004. "Bambu na Habitação de Interesse Social no Brasil." *Cadernos de Arquitetura e Urbanismo* 11 (12): 217-45.
- [12] BRASIL. 2011. "Lei nº 12.484 de 2011. Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu." Accessed January 28, 2018. https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2011/lei/12484.htm.
- [13] Mena, L. E. H. 2014. "Estudo experimental da pirólise lenta de bambu (*Dendrocalamus giganteus* Munro) e caracterização do carvão vegetal." Master's dissertation, Estate University of Campinas-UNICAMP.
- [14] Hadi, S., and Bremne, J. B. 2001. "Initial Studies on Alkaloids from Lombok Medicinal Plants." *Molecules* 6: 117-29.
- [15] Zhou, Y. K., Shen, S. Y., and Hou, C. L. 2017. "Diversity and Antimicrobial Activity of Culturable Fungi from Fishscale Bamboo (*Phyllostachys heteroclada*) in China." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33: 104.
- [16] Mulyono, N., Lay, B. W., Rahayu, S., and Yapranti, I. 2012. "Antibacterial Activity of Petung Bamboo (*Dendrocalamus asper*) Leaf Extract against Pathogenic *Escherichia coli* and their Chemical Identification." *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive* 3 (4): 770-8.
- [17] Li, R., Narita, R., Nishimura, H., Marumoto, S., Yamamoto, S. P., Ouda, R., Yatagai M., Fujita, T., and Watanabe, T. 2018. "Antiviral Activity of Phenolic Derivatives in Pyrolygneous Acid from Hardwood, Softwood, and Bamboo." *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 6: 119-26.
- [18] ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. 2003. "Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-Difusão; Norma Aprovada-oitava edição." 23 (1): 1-58.
- [19] Coyle, M. B. 2008. "Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing." *American Society of Microbiology*.
- [20] Mesquita, G. L., Zambrosi, F. G. C., Tanaka, F. O. A., Boaretto, R. M., Quaggio, J. A., Ribeiro, R. V., Mattos Jr., D. 2016. "Anatomical and Physiological Responses of Citrus Trees to Varying Boron Availability Are Dependent on Rootstock." *Frontiers in Plant Science* 7: 34-9.
- [21] Beraldo, A. L., and Azzini, A. 2004. "Bambu: características e aplicações." *Guatiba: Agropecuária*.
- [22] Costa, T. M. de S. 2004. "Estudo da Viabilidade Técnica do Emprego do Bambu da Espécie *Bambusa vulgaris* Schard. Como Carvão Vegetal." Master's dissertation, Institute of Energy and Nuclear Research-IPEN, São Paulo.
- [23] Marinho, N.P., Nisgoski, S., Klock, U., Andrade, A. S., and Muñiz, G. I. B. 2012. "Análise química do bambu-gigante (*Dendrocalamus giganteus* Wall. ex Munro) em diferentes idades." *Ciência Florestal* 22 (2): 417-2.
- [24] Theapparatt, Y., Chandumpai, A., and Leelasuphak, W. 2015. "Pyrolygneous Acids from Carbonisation of Wood and Bamboo; Their Components and Antifungal Activity." *Journal of Tropical Forest Science* 27 (4): 517-26.
- [25] Theapparatt, Y., Chandumpai, A., Leelasuphak, W., Laemsak, N., and Ponglimanont, C. 2014. "Physicochemical Characteristics of Wood Vinegars from

- Carbonization of *Leucaena leucocephala*, *Azadirachta indica*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Hevea brasiliensis*, and *Dendrocalamus asper*." *Natural Science* 48: 916-92.
- [26] Sumanatrakula, P., Kongsunea, P., Chotithama, L., and Suktoa, U. 2015. "Utilization of *Dendrocalamus asper* Backer Bamboo Charcoal and Pyrolygneous Acid." *Energy Procedia* 79: 691-96.
- [27] Mulyono, N., Lay, B., W., Rahayu, S., and Yaprianti, Y. 2012. "Antibacterial activity of Petung Bamboo (*Dendrocalamus asper*) Leaf Extract Against Pathogenic *Escherichia coli* and Their Chemical Identification." *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive* 3 (4): 770-8.
- [28] Yalaw, R., Kenigsbuch - Sredni, D., Sredni, B., and Nitzan, Y. 2014. "Antibacterial Effects of the Tellurium Compound OTD on *E. coli* Isolates." *Archives of Microbiology* 196: 51-61.
- [29] Brito, J. O. 2009. "Princípios de produção e utilização de carvão vegetal de madeira." *Documentos Florestais* 9: 1-19.
- [30] Santo, A. L., Santos, D. I., Freitas, C. C., Ferreira, B. L. A., Afonso, I. F., Rodrigues, C. R., and Castro, H. C. 2007. "*Staphylococcus aureus*: Visitando Uma Cepa de Importância Hospitalar." *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 43 (6): 413-23.
- [31] Corrêa, F. A. F. 2012. "Características dos Patótipos de *E. coli* e Implicações de *E. coli* patogênica para Aves em Achados de Abatedouros Frigoríficos." In *Seminar of the Graduate Program in Animal Science of the Veterinary and Animal Science School of the Federal University of Goiás*.
- [32] Tayela, A. A., Shaban, S. M., Moussa, S.H., Elguindy, N. M., Diab, A. M., Mazrou, K. E., Ghanem, R. A., El-Sabbag, S. M. 2018. "Bioactivity and Application of Plant Seeds' Extracts to Fight Resistant Strains of *Staphylococcus aureus*." *Annals of Agricultural Sciences*: 1-7.
- [33] Hartmann, M., Berditsch, M., Hawecker, J., Ardakani, M. F., Gerthsen, D., and Ulric, A. S. 2010. "Damage of the Bacterial Cell Envelope by Antimicrobial Peptides Gramicidin S and PGLa as Revealed by Transmission and Scanning Electron Microscopy." *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 54 (8): 3132-42.
- [34] Yalaw, R., Kenigsbuch - Sredni, D., Sredni, B., Nitzan, Y. 2014. "Antibacterial Effects of the Tellurium Compound OTD on *E. coli* Isolates." *Arch Microbiol* 196: 51-61.
- [35] São Pedro, T. C., Morcillo, A. M., and Barcat, E. C. E. 2015. "Etiologia e Fatores Prognósticos da Sepsis em Crianças e Adolescentes admitidos em Terapia Intensiva." *Rev. Bras. Ter. Intensiva* 27 (3): 240-6.
- [36] Agência Nacional De Vigilância Sanitária. 2018. "Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n° 79, de 28 de Agosto de 2000." Accessed May 19, 2018. <http://www.anvisa.gov.br/>
- [37] Clinical & Laboratorial Standards Institute (CLSI). 2018. "CLSI M100-ed28:2018 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing." Accessed May 19, 2018. <http://em100.edaptivedocs.info/Login.aspx>

APÊNDICE D. Resumo das análises estatísticas.**D1.** Análise de variância dos rendimentos no processo de pirólise.**Rendimento do bambu pirolisado (%)**

Fontes de Variação	G L	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	Pr > F
Temperatura	2	4.509,56	2.254,78	618,47	<0,001
Resíduo	6	21,87	3,65		
Total	8	4.531,43			

Rendimento do licor pirolenhoso (%)

Fontes de Variação	G L	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	Pr > F
Temperatura	2	2.109,97	1.009,99	181,56	<0,001
Resíduo	6	33,38	5,56		
Total	8	2.053,35			

Perdas do processo (%)

Fontes de Variação	G L	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	Pr > F
Temperatura	2	493,36	246,68	259,62	<0,001
Resíduo	6	5,70	0,95		
Total	8	499,06			

D2. Análise de variância do poder calorífico e do teor de cinzas do bambu pirolisado.**Poder calorífico superior (KJ/Kg)**

Fontes de Variação	G L	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	Pr > F
Temperatura	2	24.325,6	12.162,8	1,06	n.s.
Resíduo	12	137.665,6	11.472,1		

Total	14	161.991,2			
Teor de cinzas (%)					
Fontes de Variação	G L	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	Pr > F
Temperatura	2	23,95	11,98	76,03	0,01
Resíduo	12	1,89	0,16		
Total	14	22,06			

D3. Análise de variância da atividade antimicrobiana (diâmetro médio do halo de inibição, em mm) do Licor pirolenhoso integral (LPI), e das respectivas frações metanólica (FMeOH) e hexânica (FHex), em relação às bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

Atividade antimicrobiana (halo de inibição, em mm), *E. coli*

Fontes de Variação	G L	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	Pr > F
Produtos (LPI, FMeOH, FHex)	2	328,58	164,29	21,84	0,01
Temperaturas (250, 350, 550)	2	250,01	125,00	16,62	0,01
Resíduo	31	233,20	7,52		
Total	35	873,39			

Atividade antimicrobiana (halo de inibição, em mm), *S. aureus*

Fontes de Variação	G L	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	Pr > F
Produtos (LPI, FMeOH, FHex)	2	352,58	176,29	28,37	0,01
Temperaturas (250, 350, 550)	2	55,38	27,69	4,46	0,05
Resíduo	31	192,59	6,21		
Total	35	673,55			

D4. Análise de variância dos resultados de atividade antimicrobiana (diâmetro médio do halo de inibição, em mm), obtidos no ensaio dose-resposta, da fração metanólica de 350°C (FMeOH₂), em relação às bactérias *E. coli* e *S. aureus*.

Atividade antimicrobiana (halo de inibição, em mm), ensaio dose-resposta

Fontes de Variação	G L	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	Pr > F
Bactérias	1	0,075	0,075	0,026	n.s.
Concentrações	5	718,230	143,646	50,015	0,01
Resíduo	5	14,360	2,872		
Total	11	792,845			