UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos de *Apoclada simplex* McClure & Smith (Poaceae: Bambusoideae)

Fabiana Inácio da Costa Issa

São Paulo
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos de *Apoclada simplex* McClure & Smith (Poaceae: Bambusoideae)

Fabiana Inácio da Costa Issa

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno

São Paulo
2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

I86a   Issa, Fabiana Inácio da Costa
Avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana de
extratos de *Apoclada simplex* McClure & Smith (Poaceae:
Bambusoideae) / Fabiana Inácio da Costa Issa. -- São Paulo,
2015.
76p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador : Moreno, Paulo Roberto Hrihorowitsch

1. Produtos naturais : Farmacognosia 2. Bambu I. T. II.
Moreno, Paulo Roberto Hrihorowitsch, orientador.

615.321   CDD

Fabiana Inácio da Costa Issa

Avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos de *A. simplex* McClure & Smith (Poaceae: Bambusoideae)

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno
Orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

Ao meu querido e tão amado filho Pietro, que é a alegria e a inspiração de todos os meus dias.

Ao Flávio, meu amado esposo, por respeitar as minhas escolhas e pelo apoio incondicional.

Aos meus pais, Iracema e José, por todos os ensinamentos.

Aos meus queridos irmãos, Danilo e Marcelo, pelo carinho.

A minha sogra, Amélia, e ao meu sogro, Pierre, pelo apoio e ajuda em momentos de necessidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser essencial em minha vida.

Ao meu orientador, Professor Dr. Paulo Roberto H. Moreno, por ter me dado à oportunidade de ingressar na vida acadêmica, por todos os ensinamentos no decorrer do meu mestrado e por depositar em mim a confiança para realização deste trabalho.

À Dra. Maria Tereza Grombone-Guaratini, do Instituto de Botânica, pelo acolhimento, apoio e contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Dra. Telma Mary Kaneko, pelos ensinamentos e acolhimento no laboratório para realização das análises microbiológicas.

Ao Professor Dr. Felipe Lourenço Rebello, pela disponibilidade e colaboração no delineamento experimental e nas análises de estatística aplicada.

À Professora Dra. Elfriede Marianne Bacchi, e à doutoranda Flávia Sobreira pelo auxílio nas análises de quantificação.

À Professora Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros e aos seus alunos, por cederem equipamento de seu laboratório para realização de análises de quantificação.

À Fapesp, pelo auxílio financeiro para realização desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro por meio da concessão de bolsa.

Aos mestrandos, Marco Aurélio e Celso Markowitsch, e à secretária Amarilis, do Instituto de Botânica, pelo auxílio na coleta do material vegetal.

Ao mestrando, Celso Markowitsch, pela colaboração, pela disponibilidade no preparo do material vegetal.

Ao Técnico Roberto Honório, pela disponibilidade na tentativa de realizar a análise farmacobotânica do material vegetal, e pelo auxílio no processo de liofilização do material vegetal.

A funcionária Leila Aparecida Bonadio, da biblioteca do Conjunto das Químicas, pela revisão das referências bibliográficas.

Ao David, funcionário da secretária da pós-graduação, pelos esclarecimentos de dúvidas.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho, Agnieszka Racja, Flávia Sobreira, Marcos Pereira, Fabiana Lima, Celso Markowitsch, Rafael Takamoto, Alessandro Saviano, Fabiane Lacerda, Bruna

Vianna, Márcia Ponte, Natalia Manzoni, Gabriele Ruas, pela contribuição no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade, e pelos momentos compartilhados no decorrer do mestrado.

A todos que contribuíram diretamente e indiretamente e torceram pela finalização desta etapa

Muito obrigada!

*“A coisa mais bela que podemos
vivenciar é o mistério.
Ele é fonte fundamental de toda
verdadeira arte e de toda ciência”.*

Albert Einstein

RESUMO

Issa, F.I.C. **Avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos de *Apoclada simplex* McClure & Smith (Poaceae: Bambusoideae).** 2015. 71 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A substituição dos conservantes sintéticos em cosméticos por produtos naturais é uma tendência, direcionando as pesquisas para a busca de novas alternativas de compostos antimicrobianos naturais. Extratos de bambus asiáticos têm ampla aplicação na indústria cosmética, sendo muito utilizados em diversas formulações. No Brasil, a triagem química de espécies nativas de bambus para futuras aplicações na indústria ainda é incipiente. O objetivo do trabalho foi avaliar as atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos e frações de folhas e colmos de *A. simplex* McClure & Smith. Extratos brutos de folhas e colmos foram obtidos por percolação com etanol 60%, liofilizados, e fracionados com solventes de polaridade crescente. A capacidade antioxidante foi quantificada pelo método de redução do radical DPPH, sendo a fração clorofórmica dos colmos a que apresentou melhor atividade (IC_{50} = 24,02 μ g/mL). A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método de microdiluição frente *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Apergillus brasiliensis* (ATCC 16404). Os extratos brutos e frações de folhas e colmos de *A. simplex* apresentaram baixa atividade antimicrobiana com concentração inibitória mínima (CIM) > 1mg/mL para todos os micro-organismos. O efeito sinérgico dos extratos com parabenos foi realizado utilizando o delineamento experimental centroide simplex para uma mistura de metilparabeno, propilparabeno e extrato. As misturas foram testadas frente aos micro-organismos utilizados no ensaio de atividade antimicrobiana. O sinergismo foi observado em maior intensidade em *S. aureus* e *C. albicans*. Adicionalmente, os resultados da quantificação de flavonoides e compostos fenólicos totais sugeriram que o sinergismo entre esses compostos e os parabenos poderia ser responsável pela atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: *Apoclada simplex*. Atividade antioxidante. Atividade antimicrobiana. Sinergismo. Produto cosmético.

ABSTRACT

Issa, F.I.C. **Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of *Apoclada simplex* McClure & Smith (Poaceae: Bambusoideae) extracts.** 2015. 71 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The replacing synthetic preservatives in cosmetics with natural products, is a tendency, research to investigate new natural antimicrobial compounds. Although Asian bamboo extracts have wide application in the cosmetics industry and are widely used in various formulations, Brazilian native species were not yet been investigated for future industrial applications. Thus, the purpose of this study was to evaluate the antioxidant and antimicrobial activities of extracts and fractions from *A. simplex* McClure & Smith leaves and culms. Crude leaf and culm extracts were obtained by percolation with 60% ethanol, lyophilized and fractionated with increasing polarity solvents. Antioxidant capacity was measured by the DPPH radical scavenging method in which the culm chloroform fraction presented the highest activity ($IC_{50}=24.02 \mu\text{g/mL}$). Antimicrobial activity was determined by the microdilution method against *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Candida albicans* (ATCC 10231) and *Apergillus brasiliensis* (ATCC 16404). All the extracts and fractions from *A. simplex* showed low antimicrobial activity with Minimal Inhibitory Concentration (MIC) > 1 mg/mL for all microorganisms. The synergistic effect of the extracts mixed with methyl and propyl parabens was tested using a simplex centroid design. The mixtures were tested against the same microorganisms used for extracts evaluation. A stronger synergic effect was observed for *S. aureus* and *C. albicans*. Additionally, the quantification results of flavonoids and total phenolic compounds suggested that the synergism among these compounds and the parabenos could be responsible for the antimicrobial activity.

Key Words: *Apoclada simplex*. Antioxidant activity. Antimicrobial activity. Synergism. Cosmetic product.

Lista de Figuras

Figura 1.	Morfologia do bambu lenhoso simpodial. Fonte: McClure, 1993.	4
Figura 2.	Distribuição dos bambus herbáceos (Olyrae). Disponível em:< http://www.eeob.iastate.edu/research/bamboo/maps/Olyrae.gif >. Acesso em: 3 maio 2015.....	6
Figura 3.	Distribuição dos bambus lignificados naturais de regiões de clima tropical (Bambuseae). Disponível em:< http://www.eeob.iastate.edu/research/bamboo/maps/world-total-woody.gif >. Acesso em: 3 maio 2015.....	7
Figura 4.	Distribuição dos bambus da região Neotropical. Disponível em:< http://www.eeob.iastate.edu/research/bamboo/maps/neotropical.gif >. Acesso em 14 jan. 2014.....	8
Figura 5.	<i>Apoclada simplex</i> (1), Folhas (2) e Colmos (3). Fonte: Arquivo pessoal .	9
Figura 6.	Mapa da distribuição da <i>A. simplex</i> no Brasil. Disponível em:< http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Apoclada%20simplex >. Acesso em: 10 maio 2015.....	9
Figura 7.	Estrutura química dos flavonoides C-glicosídeos do antioxidante das folhas de bambu (AOB). (A) Orientina; (B) Isoorientina; (C) Vitexina; (D) Isovitexina. Fonte: ZHANG et al., 2007	12
Figura 8.	Estrutura química dos principais triterpenoides encontrados em espécies de bambu. (A) friedelina; (B) friedelanol; (C) lupenona; (D) lupeol. Fonte: LU et al., 2010	13
Figura 9.	Fluxograma do fracionamento dos extratos brutos de folhas e colmos de <i>A. simplex</i>	17
Figura 10.	Representação Gráfica do planejamento experimental centroide simplex com pontos adicionais para misturas ternárias. Fonte: Minitab®.....	25
Figura 11.	Cromatoplaça das frações hexânicas de folhas e colmos de <i>A. simplex</i> . 1. Cumarina; 2. Umbeliferona; 3. Fração hexânica de folhas; 4. Fração hexânica de colmos. Fase Móvel (FM): tolueno: éter (1:1). Visualização sob a luz UV 366 nm.....	29

Figura 12. Cromatoplaça das frações clorofórmica e acetato de etila das folhas e colmos de *A. simplex*. 1. Ácido cinâmico; 2. Ácido gálico; 3. Ácido ferúlico; 4. Ácido clorogênico; 5. Rutina; 6. Quercetina; 7. Umbeliferona; 8. Cumarina; 9. Fração clorofórmica de folhas; 10. Fração acetato de etila de folhas; 11. Fração clorofórmica de colmos; 12. Fração acetato de etila de colmos. Fase Móvel (FM): clorofórmio e metanol (9:1). Visualização sob a luz UV 366 nm. 29

Figura 13. Cromatoplaça das frações clorofórmica e acetato de etila das folhas e colmos de *A. simplex*. 1. Ácido cinâmico; 2. Ácido gálico; 3. Ácido ferúlico; 4. Ácido clorogênico; 5. Rutina; 6. Quercetina; 7. Umbeliferona; 8. Cumarina; 9. Fração clorofórmica de folhas; 10. Fração acetato de etila de folhas; 11. Fração clorofórmica de colmos; 12. Fração acetato de etila de colmos. Fase Móvel (FM): clorofórmio e metanol (9:1). (A) Visualização sob a luz UV 366 nm. Relação com NP e visualização sob a luz UV 366 nm. 30

Figura 14. Cromatoplaça das frações *n*-butanólica das folhas e colmos de *A. simplex*. 1. Fração *n*-butanólica das folhas; 2. Fração *n*-butanólica dos colmos; 3. Orientina; 4. Iso-orientina; 5. Vitexina; 6. Isovitexina. Fase Móvel (FM): tetrahydrofurano: tolueno: ácido fórmico: água (16:8:2:1). (A) Visualização sob a luz UV 366 nm, (B) Revelação com NP, seguida da visualização sob a luz UV 366 nm. 30

Figura 15. Curva de calibração do ácido gálico utilizado para a determinação da concentração de substâncias fenólicas nos extratos brutos de folhas e colmos e as frações clorofórmica, acetato de etila e *n*-butanólica de *A. simplex*. 31

Figura 16. Curva de calibração do padrão externo quercetina, utilizada para a quantificação de flavonoides totais contidos nos extratos brutos de folhas e colmos e as frações clorofórmica, acetato de etila e *n*-butanólica de *A. simplex*. 33

Figura 17. Comparativo do teor de flavonoides (μg de quercetina/mg de amostra) com, CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtido no ensaio de seqüestro do radical DPPH. 37

Figura 18. Gráficos de contorno de nível para a inibição de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, e *C. albicans* em função das proporções de metilparabeno, propilparabeno e solvente (DMSO:MeOH 1:1) (experimento controle). 49

Figura 19. Gráficos de contorno de nível para a inibição de <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , e <i>C. albicans</i> em função das proporções de metilparabeno, propilparabeno e extrato bruto de colmos.	50
Figura 20. Gráficos de contorno de nível para a inibição de <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , e <i>C. albicans</i> em função das proporções de metilparabeno, propilparabeno e extrato bruto de folhas.	51
Figura 21. Atividade antimicrobiana das composições dos extratos brutos de folhas, ou colmos e solvente (controle) com concentração inibitória mínima (CIM) de metilparabeno e propilparabeno frente a <i>Aspergillus brasiliensis</i> a 10^3 UFC/mL.	52
Figura 22. Gráfico de otimização da porcentagem de inibição de <i>S. aureus</i> em função das proporções de metilparabeno, propilparabeno e extrato de colmos. Valores preditivos de desejabilidade para a composição otimizada para inibição de <i>S. aureus</i>	55
Figura 23. Gráfico de otimização da porcentagem de inibição de <i>C. albicans</i> em função das proporções de metilparabeno, propilparabeno e extrato de colmos. Valores preditivos de desejabilidade para a composição otimizada para inibição de <i>C. albicans</i>	55
Figura 24. Gráfico de otimização da porcentagem de inibição de <i>S. aureus</i> em função das proporções de metilparabeno, propilparabeno e extrato de folhas. Valores preditivos de desejabilidade para a composição otimizada para inibição de <i>S. aureus</i>	56
Figura 25. Gráfico de otimização da porcentagem de inibição de <i>C. albicans</i> em função das proporções de metilparabeno, propilparabeno e extrato de folhas. Valores preditivos de desejabilidade para a composição otimizada para inibição de <i>C. albicans</i>	56

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composições obtidas através do planejamento centróide simplex com pontos adicionais.....	25
Tabela 2. Rendimento dos extratos brutos de folhas e colmos de <i>A. simplex</i>	27
Tabela 3. Rendimento das diferentes frações preparadas a partir de 10g de extrato bruto de folhas de <i>A. simplex</i>	27
Tabela 4. Rendimento das diferentes frações preparadas a partir de 20g de extrato brutos de colmos de <i>A. simplex</i>	27
Tabela 5. Quantificação de substâncias fenólicas de <i>A. simplex</i> utilizando a metodologia de Folin-Ciocalteu.	32
Tabela 6. Quantificação de flavonoides totais de <i>A. simplex</i> com utilização de cloreto de alumínio como agente complexante.	34
Tabela 7. Concentração efetiva (CE ₅₀) dos extratos brutos e frações clorofórmica, acetato de etila e <i>n</i> -butanólica de <i>A. simplex</i> obtida no ensaio de determinação de atividade antioxidante.	35
Tabela 8. Porcentagem de inibição dos extratos brutos e frações de <i>A. simplex</i> (1mg/mL) em comparação com antibiótico (1mg/mL) frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, e <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 a 10 ³ UFC/mL.....	38
Tabela 9. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBM/CFM) do metilparabeno e propilparabeno frente a <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739), <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027) a 10 ⁵ UFC/mL e <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) e <i>Aspergillus brasiliensis</i> (ATCC 16404) a 10 ³ UFC/mL.	40
Tabela 10. Porcentagem de inibição de <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> a 10 ⁵ UFC/mL e <i>C. albicans</i> a 10 ³ UFC/mL com diferentes proporções de metilparabeno (CIM), propilparabeno (CIM) e solvente (experimento controle).....	42
Tabela 11. Fatores de variação para as respostas de porcentagem de inibição de <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i> nas composições contendo solvente (DMSO:MeOH 1:1) (experimento controle).	43

Tabela 12. Porcentagem de inibição de <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> a 10^5 UFC/mL e <i>C. albicans</i> a 10^3 UFC/mL com diferentes proporções de metilparabeno (CIM), propilparabeno (CIM) e extrato bruto dos colmos (1mg/mL).	44
Tabela 13. Fatores de variação para as respostas de porcentagem de inibição de <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i> nas composições contendo extrato bruto de colmos.	45
Tabela 14. Porcentagem de inibição de <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> a 10^5 UFC/mL e <i>C. albicans</i> a 10^3 UFC/mL com diferentes proporções de metilparabeno (CIM), propilparabeno (CIM) e extrato bruto de folhas (1mg/mL).	46
Tabela 15. Fatores de variação para as respostas de porcentagem de inibição de <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i> nas composições contendo extrato bruto de folhas.	47

Lista de Abreviaturas

ATCC	American Type Culture Collection
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
D/M	Dimetilsufóxido/metanol
DMSO	Dimetilsufóxido
MeOH	Metanol
SDB	Sabouraud Dextrose Broth
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC	Unidade Formadora de Colônia
CE ₅₀	Concentração Efetiva 50%
DPPH	2,2'-difenil-1-picril-hidrazila
FM	Fase Móvel
NP	Difenilboriloxietilamina a 1% em metanol
R _f	Fator de retenção
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível

Sumário

1. Introdução e Justificativa	1
2. Revisão bibliográfica	3
2.1. Características gerais e usos dos bambus	3
2.2. Distribuição dos bambus	6
2.3. <i>Apoclada simplex</i> McClure & L.B.Sm.	8
2.4. Atividades biológicas e composição química dos bambus	10
3. Objetivos	15
4. Material e métodos	16
4.1. Material	16
4.2. Métodos	16
4.2.1. Preparo do material vegetal	16
4.2.2. Obtenção dos extratos brutos	16
4.2.3. Fracionamento	17
4.2.4. Determinação do perfil cromatográfico das frações de <i>A. simplex</i> ..	18
4.2.4.1. Cromatografia em Camada Delgada	18
4.2.5. Determinação de fenólicos totais	18
4.2.6. Determinação de flavonoides totais	19
4.2.7. Determinação da capacidade antioxidante	20
4.2.8. Determinação da atividade antimicrobiana	21
4.2.8.1. Micro-organismos testados	21
4.2.8.2. Meios de cultura utilizados	22
4.2.8.3. Preparação e avaliação da viabilidade do inóculo	22
4.2.8.4. Controle positivo	22
4.2.8.5. Ensaio da atividade antimicrobiana	23

4.3. Ensaio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBM/CFM) dos parabenos	24
4.4. Delineamento experimental para avaliar o efeito da associação dos extratos brutos com parabenos	24
4.4.1. Análise estatística.....	26
5. Resultados e discussão	27
5.1. Obtenção dos extratos brutos e frações.....	27
5.2. Determinação do perfil cromatográfico.....	28
5.2.1. Cromatografia em Camada Delgada	28
5.3. Determinação de substâncias fenólicas	31
5.4. Determinação de flavonoides totais	33
5.5. Determinação da capacidade antioxidante.....	35
5.6. Atividade antimicrobiana	38
5.7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBM/CFM) dos parabenos.....	40
5.8. Delineamento experimental para avaliar o efeito da associação dos extratos brutos com parabenos	41
6. Conclusões	59
Referências	60

1. Introdução e Justificativa

A incorporação de ativos naturais no desenvolvimento de produtos cosméticos, principalmente ativos de origem vegetal, é uma das tendências do mercado nacional e internacional (FERRARI, et al., 2007; FRANQUILINO, 2006). Estudos apontam uma importante atividade antioxidante para os extratos vegetais contendo compostos fenólicos e flavonoides, sugerindo sua utilização em formulações tópicas para prevenção e tratamento dos danos causados por radicais livres (FRIES; FRASSON, 2010). A utilização de produtos naturais ao invés de sintéticos como conservantes em produtos cosméticos constitui uma tendência, a qual direciona as pesquisas para a busca de alternativas de compostos antimicrobianos naturais (SEO et al., 2002). Alguns óleos essenciais e extratos vegetais demonstraram uma boa atividade antimicrobiana e já foram testados sozinhos ou em combinação com conservantes sintéticos para a preservação de produtos cosméticos (MANGENA; MUYIMA, 1999; MANCCIONI et al., 2002).

Entre as espécies vegetais mundialmente exploradas, o bambu se destaca por ser utilizado como matéria-prima em diversas partes do mundo para os mais variados fins (PRESZNHUK, 2004). Atualmente, a diversidade de aplicações e a pesquisa estão, em sua maioria, restritas aos países orientais, onde extratos, óleos essenciais e compostos isolados a partir de espécies de bambu asiáticas, estão sendo estudados tanto no que se refere à composição química, quanto às atividades biológicas. Adicionalmente, extratos glicólicos de brotos de bambu de origem asiática têm sido utilizados em diversas aplicações na indústria cosmética em formulações como, shampoos, condicionadores de cabelo e máscaras capilares, devido a suas propriedades emolientes, entre outras formulações cosméticas (SEMMLER, 2011).

No mundo, a área total ocupada por bambus é de aproximadamente 36 milhões de hectares, o que representa cerca de 3% da área total de florestas (CHAOWANA, 2013). O Brasil possui uma das maiores florestas de bambu nativo do mundo (JUDZIEWICZ et al., 1999), assim como detém o maior número de espécies no continente americano (LONDOÑO, 1996). O bambu é um vegetal relativamente comum na flora de todas as regiões do País, contudo, seu uso ainda é incipiente em comparação ao seu potencial, seja pelo desconhecimento de suas centenas de

espécies, características e aplicações, seja devido à falta de pesquisas e informações (PEREIRA, 2001), e por isso permanece subutilizado como matéria-prima (PRESZNHUK, 2004). Desta forma, é imprescindível o conhecimento químico e biológico de espécies nativas de bambu, com vistas a futuras aplicações na indústria cosmética.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Características gerais e usos dos bambus

Os bambus estão incluídos na família Poaceae (gramíneas) e subfamília Bambusoideae, a qual abrange 116 gêneros e 1.439 espécies (BPG, 2012), e habitam em ampla diversidade de condições climáticas e topográficas (JUDZIEWICZ et al., 1999). São registrados a partir de latitudes mais ao Norte, como 46° N, e distantes ao Sul, 47° S, em elevações que variam desde o nível do mar até 4.300m, crescem naturalmente em todos os continentes, exceto na Europa (SODERSTROM; CALDERÓN, 1979; ZHANG; CLARK, 2000). Constituem a única linhagem de Poaceae com grande diversificação em habitats florestais (JUDZIEWICZ; LYNN; CLARK, 2007).

Na subfamília Bambusoideae são reconhecidas três tribos: Olyrae, que compreende os bambus herbáceos, Arundinarieae, que inclui os bambus lenhosos naturais de regiões de clima temperado, e Bambuseae, que contempla os bambus lenhosos de clima tropical (SUNGKAEW et al., 2009).

Os bambus herbáceos apresentam comprimento geralmente de 2 metros, com ramificações simples, colmos não lignificados, ausência de folha do colmo e lígula externa, flores unissexuais e florescimento contínuo (policárpico) (FILGUEIRAS; SANTOS-GONÇALVES, 2004). Segundo os autores citados, os bambus lenhosos apresentam comprimento de 1 a 35 metros, com ramificações complexas, colmos lignificados, presença de lígula externa e folha do colmo, flores bissexuais e florescimento sazonal (monocárpico).

A morfologia vegetal dos bambus lenhosos assemelha-se à das árvores, com parte aérea composta de colmo, galhos e folhas, e uma parte subterrânea composta por rizomas e raízes (PEREIRA; BERALDO, 2007). As ramificações, segundo os autores citados, dividem os bambus em leptomorfos (bambus monopodiais) que se desenvolvem de forma alastrante, e paquimorfos (bambus simpodiais), que se desenvolvem de forma entouceirante. A Figura 1 apresenta a disposição morfológica de um bambu lenhoso do tipo simpodial.

Figura 1. Morfologia do bambu lenhoso simpodial. Fonte: McClure, 1993.

Segundo Pereira (1999), o bambu é uma cultura predominantemente tropical, renovável, perene, de produção anual, de rápido crescimento, com centenas de espécies espalhadas por todo o planeta. Pela característica peculiar de crescimento acelerado, o bambu se distingue como um sequestrador rápido de carbono da atmosfera, tornando-se o recurso natural e florestal que menos tempo leva para ser renovado (LIESE, 1985). Estudos têm sido conduzidos para avaliar a fixação biológica de carbono em florestas de bambu (RIÃÑO et al., 2002; CAO et al., 2011). Grombone-Guaratini et al. (2013) demonstraram que, concentrações atmosféricas de CO₂ mais elevadas, resultou no aumento da biomassa acumulada em colmos e folhas de *Aulonemia aristulada* (Döll) McClure.

O bambu representa um material ecológico, com excelentes características físicas, químicas e mecânicas, que possibilitam milhares de aplicações na sua forma natural ou processada, e por produzir colmos assexuadamente ano após ano sem necessidade de replantio, possui grande potencial agrícola, podendo ser utilizado em reflorestamentos e como regenerador/protetor ambiental (PEREIRA, 2001).

No Oriente, o bambu é culturalmente reconhecido como “a planta dos mil usos”, e têm sido utilizado nos países do sudeste asiático, desde a Antiguidade, com o emprego dos colmos na armazenagem de grãos (YANG, 1997), como material de construção, na irrigação de solos, na confecção de produtos artesanais, e como carvão (SHIBATA et al., 1975); os brotos são usados para aromatizar alimentos e

bebidas (NAGAI et al., 2009), e as folhas, no acondicionamento de alimentos com a finalidade de impedir a sua deterioração (TAKAHASHI; MIZUI; MIYAZAWA, 2010). Na medicina tradicional, as folhas eram utilizadas no tratamento de doenças cardiovasculares, hipertensão, arteriosclerose e certas formas de câncer (KUROKAWA et al., 2006), assim como as aparas dos colmos, utilizadas principalmente para diminuir ou remediar dor de estômago, diarreia ou vômito, inquietação ou sede excessiva, e sua eficácia tem sido registrada na história das dinastias chinesas (LU et al., 2010).

Atualmente, a China é o país que mais produz bambu, possuindo uma área plantada de 7 milhões de hectares para aplicações industriais, como broto comestível, celulose e papel, material para engenharia, construção, química, móveis e painéis (PRESZNHUK, 2004). Adicionalmente, o antioxidante das folhas de bambu, abreviado como AOB, é um extrato rico em polifenóis, produzido a partir das folhas de espécies de *Phyllostachys* Siebold & Zucc. (HU et al., 2000). Este extrato foi aprovado em pesquisas preliminares, pela Comissão da Republica Popular da China, para uso como antioxidante em alimentos (LU et al., 2005). O vinagre de bambu é um produto obtido durante as fases preliminares do processo de produção do carvão a partir dos colmos. Este é amplamente utilizado no Japão e China na agricultura, medicina, indústria química e de proteção do ambiente (WONG, 1995 *apud* MEJÍA, 2009). No Japão, é conhecido por suas propriedades antiinflamatórias, antibióticas e antifúngicas, e tem sido utilizado no tratamento de dermatite atópica e outras doenças de pele (NISHIMURA, 2003).

O Brasil possui uma das maiores florestas de bambu nativo, e detém a maior diversidade de espécies entre os países das Américas (FILGUEIRAS et al., 2013). Contudo, a produção de papel é a maior utilização industrial do bambu entre as aplicações tradicionais, como artesanato, vara de pescar, móveis, ou broto para alimentação (PEREIRA, 2001). No Nordeste brasileiro são cultivados 40 mil hectares de *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J.C. Wendl. para a produção de pasta celulósica, cuja capacidade instalada é de 72.000 toneladas/ano (GUIMARÃES; NOVACK; BOTARO, 2010). No país, não se aproveita todo o potencial dessa gramínea devido a uma resistência cultural à aceitação do bambu como material durável e confiável, além da ideia errônea de associá-lo à obras temporárias e também à miséria, diminuindo o seu interesse científico e tecnológico (BERALDO; AZZINI, 2004).

2.2. Distribuição dos bambus

A tribo Olyreae é composta por 21 gêneros e 122 espécies, distribuídas em três subtribos, Buergersiochloinae, Parianinae e Olyrinae, e ocorre nas florestas tropicais e subtropicais do planeta, especialmente na América Tropical, nos Neotrópicos entre 29°N a 34°S, não alcançando as regiões temperadas e frias, ou altitudes acima de 1.000m (CALDERÓN; SODERSTROM, 1980; JUDZIEWICZ et al., 1999; ZHANG; CLARK, 2000). No Brasil, país com maior diversidade da tribo, está representado por 16 gêneros e cerca de 90 espécies (FILGUEIRAS et al., 2013).

Figura 2. Distribuição dos bambus herbáceos (Olyreae). Disponível em: <<http://www.eeob.iastate.edu/research/bamboo/maps/Olyreae.gif>>. Acesso em: 3 maio 2015.

Arundinarieae compreende 28 gêneros e 533 espécies, nenhuma delas é nativa do Brasil, e seus representantes são predominantemente naturais da Ásia. Nas Américas, há três espécies nativas do gênero *Arundinaria* Michx. endêmicas dos Estados Unidos (TRIPLETT; WEAKLEY; CLARK, 2006; TRIPLETT; OLTTROGGE; CLARK, 2006; TRIPLETT; CLARK, 2010).

Bambuseae é a tribo mais numerosa e com ampla distribuição (SODERSTROM; CALDERÓN, 1974), inclui 66 gêneros e 784 espécies, distribuídas quase equitativamente nos paleotrópicos e na América Tropical (BPG, 2012). Seus indivíduos crescem em habitats abertos e são polinizados pelo vento (SODERSTROM; CALDERÓN, 1974). Abrange as subtribos: Bambusinae, Hickeliinae, Melocanninae e Racemobambosinae, nativas da Ásia e África, e

Arthrostylidiinae, Chusqueinae e Guaduinae, naturais do continente americano (BPG, 2012).

A subtribo Arthrostylidiinae possui o maior número de gêneros de Bambuseae nativos do Brasil (JUDZIEWICZ et al., 1999; BPG, 2012), enquanto a Chusqueinae compreende apenas o gênero *Chusquea* Kunth (o mais bem representado da família, com cerca de 160 espécies). Já a tribo Guaduinae abrange além do importante gênero *Guadua* Kunth, os gêneros endêmicos do Brasil *Apoclada* McClure e *Eremocaulon* Soderst. & Londoño, e outros dois gêneros sem representantes para o país (JUDZIEWICZ et al., 1999).

Figura 3. Distribuição dos bambus lignificados naturais de regiões de clima tropical (Bambuseae). Disponível em: <<http://www.eeob.iastate.edu/research/bamboo/maps/world-total-woody.gif>>. Acesso em: 3 maio 2015.

Do total de 116 gêneros e 1439 espécies de bambus conhecidos no mundo, a América Latina possui 31% dos gêneros e 39% das espécies (BPG, 2012).

O Brasil é considerado um dos principais centros de biodiversidade de espécies de bambu do mundo (SODERSTROM et al., 1988). Ao todo são 33 gêneros e cerca de 250 espécies, entre as quais 160 são endêmicas (FILGUEIRAS et al., 2013). Os estados de São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina, Bahia e Paraná, possuem a maior diversidade de florestas de bambu (LONDOÑO, 1999). A Mata Atlântica concentra a maior diversidade de bambus nativos (aproximadamente 65%), grande parte deles endêmicos deste bioma (FILGUEIRAS; SANTOS-GONÇALVES, 2004).

Há evidências de exploração ilegal, o que não garante a perpetuação da espécie na natureza, considerada em risco de extinção (SECRETARIA DE ESTADO DE MEIO AMBIENTE – SMA-SP, 2004).

Figura 5. *Apoclada simplex* (1), Folhas (2) e Colmos (3). Fonte: Arquivo pessoal

Figura 6. Mapa da distribuição da *A. simplex* no Brasil. Disponível em: <<http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Apoclada%20simplex>>. Acesso em: 10 maio 2015.

2.4. Atividades biológicas e composição química dos bambus

O bambu é uma das plantas naturais mais valiosas do mundo, com diversos compostos já identificados em diferentes partes do vegetal (RAJEBHOSALE et al., 1998). No extrato obtido das folhas de *P. nigra* var. *henonis*, compostos fenólicos foram identificados e quantificados, incluindo ácido cafeico (0,1%), ácido clorogênico (1,6%) e luteolina 7-glucosídeo (2,8%), e a concentração de 20 µg/mL desse extrato foi capaz de eliminar 40,9% do radical DPPH, e de neutralizar o radical superóxido em diferentes modelos, que incluem DNA, lipoproteína, e sistemas de lipídeos complexos (HU; ZHANG; KITTS, 2000). Também apresentou atividade larvica, ao reduzir 85% das larvas de *Culex pipens pallens* em 24 horas (CAO et al., 2004).

NISHINA e UCHIBORI (1991) isolaram e identificaram o composto 2,6-dimetoxi-*p*-benzoquinona no extrato obtido das folhas de *Phyllostachys heterocycla* (Carrière) S. Matsum., o composto exibiu fraca atividade antimicrobiana diante de bactérias Gram positivas, e nenhuma atividade em relação a de bactérias Gram negativas. Posteriormente, o teor de compostos fenólicos quantificado foi de 242,8 mg/L em equivalentes de ácido gálico e os principais compostos identificados foram sesquiterpenos (39,5%), ciclo-hexanona (29,0%) e etoxiquina (24,7%), sendo a hidroquinona e benzoquinona identificadas no resíduo após submetê-lo a extração em alta temperatura (QUITAIN; KATOH; MORIYOSHI, 2004).

O extrato do broto das espécies *Phyllostachys nigra* (Lodd. ex Lindl.) Munroe e *Phyllostachys pubescens* Mazel ex J. Houz., foi fracionado com solventes de polaridade crescente, e a fração acetato de etila apresentou o maior número de compostos fenólicos, entre eles os ácidos cafeico, siríngico, *p*-cumárico, ferúlico, protocatecuico e *p*-hidroxi-benzoico, a melhor atividade antioxidante com IC₅₀=0,4 mg/mL, e a melhor capacidade de inibir a enzima conversora da angiotensina (ACE), sendo essas atividades correlacionadas com os fenólicos encontrados. Contudo, nenhuma das frações inibiu o crescimento de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus mutans* em concentrações que variaram de 1 a 10 mg/mL (PARK; JHON, 2010).

Em um estudo posterior, o guaiacol foi identificado como o principal composto nos produtos obtidos da pirólise de *P. nigra*, *P. pubescens* e *Phyllostachys bambusoides* Siebold & Zucc., os quais apresentaram um efeito positivo no

tratamento de lesões neuronais, em que a viabilidade celular foi restaurada quando comparada com células não tratadas. Verificou-se, ainda, um efeito anti-apoptótico, e, segundo os autores, estes produtos podem ser utilizados como suplemento no tratamento de lesões isquêmicas cerebrais (HONG et al., 2010).

Diversos compostos voláteis foram identificados a partir do processo de fermentação dos brotos de *P. pubescens*, no total foram 70 compostos, e 29 apresentaram aroma ativo, sendo os odores mais intensos atribuídos às seguintes substâncias: *p*-cresol (medicamento), 2-heptanol (cogumelo), ácido acético (vinagre) e 1-octen-3-ol (cogumelo) (FU; YOON; BAZEMORE, 2002). No óleo volátil extraído dos colmos foram detectados 89 compostos, principalmente ácidos graxos (29,3%), entre os quais o (*E*)-nerolidol (10,2%) e o ácido palmítico (16,5%) foram os mais abundantes. Entre os 18 compostos responsáveis pelo aroma, os mais intensos foram: eugenol (doce-cravo-da-índia), (*E*)-2-nonenal (verde), fenilacetaldéido (floral), (*E,E*)-2,4-decadienal e (*E,E*)-2,4-nonadienal (oleoso, ceroso), (*E,Z*)-2,6-nonadienal (pepino) e indol (naftalina) (TAKAHASHI; MIZUI; MIYAZAWA, 2010).

Da solução recuperada do processo de carbonização dos colmos (*P. pubescens*), comumente chamada de “vinagre de bambu”, identificaram-se 28 compostos orgânicos voláteis, e os principais odores ativos incluíam ácido acético (azedo), 3-metil-1,2-ciclohexadiona (doce e medicinal), guaiacol, *p*-cresol, siringol (defumado e medicinal) (AKAKABE et al., 2006).

O extrato obtido das folhas de espécies de *Phyllostachys* Siebold & Zucc., geralmente *Phyllostachys nigra* var. “henonis” (Mitford) Stapf ex Rendle, conhecido como antioxidante das folhas de bambu (AOB), contém como principais componentes funcionais flavonoides (32,4%), lactonas (15,6%) e ácidos fenólicos (7,9%), que incluem ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico, quercetina, naringina, luteolina, rutina, apigenina, além de alguns C-glicosídeos, considerados os principais compostos funcionais, orientina, iso-orientina, vitexina, isovitexina (Figura 7) (ZHANG et al., 1995; 2002; ZHANG et al., 2005).

Figura 7. Estrutura química dos flavonoides C-glicosídeos do antioxidante das folhas de bambu (AOB). (A) Orientina; (B) Isoorientina; (C) Vitexina; (D) Isovitexina. Fonte: ZHANG et al., 2007

A toxicidade e segurança foram estudados no AOB, e nenhuma evidência de mutagenicidade foi detectada, ao mesmo tempo em que a administração de 4,30 g/kg desse produto não apresentou qualquer efeito adverso. Concluiu-se que o preparado AOB não é tóxico, portanto, seguro para uso como aditivo alimentar (LU et al., 2005, LU et al., 2006).

O estudo do metabolismo dos flavonoides C-glicosídeos e do ácido *p*-cumárico do AOB foi conduzido em ratos, e este demonstrou que o tempo efetivo desses compostos no cólon foi longo o suficiente para que exercessem sua atividade antioxidante. Consequentemente, o floroglucinol, ácido cafeico, ácido florético (ácido 3-(4-hidroxifenil) propiônico) foram detectados e identificados como produtos do metabolismo dos flavonoides C-glicosídeos (ZHANG et al., 2007).

O extrato das aparas dos colmos, denominado EBS, é obtido da camada intermediária dos colmos das espécies *Bambusa tuldoidea* Munro, *Sinocalamus beecheyanus* var. *pubescens* P.F. Liou e *P. nigra* var. *henonis*. Esse extrato contém diversos componentes biologicamente ativos, como triterpenoides, saponinas e esteróis (CHEN et al., 2002a, 2002b).

No EBS de *B. tuldoidea* foram identificados os triterpenoides (friedelina, lupeol, lupenona) (Figura 8), assim como α -amirina e β -amirina. Segundo o autor, esse extrato prolongou a resistência dos ratos em natação, apresentando uma atividade antifadiga atribuída aos triterpenoides (ZHANG et al., 2006).

Figura 8. Estrutura química dos principais triterpenoides encontrados em espécies de bambu. (A) friedelina; (B) friedelanol; (C) lupenona; (D) lupeol. Fonte: LU et al., 2010

No EBS de *P. nigra* var. *henonis* foi identificado um total de 73,6% de triterpenoides, entre os quais citam-se friedelina (24,9%), friedelanol (22,3%), lupenona (6,1%), lupeol (5,0%) (Figura 8), α -amirina (7,1%), oleanan-3-one (8,2%), esqualeno (15,3%), e alguns compostos nitrogenados (9,2%) (ZHANG et al., 2004).

Este extrato apresentou atividade hiperlipidêmica e anti-hipertensiva simultaneamente, e o principal composto isolado (friedelina) exerceu função vasodilatadora, em conformidade com o efeito anti-hipertensivo do extrato, sugerindo que este último poderia atuar como agente quimiopreventivo em doenças cardiovasculares (JIAO, et al, 2007). O extrato apresentou baixa toxicidade (ZHANG et al., 2004) e fraca atividade antitumoral foi observada em comparação com outros medicamentos, contudo, segundo os autores, o extrato possui potencial para o desenvolvimento e a aplicação em sistemas alimentares ou em alimentos funcionais

com atividade antitumoral e na medicina natural (LU et al., 2010). A concentração inibitória mínima do EBS foi determinada pelo método de difusão em ágar e os resultados frente a bactérias (*S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*) e fungos (*Penicillium citrinum* e *Saccharomyces cerevisiae*) variaram de 4,9 a 16,0 mg/mL, os quais foram correlacionados com a concentração total de antraquinonas (2,59 µg/mL) (ZHANG et al., 2010).

Os extratos obtidos de folhas, rizomas e colmos de *Chusquea meyeriana* Rupr. ex Döll, *Merostachys magellanica* Send. e *Apoclada simplex* foram avaliados para a atividade antioxidante na concentração de 100 µg/mL, em que os extratos das folhas de *M. magellanica* e *A. simplex* foram capazes de suprimir o radical DPPH em 66% e 78%, respectivamente, contudo, todos os extratos na concentração de 2,5 mg/mL exibiram fraca ou nenhuma atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, *E. coli* e *Candida albicans* (MORENO et al., 2011).

Alguns estudos descrevem que a presença de fenólicos em espécies de bambu atuaria como aleloquímicos (CHOU; HOU, 1981; CHOU, 2010). Os compostos fenólicos (quercetina, rutina e ácido ferúlico) presentes nos extratos das folhas de *Aulonemia aristulata* (Döll) McClure inibiram a germinação de *Lactuca Sativa* L., indicando que esses compostos químicos atuariam como aleloquímicos (GROMBONE-GUARATINI et al., 2009).

3. Objetivos

O presente estudo tem como objetivo o estudo das atividades antimicrobiana e antioxidante de *Apoclada simplex* McClure & Smith, visando uma futura aplicação como um ativo natural em formulações cosméticas.

São objetivos específicos:

- determinar o perfil cromatográfico em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) das frações;
- quantificar a presença de fenólicos totais e flavonoides;
- avaliar a capacidade antioxidante utilizando o método de DPPH;
- avaliar a atividade antimicrobiana utilizando o método de microdiluição;
- avaliar o efeito da associação dos extratos brutos com os conservantes sintéticos parabenos (metilparabeno e propilparabeno).

4. Material e métodos

4.1. Material

O material vegetal, folhas e colmos de *A. simplex*, foi coletado em abril de 2012 no Parque Estadual do Rio Turvo, no município de Barra do Turvo (24°53'S48°22'W), em São Paulo, SP. Exsicata do material foi depositada no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo, sob o número SP454412. A espécie foi identificada pelo Dr. Tarcisio S. Filgueiras.

4.2. Métodos

4.2.1. Preparo do material vegetal

As folhas e colmos da *A. simplex* foram secos à temperatura ambiente em casa de vegetação. Folhas foram trituradas em liquidificador industrial (SIRE), e os colmos foram triturados em moinho de faca (TECNAL TE-580), e acondicionados em sacos de papel.

4.2.2. Obtenção dos extratos brutos

Para a obtenção dos extratos brutos, as folhas e colmos pulverizados de *A. simplex* foram submetidos à percolação com etanol 60% até a exaustão (FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL, 2ª Ed., 1959). O etanol foi eliminado por evaporação a 40 °C em rotaevaporador (Rotavapor R-114 BUCHI). A água residual foi eliminada por liofilização (Edwards, modelo L4 KR), com temperatura de congelamento de -40 °C e pressão reduzida de 0,1 mbar, por 48 horas. Os rendimentos dos extratos brutos em relação às drogas foram calculados, em seguida, os extratos foram acondicionados em frascos de vidro âmbar e mantidos em dessecador a vácuo.

4.2.3. Fracionamento

Os extratos brutos de folhas e colmos da *A. simplex* foram solubilizados na proporção de 10 g de folhas e 20 g de colmos para 500 mL de solvente (solução MeOH:H₂O 10:90 v/v) separadamente. Após a dissolução, os mesmos foram fracionados por extração com porções de 100 mL dos seguintes solventes, em ordem crescente de polaridade: hexano, clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol, até exaustão. As frações orgânicas foram coletadas separadamente, secadas com sulfato de sódio anidro e, após filtração, os solventes foram eliminados em evaporador rotatório (Rotavapor R-114 BUCHI), a pressão reduzida a 40 °C (Figura 9).

Figura 9. Fluxograma do fracionamento dos extratos brutos de folhas e colmos de *A. simplex*.

4.2.4. Determinação do perfil cromatográfico das frações de *A. simplex*

4.2.4.1. Cromatografia em Camada Delgada

As frações dos extratos brutos das folhas e colmos (hexano, clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanólica) foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa empregando como fase estacionária cromatofolhas de alumínio 60 F₂₅₄ (Merck®) com os sistemas eluentes descritos a seguir.

Sistema A (frações hexânicas) – Tolueno:éter (1:1 v/v); substâncias de referência foram cumarina e umbeliferona a 10% (p/v) em metanol; visualização: luz UV 366nm.

Sistema B (frações clorofórmio e acetato de etila) – Fase móvel contendo clorofórmio: metanol (9:1 v/v), substâncias de referência foram quercetina, rutina, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido cinâmico a 10% (p/v) em metanol, visualização: luz UV 366nm, reagente cromático NP/UV 366 nm.

Sistema C (fração *n*-butanólica) – Fase móvel contendo tetrahidrofurano: tolueno: ácido fórmico: água (16:8:2:1v/v), substâncias de referência foram rutina, quercetina, orientina, iso-orientina, vitexina e isovitexina a 10% (p/v) em metanol (WANG et al., 2010), visualização: luz UV 366 nm, reagente cromático NP/UV 366 nm.

O reagente cromático NP consistia de uma solução de difenilborilexietilamina a 1% (p/v) em metanol, que foi usada para aspersão das placas cromatográficas.

4.2.5. Determinação de fenólicos totais

A quantificação de fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu (AINSWORTH; GILLESPIE, 2007).

Os extratos brutos de folhas e colmos e suas frações clorofórmica, acetato de etila e *n*-butanólica foram dissolvidos em solução de metanol/água 80:20 (v/v) nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL para os extratos brutos, e de 250 e 500 µg/mL para as frações.

O ácido gálico foi utilizado como padrão externo, nas concentrações de 25, 35, 45, 55, 65, 75, 85 e 100 µg/mL, para construção de uma curva de calibração.

Em microplaca de 96 poços, 20 µL das amostras e do padrão, foram adicionados em 30 µL de água destilada, e em seguida, 50 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 100 µL de solução de carbonato de sódio a 700 mmol/L foram acrescentados e homogeneizados. Após 2 horas de reação no escuro, as absorbâncias foram determinadas em um comprimento de onda de 760 nm em espectrofotômetro Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek®. O branco consistia em 20 µL de metanol 80% (v/v), em vez da amostra, e os controles com 20 µL da amostra e 180 µL de água destilada foram realizados para corrigir (descontar) a absorbância a 760 nm.

O conteúdo de fenólicos totais foi expresso em microgramas equivalentes de ácido gálico (EAG) por miligrama de amostra (µg de EAG/mg). Todas as análises foram realizadas de forma triplicada, e os resultados expressos como média seguida do seu respectivo erro padrão.

4.2.6. Determinação de flavonoides totais

Para a quantificação, foi empregado o método colorimétrico utilizando o cloreto de alumínio (AlCl₃) como agente complexante. A metodologia utilizada foi adaptada da Farmacopeia Francesa (POZZI, 2007).

Os extratos brutos de folhas e colmos e suas frações clorofórmica, acetato de etila e *n*-butanólica foram dissolvidos em solução de metanol/água 80:20 (v/v) nas concentrações de 10, 7,5 e 5,0 mg/mL para os extratos brutos, e de 5, 3,5 e 2,5 mg/mL para as frações. A quercetina (Sigma Aldrich®) utilizada como padrão externo, nas concentrações de 25, 50, 75, 100, 125 e 150 µg/mL, para a construção da curva de calibração.

Em microplacas de 96 poços foram adicionados 20 µL das amostras e do padrão em 210 µL da solução de metanol 80%; em seguida, 20 µL da solução de cloreto de alumínio a 2% em metanol 80% foram acrescentados e homogeneizados. Após 30 minutos de reação no escuro, as absorbâncias foram determinadas em um comprimento de onda de 427 nm em espectrofotômetro Synergy HT Multi-Mode

Microplate Reader Biotek®. A solução de metanol 80% foi utilizada como branco, e os controles com 20 µL da amostra em 210 µL de metanol 80% foram realizados para corrigir (descontar) a absorbância a 427 nm.

O conteúdo de flavonóides totais foi expresso em microgramas equivalentes de quercetina por miligrama de amostra (µg de quercetina/mg). Todas as análises foram realizadas de forma triplicada, e os resultados expressos como média seguida do seu respectivo erro padrão.

4.2.7. Determinação da capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

A solução estoque do radical DPPH foi preparada na concentração de 150 µmol/L em metanol/água 80:20 (v/v). O DPPH radical foi solubilizado em metanol e após a sua completa solubilização foi adicionada água destilada para realizar a proporção de metanol 80%, e conservada em temperatura ambiente ao abrigo da luz (no escuro).

Os extratos brutos e frações clorofórmica, acetato de etila e *n*-butanólica foram dissolvidos em solução metanol/água 80:20 (v/v) nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 µg/mL. A quercetina utilizada como padrão externo nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 µg/L. O extrato de *Ginkgo biloba* (EGB 761) da Abbott foi utilizado como referência em atividade antioxidante. O comprimido de 80 mg foi triturado e dissolvido primeiramente em metanol, o sobrenadante foi pipetado para o balão e completou-se com água destilada para realizar a proporção de metanol 80%.

Em microplacas de 96 poços, 50 µL das amostras solubilizadas em solução de metanol 80% e 150 µL da solução de DPPH radical foram acrescentados e homogeneizados. O branco consistia de 200 µL de metanol 80%, e o controle foi preparado com 50 µL da solução de metanol 80% e 150 µL da solução de DPPH radical. Controles com 50 µL das amostras em 180 µL da solução de metanol 80% foram realizados para corrigir (descontar) a absorbância a 517 nm. Após 30 minutos

de reação na ausência de luz, as absorbâncias foram determinadas em um comprimento de onda de 517 nm em espectrofotômetro Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader Biotek®. As amostras foram processadas em triplicatas.

A capacidade sequestradora do radical foi expressa como porcentagem de redução e calculada usando a seguinte equação:

$$\% \text{ redução DPPH}\cdot = [(Ab_{sc} - Ab_{sa}) / Ab_{sc}] \times 100$$

Onde:

Ab_{sc} = Absorbância controle

Ab_{sa} = Absorbância amostra e ou quercetina

Os valores médios da capacidade antioxidante (CE₅₀) (concentração da amostra necessária para reduzir a concentração do radical DPPH em 50%) foram calculados através da regressão linear, plotando-se a porcentagem de atividade antioxidante em função de diferentes concentrações das amostras. Os valores foram expressos como média ± erro padrão.

4.2.8. Determinação da atividade antimicrobiana

4.2.8.1. Micro-organismos testados

Os micro-organismos testados foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6539), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404).

As cepas microbianas foram adquiridas da Seção de Coleção de Culturas do Instituto Fiocruz. As cepas liofilizadas foram ressuspensas em solução salina 0,85% (p/v) estéril, em seguida, ativadas, transferindo a suspensão para caldo nutritivo, com incubação adequada. A partir de cada cepa foram realizadas no máximo cinco subculturas, renovadas mensalmente.

4.2.8.2. Meios de cultura utilizados

Os meios de cultura (Difco®) utilizados foram preparados de acordo com as instruções do fabricante, caldo e ágar de caseína soja (TSB e TSA) e ágar e caldo de Sabouraud dextrose a 4% (p/p) (SDA e SDB).

4.2.8.3. Preparação e avaliação da viabilidade do inóculo

A partir de culturas estoques, as bactérias foram transferidas em estrias na superfície do meio de cultura inclinado ágar caseína de soja e incubadas a 35-37 °C por 24 horas. *C. albicans* foi cultivada em SDA e incubada a 20-25 °C por 48 horas.

Para *A. brasiliensis* foram necessários três tubos cultivados em SDA e incubados a 20-25 °C por sete dias. A massa celular resultante do crescimento foi recolhida em 9 mL de solução salina estéril 0,85% (p/v) contendo 1% (p/v) de polissorbato 80, a suspensão obtida foi padronizada através de diluições decimais seriadas.

A partir das suspensões padronizadas de cada micro-organismo, foram efetuadas as diluições necessárias com solução salina estéril para obter uma concentração de 10^3 UFC/mL, para bactérias e fungos.

No final de cada experimento foi realizado o plaqueamento da diluição microbiana para confirmação da viabilidade do inóculo.

4.2.8.4. Controle positivo

Soluções de 1 mg/mL foram preparadas com os padrões secundários de ciprofloxacino para bactérias, ou nistatina para fungos. Para cada controle positivo tomaram-se 10 µL dessa solução para que a concentração final fosse de 0,05 mg/mL em cada réplica.

4.2.8.5. Ensaio da atividade antimicrobiana

Para determinação da atividade antimicrobiana foi utilizado o método de microdiluição com técnicas assépticas, empregando microplacas de fundo chato estéreis, adaptando-se os volumes de inóculo, amostra e meio de cultura para 200 µL (ELOFF, 1998).

Os extratos brutos de folhas e colmos e suas frações clorofórmica, acetato de etila e *n*-butanólica foram dissolvidos em solução DMSO:MeOH 50:50 (v/v) na concentração de 1 mg/mL.

A microplaca utilizada possui 96 poços divididos em 12 colunas com 8 poços cada. As duas primeiras colunas da microplaca foram utilizadas para os controles do teste, que foram: 200 µL de TSB ou SDB (controle do meio de cultura), 200 µL de meio de cultura inoculado com o micro-organismo teste (controle de crescimento), 190 µL de meio de cultura inoculado com o micro-organismo teste e 10 µL de solvente (DMSO:MeOH 50:50 v/v) (controle do solvente), e 10 µL da solução de antibiótico e 190 µL de meio de cultura inoculado com o micro-organismo em estudo (controle positivo ou de atividade antimicrobiana). As colunas restantes foram destinadas ao ensaio propriamente dito, e os controles com 10 µL das amostras e 190 µL de meio de cultura (sem inóculo) foram realizados para corrigir (descontar) a absorbância das próprias amostras. Após a incubação de 24 horas a 35 °C, para bactérias, ou 48 horas a 25 °C, para leveduras, foram realizadas as leituras a 630 nm utilizando-se o leitor de microplacas (LGC Biotecnologia®).

Para *A. brasiliensis* o ensaio foi semelhante, no entanto, com incubação por 72 horas a 25 °C e não foi realizada a leitura no leitor de microplaca. A determinação da inibição foi visual, considerando presença ou ausência de crescimento.

Para cada micro-organismo em teste, foram realizadas no mínimo três réplicas, com três repetições consecutivas, e os resultados expressos como média seguida do seu respectivo erro padrão.

4.3. Ensaio da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBM/CFM) dos parabenos

CIM, CBM e CFM do metilparabeno e propilparabeno foram determinadas usando o protocolo do ensaio da atividade antimicrobiana descrito anteriormente, porém, utilizando o metilparabeno e propilparabeno em concentrações que variaram segundo escala pré-determinada para cada bactéria e fungo (DAVIDSON, SOFOS, BRANEN, 2005). Segundo o mesmo critério de avaliação, considera-se a CIM como a menor concentração na qual não se observou crescimento, mas após subcultura observou-se crescimento bacteriano, e CBM e CFM como a menor concentração onde não há crescimento bacteriano após subcultura em meio caldo triptose.

Para cada micro-organismo em teste, foram realizados no mínimo três replicas com três repetições consecutivas, e os resultados expressos como média.

4.4. Delineamento experimental para avaliar o efeito da associação dos extratos brutos com parabenos

Foi utilizado o planejamento experimental centroide simplex com pontos adicionais (Figura 10) para avaliar o efeito da associação dos extratos brutos de *A. simplex* com os parabenos, composto por dez ensaios diferentes para determinar os valores de todos os seus coeficientes, com resultados apresentados na forma de gráficos de superfície resposta. As variáveis independentes selecionadas neste estudo foram a CIM do metilparabeno (x_1), a CIM do propilparabeno (x_2), e o extrato bruto de folhas ou colmos na concentração de 1 mg/mL (x_3).

Em experimentos envolvendo uma mistura, a soma das proporções das variáveis (componentes) é sempre igual a 100% (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007).

O espaço experimental para misturas de três componentes limita-se aos pontos pertencentes a um triângulo equilátero (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007). Os vértices correspondem aos componentes puros e as laterais, às misturas binárias, enquanto os pontos situados no interior do triângulo representam as misturas dos três componentes (misturas ternárias) (MONTGOMERY, 2013).

Figura 10. Representação Gráfica do planejamento experimental centroide simplex com pontos adicionais para misturas ternárias. Fonte: Minitab®

As dez composições foram preparadas de acordo com o planejamento centroide simplex com pontos adicionais para misturas de três componentes. A Tabela 1 apresenta as composições estudadas.

Tabela 1. Composições obtidas através do planejamento centroide simplex com pontos adicionais.

Proporções do extrato bruto de folhas ou colmos nas composições* (%)			
Composições	Metilparabeno	Propilparabeno	Extrato
1	100,0	0,0	0,0
2	0,0	100,0	0,0
3	0,0	0,0	100
4	50,0	50,0	0,0
5	50,0	0,0	50,0
6	0,0	50,0	50,0
7	33,3	33,3	33,3
8	50,0	25,0	25,0
9	25,0	50,0	25,0
10	25,0	25,0	50,0

* O delineamento considerou o valor da CIM dos parabenos para cada micro-organismo e 1,0 mg/mL para os extratos.

A atividade antimicrobiana das composições foi testada usando o protocolo do ensaio da atividade antimicrobiana de acordo com o que foi descrito anteriormente (item 4.2.8.5), utilizando ainda como ensaio controle o solvente (DMSO:MeOH 50:50) ao invés das soluções dos extratos nas composições.

Após a incubação de 24 horas a 37 °C para as bactérias e de 48 horas a 25 °C para leveduras foi realizada a leitura a 630 nm utilizando-se o leitor de microplacas (LGC Biotecnologia®).

Para *A. brasiliensis* o ensaio foi semelhante, no entanto, com incubação por 72 horas a 25 °C e não foi realizada a leitura no leitor de microplaca. A determinação foi visual, considerando presença ou ausência de crescimento.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata para cada micro-organismo em teste.

4.4.1. Análise estatística

Para obter o melhor ajuste da resposta, modelos matemáticos devem ser ajustados aos dados do planejamento experimental. Foram testados modelos lineares, quadráticos, cúbicos e quárticos, e a adequação destes foi avaliada pela análise do valor de p , a soma dos quadrados devido ao erro puro (Seq SS), a soma dos quadrados de predição (PRESS), e o coeficiente de regressão predito (R^2_{pred}). A interpretação do modelo gerado pôde ser feita a partir da projeção de sua curva de nível em um gráfico bidimensional.

Realizada a análise de variância, e obtido um modelo polinomial ajustado à resposta, sua otimização foi realizada pela técnica proposta por Derringer e Suich (1980). Esta se baseia na função de desejabilidade restrita no intervalo de $[0,1]$, para a qual se adotaram como limites inferior, médio e superior os valores de 0; 0,5; e 1,0, respectivamente. Foi utilizada a ferramenta gráfica de otimização do Minitab® para obter o conjunto de resposta otimizada, ou seja, uma composição contendo a mistura dos três componentes (metilparabeno, propilparabeno e extrato de folhas ou colmos de *A. simplex*) que atingisse a desejabilidade global (inibição de 100% de um micro-organismo).

5. Resultados e discussão

5.1. Obtenção dos extratos brutos e frações

As quantidades empregadas na extração e os rendimentos dos extratos brutos de folhas e colmos de *A. simplex* são descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Rendimento dos extratos brutos de folhas e colmos de *A. simplex*

Parte da planta	Material seco moído (g)	Massa do extrato bruto (g)	Rendimento (%)
Folhas	386,6	24,05	6,2
Colmos	1.290,0	67,50	5,2

O fracionamento dos extratos brutos de folhas e colmos de *A. simplex* foi executado com solventes de polaridade crescente até a exaustão, e os rendimentos são mostrados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Rendimento das diferentes frações preparadas a partir de 10g de extrato bruto de folhas de *A. simplex*.

Fração	Massa da fração (g)	Rendimento (%)
Hexânica	0,14	1,4
Clorofórmica	0,75	7,5
Acetato de etila	1,41	14,1
<i>n</i> -butanólica	2,39	23,9

Tabela 4. Rendimento das diferentes frações preparadas a partir de 20g de extrato brutos de colmos de *A. simplex*.

Fração	Massa da fração (g)	Rendimento (%)
Hexânica	0,13	0,6
Clorofórmica	2,04	10,2
Acetato de etila	3,24	16,2
<i>n</i> -butanólica	4,34	21,7

Normalmente, o uso do *n*-butanol nos fracionamentos permite a obtenção dos heterosídeos (flavonoides ligados a açúcares) (YUNES; CALIXTO, 2001). As frações *n*-butanólicas, tanto de folhas como de colmos, apresentaram os maiores rendimentos em relação às demais frações, indicando que *A. simplex* possui maior quantidade de compostos mais polares, provavelmente compostos fenólicos glicosilados. O fracionamento do extrato bruto de brotos de *P. pubescens* e *P. nigra* também apresentou maior rendimento com os solventes mais polares, butanol e água, como observado para *A. simplex* (PARK; JHON, 2010).

5.2. Determinação do perfil cromatográfico

5.2.1. Cromatografia em Camada Delgada

Com o intuito de analisar os compostos das frações de folhas e colmos de *A. simplex*, realizou-se a análise fitoquímica preliminar. A determinação do perfil cromatográfico foi realizada para as frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e *n*-butanólica de folhas e colmos de *A. simplex*, utilizando três diferentes sistemas solventes. Como substância referência, para cada classe de princípio ativo, utilizou-se ácido cinâmico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido clorogênico, rutina, quercetina, vitexina, isovitexina, orientina, iso-orientina, umbeliferona e cumarina, como descrito anteriormente (item 4.2.4).

Os perfis cromatográficos obtidos a partir da Cromatografia em Camada Delgada são ilustrados nas Figuras 11 (cromatoplaça das frações hexânica), 12-13 (cromatoplaças das frações clorofórmica e acetato de etila), e 14 (cromatoplaça das frações *n*-butanólicas):

Figura 11. Cromatoplaça das frações hexânicas de folhas e colmos de *A. simplex*. 1. Cumarina; 2. Umbeliferona; 3. Fração hexânica de folhas; 4. Fração hexânica de colmos. Fase Móvel (FM): tolueno: éter (1:1). Visualização sob a luz UV 366 nm.

Figura 12. Cromatoplaça das frações clorofórmica e acetato de etila das folhas e colmos de *A. simplex*. 1. Ácido cinâmico; 2. Ácido gálico; 3. Ácido ferúlico; 4. Ácido clorogênico; 5. Rutina; 6. Quercetina; 7. Umbeliferona; 8. Cumarina; 9. Fração clorofórmica de folhas; 10. Fração acetato de etila de folhas; 11. Fração clorofórmica de colmos; 12. Fração acetato de etila de colmos. Fase Móvel (FM): clorofórmio e metanol (9:1). Visualização sob a luz UV 366 nm.

Figura 13. Cromatoplaca das frações clorofórmica e acetato de etila das folhas e colmos de *A. simplex*. 1. Ácido cinâmico; 2. Ácido gálico; 3. Ácido ferúlico; 4. Ácido clorogênico; 5. Rutina; 6. Quercetina; 7. Umbeliferona; 8. Cumarina; 9. Fração clorofórmica de folhas; 10. Fração acetato de etila de folhas; 11. Fração clorofórmica de colmos; 12. Fração acetato de etila de colmos. Fase Móvel (FM): clorofórmio e metanol (9:1). (A) Visualização sob a luz UV 366 nm. Relação com NP e visualização sob a luz UV 366 nm.

Figura 14. Cromatoplaca das frações *n*-butanólica das folhas e colmos de *A. simplex*. 1. Fração *n*-butanólica das folhas; 2. Fração *n*-butanólica dos colmos; 3. Orientina; 4. Isoorientina; 5. Vitexina; 6. Isovitexina. Fase Móvel (FM): tetrahidrofurano: tolueno: ácido fórmico: água (16:8:2:1). (A) Visualização sob a luz UV 366 nm, (B) Revelação com NP, seguida da visualização sob a luz UV 366 nm.

A comparação do perfil cromatográfico das frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila de folhas e colmos com os padrões utilizados de compostos fenólicos, flavonoides e cumarinas não indicou a presença destes nessas frações.

Analisando as frações mais polares (Figura 14), nota-se uma mancha amarela após a revelação com NP com o fator de retenção ($R_f = 0,21$), similar ao padrão de iso-orientina ($R_f = 0,22$), resultado que pode sugerir a presença dessa flavona C-glicosilada em *A. simplex*. Nos extratos comerciais obtidos de folhas de *P. nigra* var. *henonis* foram identificadas as principais flavonas C-glicosiladas, como vitexina, isovitexina, orientina e iso-orientina (WANG et al., 2010). Outras manchas reagiram com o NP, as quais podem ser sugestivas de flavonoides, mas seriam diferentes daqueles encontrados em espécies de bambus asiáticos.

5.3. Determinação de substâncias fenólicas

A quantificação de substâncias fenólicas foi realizada para os extratos brutos de folhas e colmos e frações clorofórmica, acetato de etila e *n*-butanólica de *A. simplex*. O ácido gálico foi utilizado como padrão externo para a construção da curva de calibração (Figura 15). Os resultados finais foram expressos como equivalentes de ácido gálico ($\mu\text{g}/\text{EAG}$) por miligrama de amostra (Tabela 5).

Figura 15. Curva de calibração do ácido gálico utilizado para a determinação da concentração de substâncias fenólicas nos extratos brutos de folhas e colmos e as frações clorofórmica, acetato de etila e *n*-butanólica de *A. simplex*.

Tabela 5. Quantificação de substâncias fenólicas de *A. simplex* utilizando a metodologia de Folin-Ciocalteu.

Amostras (g)	Fenólicos totais (μg *EAG/mg)
Folhas	
Extrato bruto	58,36 $\pm$ 1,69
Fração Clorofórmica	108,0 $\pm$ 2,37
Fração acetato de etila	100,5 $\pm$ 1,90
Fração <i>n</i> -butanólica	70,67 $\pm$ 3,15
Colmos	
Extrato bruto	131,4 $\pm$ 5,97
Fração Clorofórmica	117,0 $\pm$ 1,16
Fração acetato de etila	103,9 $\pm$ 2,10
Fração <i>n</i> -butanólica	92,0 $\pm$ 0,92

*EAG: equivalente ácido gálico. Nota: Os resultados estão expressos como média seguida do erro padrão

Os resultados obtidos indicam maior quantidade relativa de compostos fenólicos totais no extrato bruto dos colmos (131,4 $\pm$ 5,97 μg EAG/mg) em comparação com aquele das folhas (58,4 $\pm$ 1,69 μg EAG/mg). Entretanto, observa-se que as concentrações de compostos fenólicos nas frações clorofórmica e acetato de etila de folhas (108,0 $\pm$ 2,37 e 100,5 $\pm$ 1,90 μg EAG/mg) e nas mesmas frações de colmos (117,0 $\pm$ 1,16 e 103,9 $\pm$ 2,10 mg EAG/g) são muito próximas (Tabela 6).

O extrato de folhas de *P. nigra* var. *henonis* (AOB) apresenta uma diferença de 2% a mais no teor de compostos fenólicos em comparação ao extrato de folhas *A. simplex* (ZHANG, 2002). Teores de compostos fenólicos inferiores foram relatados em outras espécies. Nos extratos de folhas e colmos de *Sasa palmata* (hort. ex Burb.), o teor de compostos fenólicos foi respectivamente 6 e 40 vezes menor em comparação ao encontrado em folhas e colmos de *A. simplex* (KUROSUMI et al., 2007). Em estudos conduzidos por Macwan, Patele Kalia (2010), demonstrou-se que o extrato metanólico de folhas de *Bambusa arundinacea* (Retz.) Willd apresentou o maior teor de compostos fenólicos entre a extração com outros solventes, mas foi 4 vezes menor ao encontrado no extrato de folhas de *A. simplex*.

5.4. Determinação de flavonoides totais

Os flavonoides são os compostos de maior interesse científico entre os fenólicos, são quimicamente classificados de acordo com a presença ou não de um anel central, de uma dupla ligação no anel e de um grupo hidroxila a ele ligado (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998).

A quantificação de flavonoides foi realizada para os extratos brutos e frações de folhas e colmos *A. simplex* de acordo com o descrito anteriormente (item 4.2.6), empregando quercetina como padrão externo para a construção da curva de calibração (Figura 16). Os resultados foram expressos como equivalentes de quercetina (μg /por miligrama de amostra) (Tabela 6).

Figura 16. Curva de calibração do padrão externo quercetina, utilizada para a quantificação de flavonoides totais contidos nos extratos brutos de folhas e colmos e as frações clorofórmica, acetato de etila e n-butanólica de *A. simplex*.

Tabela 6. Quantificação de flavonoides totais de *A. simplex* com utilização de cloreto de alumínio como agente complexante.

Amostras	Flavonoides totais (μg de quercetina/mg)
Folhas	
Extrato bruto	12,40 $\pm$ 0,39
Fração clorofórmica	16,72 $\pm$ 0,50
Fração acetato de etila	27,31 $\pm$ 1,22
Fração <i>n</i> -butanólica	24,05 $\pm$ 0,37
Colmos	
Extrato bruto	4,44 $\pm$ 0,08
Fração clorofórmica	7,99 $\pm$ 0,05
Fração acetato de etila	6,01 $\pm$ 0,06
Fração <i>n</i> -butanólica	5,11 $\pm$ 0,25

Nota: Os resultados de flavonoides totais e porcentagem estão expressos como média seguida do seu erro padrão.

Os teores de constituintes totais em derivados vegetais dependem do processo de extração e suas variáveis, como o solvente utilizado. Os dados mostraram que o maior teor de flavonoides totais foi concentrado na fração acetato de etila de folhas com 27,31 $\pm$ 1,22 μg de quercetina/mg, seguida pela fração *n*-butanólica com 24,05 $\pm$ 0,37 μg de quercetina/mg. Nota-se que entre as frações dos colmos, o teor de flavonoides se concentra na fração clorofórmica com 7,99 $\pm$ 0,05 μg de quercetina/mg, seguida pelas frações acetato de etila, com 6,01 $\pm$ 0,06 μg de quercetina/mg, e *n*-butanólica, com 5,11 $\pm$ 0,25 μg de quercetina/mg. Dessa forma, os solventes menos polares (clorofórmio e acetato de etila) permitiram recuperar mais agliconas livres pouco polares, como flavonas, flavonóis e flavononas, e solventes mais polares permitiram recuperar flavonoides glicosilados (YUNES; CALIXTO, 2001). O teor de flavonoides no extrato de folhas de *A. simplex* foi duas vezes maior ao encontrado no extrato de folhas *B. arundinacea* (MACWAN; PATEL; KALIA, 2010).

5.5. Determinação da capacidade antioxidante

Muitas substâncias naturais, obtidas especialmente de plantas, têm sido identificadas como captadoras de espécies reativas de oxigênio. A capacidade antioxidante dos extratos e frações de *A. simplex* foi avaliada pelo método de sequestro de radicais livres, utilizando o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), conforme descrito anteriormente (item 4.2.7). Este método é baseado na redução do radical DPPH na presença de substâncias antioxidantes, ocasionando na solução uma mudança de cor do violeta ao amarelo (MENSOR et al., 2001). Os resultados do ensaio com DPPH foram apresentados como valor de CE_{50} (Tabela 7), definida como a concentração efetiva de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50%.

Tabela 7. Concentração efetiva (CE_{50}) dos extratos brutos e frações clorofórmica, acetato de etila e *n*-butanólica de *A. simplex* obtida no ensaio de determinação de atividade antioxidante.

Amostras	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	R^2
Quercetina	3,98 $\pm$ 0,01	0,994
Extrato <i>G. biloba</i> EGb 761®	36,57 $\pm$ 0,17	0,987
Folhas		
Extrato bruto	67,54 $\pm$ 0,14	0,990
Fração clorofórmica	63,13 $\pm$ 0,22	0,983
Fração acetato de etila	26,34 $\pm$ 0,33	0,984
Fração <i>n</i> -butanólica	61,32 $\pm$ 0,21	0,984
Colmos		
Extrato bruto	60,73 $\pm$ 0,41	0,993
Fração clorofórmica	24,02 $\pm$ 0,68	0,985
Fração acetato de etila	30,55 $\pm$ 0,66	0,988
Fração <i>n</i> -butanólica	64,55 $\pm$ 0,50	0,983

A mudança de coloração do violeta para amarelo mostrou o declínio na absorbância do radical DPPH em 517 nm causado pela reação entre os antioxidantes presentes nos extratos e frações e o radical livre, dessa forma, pode-se dizer que esses extratos e frações de folhas e colmos de *A. simplex* podem atuar como doadores de elétrons ou hidrogênio para o sequestro de radicais livres e convertê-los para produtos mais estáveis. A análise dos resultados considera como valor de referência a CE₅₀ do *G. biloba* (36,57±0,17 µg/mL) para comparar a atividade antioxidante dos extratos brutos e frações de folhas e colmos de *A. simplex*, por este ser considerado um extrato com alta atividade antioxidante já sendo empregado em fitoterápicos devido a essas propriedades (MENSOR et al., 2001). As maiores atividades antioxidantes, ou seja, os menores valores de CE₅₀ foram obtidos para a fração clorofórmica de colmos (24,02±0,68 µg/mL), seguida pela fração clorofórmica de folhas (26,34± 0,33 µg/mL), e pela fração acetato de etila de colmos (30,55±0,66 µg/mL). Observou-se que essas atividades antioxidantes foram mais intensas do que aquela obtida para o extrato de *G. biloba* (EGB 761). Esse fato se deve provavelmente ao teor de compostos fenólicos e principalmente de flavonoides presentes nessas frações.

Contrariamente isso não ocorre nas frações *n*-butanólica de folhas e colmos. A ação antioxidante dos flavonoides depende da estabilidade do radical flavonol formado, dada a sua habilidade em deslocalizar o elétron desemparelhado, no entanto, a presença de grupos glicosídeos interfere na planaridade do radical e na deslocalização do elétron, o que diminui a possibilidade de transferência de elétrons para o radical DPPH (AGUIAR et al., 2009), o que poderia explicar a baixa atividade encontrada nas frações *n*-butanólicas onde são esperados os compostos glicosilados, isto pode ser observado na Figura 17. Na quercetina, esse comportamento não é observado, pois os fatores que auxiliam na estabilização do radical flavonol da quercetina são a presença de hidroxilas orto no anel B, insaturação e hidroxila na posição 3 do anel C (AGUIAR et al., 2009).

Figura 17. Comparativo do teor de flavonoides (μg de quercetina/mg de amostra) com, CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtido no ensaio de seqüestro do radical DPPH.

Algumas espécies de bambu asiáticas foram estudadas quanto à capacidade antioxidante. Em folhas do gênero *Chimonocalamus* J.R. Xue & T.P. Yi foi observada uma forte atividade antioxidante, com $\text{CE}_{50} = 30,50 \text{ mg/L}$ (WANG et al., 2012).

Em outros estudos, os valores da CE_{50} não foram menores que $100 \mu\text{g/mL}$. A fração acetato de etila obtida dos brotos de *P. nigra* exibiu a melhor capacidade antioxidante entre o extrato bruto e as frações clorofórmica e butanólica, com $\text{CE}_{50} = 0,4 \text{ mg/mL}$. Essa atividade foi diretamente correlacionada com a quantidade de compostos fenólicos encontrados nessa fração (PARK; JHON, 2010). O extrato metanólico obtido de folhas de *B. arundinacea* apresentou um valor de $\text{CE}_{50} = 273 \mu\text{g/mL}$ (MACWAN; PATEL; KALIA, 2010), ou seja, 5 vezes maior a encontrada no extrato das folhas de *A. simplex*.

Contudo, para considerar o potencial antioxidante de novos extratos, faz-se necessária uma comparação simultânea da atividade antioxidante destes com um extrato referência em atividade antioxidante. Dessa forma, os extratos e frações de *A. simplex* podem ser considerados candidatos com potencial antioxidante quando comparado ao potencial antioxidante do extrato de *G. biloba*.

5.6. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos e frações de *A. simplex* foi determinada frente aos micro-organismos utilizados na avaliação de qualidade microbiana de produtos cosméticos (CTFA, 2001) utilizando-se o método de microdiluição de acordo com o item 4.2.8.5. Este requereu quantidades mínimas de amostra, possibilitou utilizar mais réplicas, tornando o método mais preciso e diminuindo o custo (ELOFF, 1998). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de crescimento dos micro-organismos em relação ao controle de crescimento (Tabela 8). Em relação ao *A. brasiliensis*, a análise foi qualitativa (visual), devido à característica deste micro-organismo não apresentar crescimento homogêneo, dificultando a leitura da absorbância.

Tabela 8. Porcentagem de inibição dos extratos brutos e frações de *A. simplex* (1mg/mL) em comparação com antibiótico (1mg/mL) frente a *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, e *Candida albicans* ATCC 10231 a 10^3 UFC/mL.

Amostras e controles (1mg/mL)	% Inibição dos extratos brutos e frações de <i>A. simplex</i>			
	<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027)	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)
C(+)	89,1±0,10 ^a	99,23±0,11 ^a	93,19±0,18 ^a	100 ^b
Solvente	4,4±0,22	4,32±0,07	0,00	2,87±0,09
Folhas extrato	22,63±0,21	13,82±0,17	18,67±0,33	9,24±0,16
F. clorofórmica	16,94±0,40	13,76±0,23	5,00±0,31	14,21±0,21
F. acetato etila	49,10±0,25	13,81±0,24	10,20±0,74	21,04±0,13
F. <i>n</i> -butanólica	13,07±0,31	9,60±0,38	22,88±0,69	24,27±0,19
Colmos extrato	24,07±0,55	13,58±0,24	31,26±0,41	61,89±0,23
F. clorofórmica	22,00±0,50	10,66±0,47	31,50±0,34	62,87±0,42
F. acetato etila	16,06±0,21	12,43±0,20	9,44±0,17	69,27±0,38
F. <i>n</i> -butanólica	23,69±0,35	17,47±0,15	6,03±0,12	54,54±0,25

Nota: C(+) = antibiótico 1 mg/mL; Solvente = DMSO:MeOH (1:1); ^aCiprofloxacina; ^bNistatina

Os resultados demonstraram que a atividade antimicrobiana dos extratos brutos e frações de *A. simplex* na concentração de 1 mg/mL não apresentaram inibição maior que 50% em nenhuma cepa de bactéria na concentração de 10^3 UFC/mL. Para a levedura *C. albicans* a porcentagem de inibição para o extrato bruto e frações de colmos variou de 54,54% a 69,54%.

Nenhuma amostra apresentou inibição para *A. brasiliensis*. Dessa forma, não foi determinado a CIM para os extratos e frações de *A. simplex* devido a essa ser maior que 1 mg/ml.

Na literatura, os estudos que envolvem extratos e compostos isolados a partir de espécies de bambu exibiram uma fraca ou nenhuma atividade antimicrobiana. O composto antimicrobiano 2,6-dimetoxi-*p*-bezoquinona isolado das folhas de *P. heterocycla* exibiu uma atividade fraca para bactérias Gram positivas, e nenhuma atividade para bactérias Gram negativas (NISHINA; UCHIBORI, 1991).

O extrato metanólico e as frações clorofórmica, acetato de etila e butanólica obtidas dos brotos de *P. nigra* não indicaram inibição diante de *E. coli*, *E. faecium*, *E. faecalis* e *S. mutans* em concentrações que variaram de 1 a 10 mg/mL. Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Abu-Shanabet al. (2004), que relataram que a resistência das bactérias Gram negativas não é rara, considerando que essa classe de bactérias pode oferecer barreira na permeabilidade, devido à composição química da parede celular.

A concentração inibitória mínima de aparas de bambu (espécie indefinida) foi determinada no método de difusão em ágar frente a micro-organismos causadores de deterioração em alimentos como *S. aureus*, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *A. brasiliensis*, *Penicillium citrinum* e *Saccharomyces cerevisiae*, e nos resultados as CIMs variaram de 4,9 a 16,0 mg/mL. O efeito inibitório do extrato foi considerado muito baixo em relação ao controle positivo de benzoato de sódio, no entanto, foi reportado como um agente antibacteriano, demonstrando atividade antimicrobiana contra os micro-organismos que causam deterioração em alimentos (ZHANG et al., 2010).

A melhor maneira para comparar a atividade antibacteriana *in vitro* de extratos de plantas é através de seus valores de CIM, mas a maioria dos estudos com extratos vegetais apresenta uma atividade fraca, com valores de CIM para extratos

brutos superiores a 100 µg/mL, e muitas vezes na ordem de mg/mL (MORENO, et al., 2013). Com isso, os resultados obtidos em espécies de bambu, incluindo *A. simplex*, que apresentaram atividade antimicrobiana > 1 mg/mL, não podem ser considerados com potencial antimicrobiano. Contudo, direcionou-se o trabalho para investigar a associação dos extratos brutos com conservantes sintéticos, na tentativa de propor um novo sistema conservante.

5.7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBM/CFM) dos parabenos

A atividade antimicrobiana dos parabenos tem sido avaliada frente uma ampla variedade de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Diversos estudos são realizados com diferentes cepas de bactérias, condições de incubação (pH, tempo, temperatura), meio de cultura, técnicas de ensaio e análise de dados. Por causa dessas diferenças, é difícil comparar resultados de diferentes estudos. Dessa forma, a concentração mínima inibitória foi realizada para o propilparabeno e metilparabeno com as cepas utilizadas na avaliação de qualidade microbiana de produtos cosméticos (CTFA, 2001), utilizando o método de microdiluição de acordo com o item 4.2.8.5, e os resultados são descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida e Fungicida Mínima (CBM/CFM) do metilparabeno e propilparabeno frente a *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) a 10^5 UFC/mL e *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) a 10^3 UFC/mL.

Micro-organismo	Metilparabeno (µg/mL)		Propilparabeno (µg/mL)	
	CIM	CFM/CBM	CIM	CFM/CBM
<i>S. aureus</i>	2000	3500	500	700
<i>P. aeruginosa</i>	1000	1250	500	600
<i>E. coli</i>	1000	2500	350	400
<i>C. albicans</i>	550	800	125	150
<i>A. brasiliensis</i>	700	ND	200	ND

ND = Não determinada

Os resultados da concentração mínima inibitória mostraram que quanto maior a cadeia alquílica do éster, maior a atividade antimicrobiana. O aumento desta relaciona-se com a diminuição da polaridade dos parabenos, sendo mais evidente diante de bactérias Gram positivas em comparação com as Gram negativas (DAVIDSON; SOFOS; BRANEN, 2005). Eklund (1980) e Freese et al. (1973) *apud* Davidson (2005), relataram que as bactérias Gram negativas são mais resistentes aos parabenos, provavelmente devido ao efeito de barreira pela camada de lipopolissacarídeo da parede celular.

5.8.Delineamento experimental para avaliar o efeito da associação dos extratos brutos com parabenos

As porcentagens de inibição de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, e *C. albicans* em função das variáveis metilparabeno, propilparabeno e extrato (colmos ou folhas), e solvente (experimento controle) obtidas pelas condições estabelecidas no delineamento experimental são apresentadas nas Tabelas 10, 12 e 14.

Todos os ensaios das composições contendo extrato (folhas ou colmos) e solvente (experimento controle) foram realizados em triplicata e os valores obtidos para a estimativa da resposta $\hat{y}$ “porcentagem de inibição” dos micro-organismos foram utilizados para a obtenção de modelos matemáticos (lineares, quadráticos, cúbicos e quárticos) ajustados aos dados experimentais para predizer a relação da resposta com os três componentes do delineamento experimental. De acordo com Montgomery (2013), termos de ordem superior (quarta ordem) são frequentemente necessários em modelos de misturas, primeiramente porque o fenômeno estudado pode ser complexo, e sequentemente porque a região experimental é com frequência a região de operabilidade total, portanto grande, requerendo um modelo elaborado. As Tabelas 11, 13 e 15 mostram os fatores de variação obtidos pela análise de variância para cada um dos modelos empíricos.

Tabela 10. Porcentagem de inibição de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* a 10^5 UFC/mL e *C. albicans* a 10^3 UFC/mL com diferentes proporções de metilparabeno (CIM), propilparabeno (CIM) e solvente (experimento controle).

Composições	Valores reais (X)			Respostas (Y)			
	% Componentes			% Inibição			
	X ₁ (M)	X ₂ (P)	X ₃ (S)	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
1	100,0	0,0	0,0	97,17±2,06	87,40±0,30	88,91±1,17	85,02±0,18
2	0,0	100,0	0,0	97,14±1,78	96,06±0,30	85,79±4,88	90,52±0,22
3	0,0	0,0	100,0	10,82±2,43	13,38±3,80	27,58±2,03	13,41±2,70
4	50,0	50,0	0,0	92,06±0,25	70,32±1,04	73,96±2,72	88,22±0,86
5	50,0	0,0	50,0	36,09±1,58	47,79±1,42	35,94±1,26	33,65±3,79
6	0,0	50,0	50,0	42,01±1,25	63,78±1,64	16,87±0,55	37,06±0,75
7	33,3	33,3	33,3	45,07±2,88	60,43±1,99	39,54±0,17	39,09±0,54
8	50,0	25,0	25,0	47,93±1,15	62,33±1,88	53,20±4,38	62,22±0,17
9	25,0	50,0	25,0	45,58±4,01	55,28±3,39	44,55±1,11	64,19±0,45
10	25,0	25,0	50,0	41,81±2,75	43,95±1,00	31,60±4,74	36,71±1,69

Nota: M = Metilparabeno, P = Propilparabeno, S = solvente DMSO:MeOH (1:1). Os resultados se referem a uma média de três determinações, seguida dos seus respectivos erros-padrão.

Tabela 11. Fatores de variação para as respostas de porcentagem de inibição de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans* nas composições contendo solvente (DMSO:MeOH 1:1) (experimento controle).

<i>S. aureus</i>							<i>P. aeruginosa</i>					
Regressão	GL	Seq SS	P	R ²	R ² (pred)	Press	GL	Seq SS	P	R ²	R ² (pred)	Press
Linear	2	19838,7	0,000	84,26	79,67	4787,75	2	12413,3	0,000	86,09	82,53	2519,06
Quadrática	3	2639,3	0,000	95,47	93,97	1419,10	3	1548,0	0,000	96,82	95,84	600,30
Cúbico completo	2	697,2	0,000	99,51	99,06	220,31	2	208,5	0,001	98,53	97,48	363,95
Quártico especial	1	255,7	*0,000	99,51	99,06	220,31	1	38,4	0,336	98,53	97,48	363,95
Quártico completo	1	13,2	0,122	99,57	99,03	227,92	1	130,7	*0,000	99,44	98,74	182,01
<i>E. coli</i>							<i>C. albicans</i>					
Regressão	GL	Seq SS	P	R ²	R ² (pred)	Press	GL	Seq SS	P	R ²	R ² (pred)	Press
Linear	2	12016,9	0,000	70,16	58,31	7141,80	2	17650,0	0,000	90,30	87,62	2419,03
Quadrática	3	4746,4	0,000	97,87	96,67	569,91	3	1344,3	0,000	97,17	96,56	671,72
Cúbico completo	2	25,0	0,069	98,96	97,83	371,60	2	29,8	0,000	97,34	95,80	821,27
Quártico especial	1	161,4	*0,014	98,96	97,83	371,60	1	2,4	0,000	97,34	95,80	821,27
Quártico completo	1	16,0	0,176	99,05	97,86	366,52	1	467,6	*0,000	99,73	99,39	118,98

Nota: *Modelo ajustado

*Significativo com 95% de probabilidade ($p \leq 0,05$)

GL=Graus de liberdade

Tabela 12. Porcentagem de inibição de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* a 10^5 UFC/mL e *C. albicans* a 10^3 UFC/mL com diferentes proporções de metilparabeno (CIM), propilparabeno (CIM) e extrato bruto dos colmos (1mg/mL).

	Valores reais (X)			Respostas (Y)			
	% Componentes			% Inibição			
Composições	X ₁ (M)	X ₂ (P)	X ₃ (C)	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
1	100,0	0,0	0,0	96,88±2,28	86,64±0,32	84,73±1,61	82,43±0,21
2	0,0	100,0	0,0	96,84±1,96	95,82±0,32	76,01±3,41	88,88±0,26
3	0,0	0,0	100,0	28,36±0,71	65,81±1,16	20,09±1,28	78,07±2,70
4	50,0	50,0	0,0	92,06±0,25	70,32±1,04	73,96±2,72	88,22±0,86
5	50,0	0,0	50,0	53,48±2,65	65,06±0,83	61,36±1,21	87,49±0,87
6	0,0	50,0	50,0	67,44±0,90	70,83±1,14	26,42±6,03	61,29±1,32
7	33,3	33,3	33,3	65,39±0,80	76,76±2,74	62,75±1,59	87,90±0,27
8	50,0	25,0	25,0	93,10±2,16	76,36±0,48	66,31±0,83	89,44±1,70
9	25,0	50,0	25,0	68,55±3,90	71,60±1,53	61,72±2,01	95,17±0,36
10	25,0	25,0	50,0	60,41±1,11	72,39±1,02	58,76±3,31	65,76±1,49

Nota: M = Metilparabeno, P = Propilparabeno, C = Extrato bruto dos colmos. Os resultados se referem a uma média de três determinações, seguida dos seus respectivos erros-padrão.

Tabela 13. Fatores de variação para as respostas de porcentagem de inibição de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans* nas composições contendo extrato bruto de colmos.

<i>S. aureus</i>							<i>P. aeruginosa</i>					
Regressão	GL	Seq SS	P	R ²	R ² (pred)	Press	GL	Seq SS	P	R ²	R ² (pred)	Press
Linear	2	12182,2	0,000	88,90	87,53	1708,92	2	1246,67	0,000	50,37	33,13	1655,06
Quadrática	3	148,8	0,000	89,98	87,74	1680,68	3	755,39	0,000	80,89	71,77	698,61
Cúbico completo	2	1122,9	0,000	98,21	96,95	418,07	2	84,01	0,000	98,01	96,73	80,89
Quártico especial	1	4,0	0,005	98,21	96,95	418,07	1	339,69	0,000	98,73	96,73	80,89
Quártico completo	1	167,6	*0,000	99,43	98,71	176,20	1	17,70	*0,003	98,73	97,14	70,81
<i>E. coli</i>							<i>C. albicans</i>					
Regressão	GL	Seq SS	P	R ²	R ² (pred)	Press	GL	Seq SS	P	R ²	R ² (pred)	Press
Linear	2	9801,5	0,000	84,13	80,73	2245,26	2	711,87	0,000	21,64	7,11	3055,85
Quadrática	3	1090,0	0,000	93,49	90,19	1143,11	3	1244,65	0,000	59,47	48,55	1692,56
Cúbico completo	2	216,1	0,000	98,63	97,02	346,75	2	1092,20	0,000	98,15	96,57	112,86
Quártico especial	1	382,3	*0,000	98,63	97,02	346,75	1	180,34	0,000	98,15	96,57	112,86
Quártico completo	1	1,4	0,680	98,64	96,94	356,94	1	28,85	*0,000	99,03	97,82	71,87

Nota: *Modelo ajustado

*Significativo com 95% de probabilidade ($p \leq 0,05$)

GL = Graus de liberdade

Tabela 14. Porcentagem de inibição de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* a 10^5 UFC/mL e *C. albicans* a 10^3 UFC/mL com diferentes proporções de metilparabeno (CIM), propilparabeno (CIM) e extrato bruto de folhas (1mg/mL).

Composições	Valores reais (X) % Componentes			Respostas (Y) % Inibição			
	X ₁ (M)	X ₂ (P)	X ₃ (F)	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
1	100,0	0,0	0,0	97,17±2,06	87,40±0,30	88,91±1,17	85,02±0,18
2	0,0	100,0	0,0	97,14±1,78	96,06±0,30	82,58±2,48	90,52±0,22
3	0,0	0,0	100,0	29,33±0,15	76,36±2,19	32,14±0,91	29,81±0,97
4	50,0	50,0	0,0	92,06±0,25	70,32±1,04	72,68±0,90	88,22±0,86
5	50,0	0,0	50,0	40,97±0,63	55,94±0,61	49,69±0,77	81,24±0,53
6	0,0	50,0	50,0	49,85±1,16	70,13±1,69	43,46±1,42	44,71±0,92
7	33,3	33,3	33,3	79,11±1,31	79,91±0,69	63,71±0,78	69,84±0,81
8	50,0	25,0	25,0	100,00	80,46±1,13	71,58±1,25	82,75±0,36
9	25,0	50,0	25,0	92,87±1,26	72,15±1,33	57,83±0,39	87,41±0,41
10	25,0	25,0	50,0	45,81±0,86	73,58±0,93	51,33±1,11	53,75±0,79

Nota: M = Metilparabeno, P = Propilparabeno, F = Extrato bruto das folhas. Os resultados se referem a uma média de três determinações, seguida dos seus respectivos erros padrão.

Tabela 15. Fatores de variação para as respostas de porcentagem de inibição de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans* nas composições contendo extrato bruto de folhas.

<i>S. aureus</i>							<i>P. aeruginosa</i>					
Regressão	GL	Seq SS	P	R ²	R ² (pred)	Press	GL	Seq SS	P	R ²	R ² (pred)	Press
Linear	2	16429,0	0,000	79,30	76,14	4943,77	2	804,72	0,020	25,17	0,63	3177,47
Quadrática	3	601,4	0,296	82,21	75,07	5165,26	3	1025,32	0,003	57,23	35,48	2063,19
Cúbico especial	1	1791,2	0,000	90,85	88,19	2446,42	1	1081,39	0,000	91,05	88,04	382,56
Cúbico completo	2	1845,0	0,000	99,76	99,56	90,57	2	234,73	0,027	98,39	97,03	95,09
Quártico especial	1	1791,2	0,000	99,76	99,56	90,56	1	1081,39	0,000	98,39	97,03	95,09
Quártico completo	1	23,4	*0,000	99,87	99,71	59,87	1	24,22	*0,000	99,15	98,08	61,29
<i>E. coli</i>							<i>C. albicans</i>					
Regressão	GL	Seq SS	P	R ²	R ² (pred)	Press	GL	Seq SS	P	R ²	R ² (pred)	Press
Linear	2	7655,18	0,000	88,58	84,91	1303,83	2	9522,6	0,000	77,90	73,30	3263,83
Quadrática	3	423,05	0,003	93,48	90,50	821,31	3	1803,1	0,000	92,65	91,09	1089,12
Cúbico especial	1	333,76	0,000	97,34	96,35	315,81	1	2,7	0,793	92,68	90,58	1151,02
Cúbico completo	2	181,08	0,000	99,43	98,91	94,10	2	824,5	0,000	99,42	99,09	111,36
Quártico especial	1	333,76	0,000	99,43	98,91	94,10	1	2,7	0,000	99,42	99,09	111,36
Quártico completo	1	18,38	*0,002	99,65	99,20	68,96	1	61,7	*0,000	99,93	99,84	20,16

Nota: *Modelo ajustado

*Significativo com 95% de probabilidade ($p \leq 0,05$)

GL = Graus de liberdade

A adequação dos modelos propostos foi avaliada pela análise do valor de p , que foram estatisticamente significantes ao nível estipulado $\leq 0,05$, assim como, o menor valor de PRESS e o maior valor de R^2 predito indicaram os modelos de maior capacidade preditiva. A avaliação conjunta de PRESS e R^2 predito evita um ajuste excessivo do modelo, pois usam observações não incluídas na estimativa do modelo (Minitab®).

Dessa forma, os modelos quárticos completos se ajustaram melhor aos dados experimentais da maioria dos ensaios realizados com extratos de folhas e colmos, e com solvente (experimento controle), exceto para o ensaio realizado com *S. aureus* e *E. coli* no experimento controle, e para aquele com *E. coli* no experimento com extrato de colmos, em que o modelo quártico especial se ajustou melhor aos dados experimentais. Isso ocorreu porque esses experimentos não necessitaram de mais termos para predizer a relação da resposta com os três componentes do delineamento experimental.

A região de combinação entre as três variáveis x_1 , x_2 e x_3 (metilparabeno, propilparabeno e extrato folhas ou colmos) e solvente (experimento controle) pode ser observada através das curvas de nível em um gráfico bidimensional, obtidas pelos modelos matemáticos ajustados aos dados experimentais e são apresentadas nas Figuras 18-20, correspondentes a resposta $\hat{y}(x)$ porcentagem de inibição de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans*.

Figura 18. Gráficos de contorno de nível para a inibição de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, e *C. albicans* em função das proporções de metilparabeno, propilparabeno e solvente (DMSO:MeOH 1:1) (experimento controle).

Figura 19. Gráficos de contorno de nível para a inibição de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, e *C. albicans* em função das proporções de metilparabeno, propilparabeno e extrato bruto de colmos.

Figura 20. Gráficos de contorno de nível para a inibição de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, e *C. albicans* em função das proporções de metilparabeno, propilparabeno e extrato bruto de folhas.

O experimento quantitativo não foi realizado com *A. brasiliensis*, devido à característica deste micro-organismo de não apresentar crescimento homogêneo, dificultando a leitura em absorbância. No entanto, o ensaio qualitativo (visual) foi realizado a fim de observar se alguma das composições apresentava inibição do fungo. A Figura 21 apresenta os resultados da inibição de *A. brasiliensis* em função das diferentes proporções de metilparabeno, propilparabeno e solvente (experimento controle).

- Composições 1 e 2 – metilparabeno e propilparabeno (CIM)
- Composição 3 - extrato bruto de folhas (1mg/mL), extrato colmos (1mg/mL)
- Composição 4 - metilparabeno + propilparabeno (1:1) (CIM)
- Composições 5 ao 10 - composições com extratos brutos de folhas ou colmos e solvente, nessa ordem
- Controles: meio de cultura (SDB), atividade antimicrobiana (Nistatina 1mg/mL)
- Controles: crescimento e solvente (DMSO:MeOH 1:1)

Figura 21. Atividade antimicrobiana das composições dos extratos brutos de folhas, ou colmos e solvente (controle) com concentração inibitória mínima (CIM) de metilparabeno e propilparabeno frente a *Aspergillus brasiliensis* a 10^3 UFC/mL.

As Figuras 18-20 mostram as curvas de nível obtidas da resposta $\hat{y}(x)$ porcentagem de inibição de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *C. albicans* em função das diferentes proporções das três variáveis (x_1 , x_2 , x_3). Nota-se que todas as composições contendo diferentes proporções de extrato (folhas ou colmos) exibiram valores de $\hat{y}(x)$ mais elevados para todos os micro-organismos quando comparadas ao solvente na mesma proporção (experimento controle). Isso indica que os extratos colaboram para um aumento de inibição nos micro-organismos testados. No entanto, essas composições demonstraram pouca eficácia para as bactérias Gram negativas quando comparadas àquelas Gram positivas. Isso pode ter ocorrido devido à composição diferenciada da membrana das bactérias Gram negativas. Sua parede celular possui um componente adicional, uma membrana externa, que corresponde a uma segunda bicamada lipídica, que adere firmemente à camada de peptidoglicano, conferindo-lhe maior rigidez. A face externa da membrana é rica em lipopolissacarídeos, o que a torna mais lipofílica em relação a substâncias exógenas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2011).

A análise individual das curvas de nível obtidas para a resposta $\hat{y}(x)$ porcentagem de inibição em *S. aureus* em função das três variáveis metilparabeno (x_1), propilparabeno (x_2) e extrato bruto de colmos (x_3), mostrou que o maior valor de $\hat{y}(x)$ está associado à interação ternária (composição 8). Em *C. albicans* os valores mais elevados de $\hat{y}(x)$ estão associados à interação binária (x_1 e x_3) (composição 5), assim como à interação ternária (composições 7, 8 e 9).

As curvas de nível obtidas para a resposta $\hat{y}(x)$ porcentagem de inibição em *S. aureus* e *C. albicans* em função das três variáveis metilparabeno (x_1), propilparabeno (x_2) e extrato bruto de folhas (x_3), mostraram que os valores mais altos de $\hat{y}(x)$ estão associados às interações ternárias (composições 8 e 9), além de uma interação binária (x_1 e x_3) (composição 5) em *C. albicans*.

Entre os efeitos sinérgicos associadas às interações ternárias em *S. aureus*, as composições contendo uma maior proporção de metilparabeno, promoveram maior efeito na inibição em comparação à composição ternária contendo maior proporção de propilparabeno. Isso ocorreu, porque a atividade inibitória das bactérias aumenta com a diminuição da polaridade dos parabenos, sendo mais evidente em bactérias Gram positivas (DAVIDSON, 2005).

Contudo, a composição ternária de metilparabeno, propilparabeno e extrato bruto de folhas (50:25:25 v/v) demonstrou um efeito mais pronunciado na inibição de *S. aureus* (100%), em relação à mesma composição contendo extrato bruto de colmos, em que a inibição foi de $93,10 \pm 2,16$ %.

Contrariamente, as composições que continham maior proporção de propilparabeno, foram as responsáveis pelo maior efeito de inibição em *C. albicans*, em que a composição contendo metilparabeno, propilparabeno e extrato de colmos na proporção de 25:50:25 v/v ocasionou o mais pronunciado efeito de inibição ($95,17 \pm 0,36$ %), em comparação à mesma composição contendo extrato bruto de folhas, em que a inibição atingiu $87,41 \pm 2,16$ %. Essas duas composições também inibiram em 100 % o crescimento de *A. brasiliensis* (Figura 22). Segundo Davidson (2005), isso ocorre porque a inibição dos fungos intensifica com o aumento da cadeia alquílica do éster.

A presença de compostos fenólicos nos extratos de *A. simplex* também poderia contribuir para a inibição dos micro-organismos. Os compostos fenólicos compartilham a capacidade de inibir os micro-organismos, portanto, eles podem ter um modo de ação comum (VIGIL; PALOU; ALZAMORA, 2005). Ainda, segundo esses autores, esses compostos exercem uma atividade antimicrobiana lesando as membranas contendo lipídeos, o que resulta no extravasamento do conteúdo celular. Tal atividade tem sido comprovada diante de diversas bactérias, reconhecendo-se que as bactérias Gram positivas são geralmente mais sensíveis.

No que se refere à otimização conjunta dos três componentes, o modelo quártico completo ajustado aos dados experimentais da porcentagem de inibição de *S. aureus* e *C. albicans* foram inseridos na função *Optimization Plot* (gráfico de otimização) do software Minitab®. Esta função basicamente utiliza o modelo ajustado para calcular o que seria a composição ideal para o parâmetro desejado, ou seja, a composição de cada componente que resultará na inibição desejada de 100% desses micro-organismos. As Figuras 22-25 apresentam as composições ótimas para inibição de *S. aureus* e *C. albicans* com as variáveis metilparabeno, propilparabeno e extrato (folhas ou colmos).

Figura 22. Gráfico de otimização da porcentagem de inibição de *S. aureus* em função das proporções de metilparabeno, propilparabeno e extrato de colmos. Valores preditivos de desejabilidade para a composição otimizada para inibição de *S. aureus*.

Figura 23. Gráfico de otimização da porcentagem de inibição de *C. albicans* em função das proporções de metilparabeno, propilparabeno e extrato de colmos. Valores preditivos de desejabilidade para a composição otimizada para inibição de *C. albicans*.

Figura 24. Gráfico de otimização da porcentagem de inibição de *S. aureus* em função das proporções de metilparabeno, propilparabeno e extrato de folhas. Valores preditivos de desejabilidade para a composição otimizada para inibição de *S. aureus*.

Figura 25. Gráfico de otimização da porcentagem de inibição de *C. albicans* em função das proporções de metilparabeno, propilparabeno e extrato de folhas. Valores preditivos de desejabilidade para a composição otimizada para inibição de *C. albicans*.

Nas Figuras 22-25 são apresentados os gráficos fornecidos pela ferramenta do Minitab® em que apresentam em destaque (na cor vermelha) as proporções de cada componente para atingir, de acordo com o modelo, a inibição de 100% (em azul nas figuras). Na parte superior da figura, temos o gráfico do comportamento da desejabilidade em função das proporções das variáveis individualmente (metilparabeno, propilparabeno e extrato de folhas ou colmos), e na parte inferior, o gráfico para a inibição do micro-organismo. Nota-se que para o valor de inibição desejado a desejabilidade é 1, pois o valor de inibição obtido para a composição em destaque, através dos modelos, é exatamente o valor desejado, o que indica, que para as composições em destaque, segundo o modelo, os resultados desejados foram atingidos.

Os resultados otimizados para *S. aureus* demonstraram que é necessária uma porcentagem menor de extrato de folhas do que empregado no experimento, formando uma composição de metilparabeno, propilparabeno e extrato bruto de folhas (13:67:20 v/v), a qual deve produzir a maior inibição. Com relação ao extrato de colmos, foi obtida uma proporção ideal empregando uma quantidade maior do extrato, metilparabeno (60): propilparabeno (11): colmos (29). Outro ponto notado, é que a quantidade de cada parabeno em particular se altera conforme o tipo de extrato, resultados que podem sugerir diferentes mecanismos sinérgicos entre folhas e colmos na mistura com parabenos.

Em *C. albicans*, as composições ótimas não diferem muito entre os extratos, uma vez que a composição contendo extrato de colmos apresentou como proporção ideal metilparabeno, propilparabeno e extrato (25:56:19 v/v), e para as folhas a proporção otimizada foi de 13:65:22 v/v. Estes resultados estão em consonância com a presença de compostos fenólicos, incluindo os flavonoides, e com a forte atividade antioxidante observada nos experimentos que podem ser responsáveis pelo sinergismo apresentado em associação com parabenos.

De acordo com Herman et al. (2012), misturas de diferentes extratos e óleos essenciais podem efetivamente inibir o crescimento de micro-organismos e ampliar o espectro de atividade, e reduzir significante a quantidade de conservantes sintéticos adicionados em formulações cosméticas.

Contudo, este trabalho demonstrou que a interação de extratos brutos de *A. simplex* com parabenos (metilparabeno e propilparabeno), mostrou-se importante para a inibição de micro-organismos, principalmente em *S. aureus* e *C. albicans*, devido ao sinergismo observado. Desta forma, esses extratos podem propiciar um avanço significativo na elaboração de sistemas conservantes quando se visa à redução de parabenos em formulações cosméticas.

6. Conclusões

Com a realização deste trabalho conclui-se que:

- o extrato bruto de colmos possui a maior concentração de compostos fenólicos;
- a maior concentração de flavonoides foi observada no extrato bruto e frações de folhas, principalmente a fração acetato de etila;
- os extratos brutos de folhas e colmos, principalmente a fração clorofórmica de colmos de *A. simplex*, possuem capacidade antioxidante, confirmada por ensaio *in vitro* por meio do sequestro do radical DPPH;
- os extratos e frações de colmos e folhas de *A. simplex* não apresentaram uma atividade antimicrobiana considerável frente a *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *E. coli* ATCC 8739, *C. albicans* ATCC 10231, *A. brasiliensis* ATCC 16404, apresentando uma concentração inibitória mínima > 1 mg/mL;
- os extratos brutos de folhas e colmos apresentaram sinergismo em associação com metilparabeno e propilparabeno frente a micro-organismos testados, principalmente em *S. aureus* e *C. albicans*, permitindo calcular uma composição ótima para atividade antimicrobiana com a diminuição de parabenos.
- os extratos de *A. simplex* podem ser candidatos efetivos como conservante natural associado aos parabenos (metilparabeno e propilparabeno) em futuros estudos de formulações cosméticas que visam a redução de parabenos.

Referências

ABU-SHANAB, B.; ADWAN, G.; ABU-SAFIYA, D.; JARRAR, N.; ADWAN, K. Antibacterial activities of some plant extracts utilized in popular medicine in Palestine. **Turkish Journal of Biology**, v.28, p.99-102, 2004.

AGUIAR, R.M.; REZENDE, L.C.; QUEIROZ, C.A.; JORGE, M.D.; JUCENI, P.D. Relação estrutura atividade antioxidante de quercetina e seus derivados glicosilados. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32, Fortaleza, 2009. **Resumos**. São Paulo: SBQ, 2009.

AINSWORTH, E.A.; GILLESPIE, K.M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plants tissues using Folin-Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, v.2, n.4, p.875-877, 2007.

AKAKABE, Y.; TAMURA, Y.; IWAMOTO, S.; TAKABAYASHI, M.; NYUGAKU, T. Volatile organic compounds with characteristic odor in bamboo vinegar. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.70, n.11, p.2797-2799, 2006.

ALVES, L.D.S.; ROLIM, L.A.; FONTES, D.A.F.; ROLIM-NETO, P.J.; LA ROCA, M.F.; SOARES SOBRINHO, J.L. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do Efavirenz por espectrofotometria no UV-Vis. **Química Nova**, v.33, p.1967-1972, 2010.

BAMBOO BIODIVERSITY. Disponível em <http://www.eeob.iastate.edu/research/bamboo/maps/world-total-woody.gif>. Acesso em: 14 jan. 2014.

BERALDO, A.L.; AZZINI, A. **Bambu: características e aplicações**; Guaíba: Agropecuária, 2004. 180p.

BPG (BAMBOO PHYLOGENY GROUP). An updated tribal and subtribal classification of the bamboos (Poaceae: Bambusoideae). **Bamboo Science and Culture: The Journal of the American Bamboo Society**, v.24, n.1, p.1-10, 2012.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.

BURMAN, A.G.; FILGUEIRAS, T.S. A review of the Wood Bamboo genera of Brazil (Gramineae: Bambusoideae: Bambuseae). **Thaiszia, Kosice**, v.3, p.53-88, 1993.

CALDERÓN, C.E.; SODERSTROM, T.R. **The genera of Bambusoideae (Poaceae) of the American Continent: keys and comments.** Washington: Smithsonian Institution Press, 1980.p.1-27. (Smithsonian Contributions to Botany, v.44).

CAO, H.; YUE, Y.; PENG, Z.; HUA, R.; TANG, F. Evaluation of extracts from bamboo for biological activity against *Culex pipiens pallens*. **Entomologia Sinica**, v.11, n.4, p.267-273, 2004.

CAO, Z.; ZHOU, G.; WEN, G.; JIANG, P.; ZHUANG, S.; QIN, H. Bamboo in subtropical China: efficiency of solar conversion into biomass and CO2 sequestration. **The Botanical Review**, v.77, p. 190-196, 2011.

CHAOWANA, P. Bamboo: An Alternative Raw Material for Wood and Wood-Based Composites. **Journal of Materials Science Research**, v.2, p. 90-102, 2013.

CHEN, Q.; WU, L.J.; RUAN, L.J. Chemical studies on the constituents of *Lophatherum gracile* Brongn. (II). **Journal of Shenyang Pharmaceutical University**, v.19, 257-259, 2002a.

CHEN, Q.; WU, L.J.; WANG, J.; LI, H. Chemical studies on the constituents of *Lophatherum gracile* Brongn. **Journal of Shenyang Pharmaceutical University**, v.19, p.23-24, 2002b.

CHOU, C.H. Role of allelopathy in sustainable agriculture: use of allelochemicals as naturally occurring bio-agrochemicals. **Allelopathy Journal**, v.25, n.1, p.3-16, 2010.

CHOU, C.H.; HOU, M.H. Allelopathic researches of subtropical vegetation in Taiwan I. Evaluation of allelopathic potential of bamboo *Phyllostachys edulis* vegetation. **Proceedings of the National Science Council, Republic of China**, v.5, n.3, p.284-292, 1981.

CLARK, L.G. Diversity and distribution of the Andean woody bamboos (Poaceae: Bambusoideae). In: CHURCHILL, S.P.; BALSLEV, H.; FORERO, E.; LUTEYN, J., eds. **Biodiversity and conservation of neotropical montane forests**. New York: New York Botanical Garden, 1995.p.501-512.

CLAYTON, W.D.; VORONTSOVA, M.S.; HARMAN, K.T.; AND WILLIAMSON, H. **Grassbase The online world grass flora.** (2006) Disponível em: <http://www.kew.org/data/grasses-db/www/imp00586.htm>. Acesso em: 20 maio 2015.

CENTRO NACIONAL DA CONSERVAÇÃO DA FLORA. Disponível em: <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Apoclada%20simplex>. Acesso em: 20 maio 2015.

CTFA. Technical guidelines. US Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association.Inc, New York 2001.

DAVIDSON, P.M. Parabens. In: DAVIDSON, P.M.; SOFOS, J.N.; BRANEN, A.L. **Antimicrobials in food**. 3.ed. Boca Raton: CRC Press, 2005. Cap.9, p.291-303.

DAVIDSON, P.M.; SOFOS, J.N.; BRANEN, A.L. **Antimicrobials in food**. 3.ed. Boca Raton: CRC Press, 2005.p.291-451.

DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, v.125, n.4, p.1430-1435, 2011.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v.12, n.1, p.214-219, 1980.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v.64, p.711-713, 1998.

EKLUND, T. Inhibition of growth and uptake processes in bacteria by some chemical food preservatives. **Journal of Applied Bacteriology**, v.48, p.423-432, 1980.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.ed. São Paulo: Siqueira, 1959. 446-451p.

FARRELLY, D. **The book of bamboo**: a comprehensive guide to this remarkable plant, its uses, and its history. London: Sierra Club Books, 1938. 321p.

FERRARI, M.; OLIVEIRA M.S.C.; NAKANO, A.K.; ROCHA-FILHO, P.A. Determinação do fator de proteção solar (FPS) *in vitro* e *in vivo* de emulsões com óleo de andiroba (*Carapaguianensis*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.626-630, 2007.

FILGUEIRAS, T. S. Apoclada in Lista de Espécies da Flora do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011/FB012986>. Acesso em: 3 de maio 2015.

FILGUEIRAS, T.S.; SANTOS-GONÇALVES, A.P. A checklist of the basal grasses and bamboos in Brazil (Poaceae); Bamboo Science & Culture. **Journal of the American Bamboo Society**, v.18, p.7-18, 2004.

FILGUEIRAS, T.S.; GONÇALVES, A.P.S. Bambus nativos no Brasil: oportunidades e desafios para seu conhecimento. In: SEMINÁRIO NACIONAL DO BAMBU, 1, Brasília, 2006. **Anais**. Brasília: CPAB, Universidade de Brasília, 2011.196p.

FILGUEIRAS, T.S.; LONGHI-WAGNER, H.M.; VIANA, P.L.; ZANIN, A.; OLIVEIRA, R.C.; CANTO-DOROW, T.S.; SHIRASUNA, R.T.; VALLS, J.F.M.; OLIVEIRA, R.P.; RODRIGUES, R.S.; SANTOS-GONÇALVES, A.P.; WELKER, C.A.D. Poaceae. In: REFLORA. **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB102232>. Acesso em: 07 jan. 2014.

FRANQUILINO, E. Em ritmo de expansão. **Cosmetics & Toiletries**, v.18, p.7-10, 2006.

FREESE, E.; SHEU, C.W.; GALLIERS, E. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. **Nature**, v.241, n.5388, p.321-325, 1973.

FRIES, A.T.; FRASSON, A.P.Z. Avaliação da atividade antioxidante de cosméticos anti-idade. **Revista Contexto & Saúde**, v.10, n.19, p.17-23, 2010.

FU, S.G.; YOON, Y.; BAZEMORE, R. Aroma-active components in fermented bamboo shoots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.549-554, 2002.

GROMBONE-GUARATINI, M.T.; CARDOSO-LOPES, E.M.; JENSEN, R.C.; CARDOSO-LOPES, E.M.; TORRES, L.M.B. Allelopathic potential of *Aulonemia aristulata* (Döll) MacClure, a native bamboo of Atlantic Rain Forest. **Allelopathy Journal**, v.24, n.1, p.183-190, 2009.

GROMBONE-GUARATINI, M.T.; GASPAR, M.; OLIVEIRA, V.F.; TORRES, M.A.M.G.; NASCIMENTO, A.; AIDAR, M.P.M. Atmospheric CO₂ enrichment markedly increases photosynthesis and growth in a woody tropical bamboo from the Brazilian Atlantic Forest. **New Zealand Journal of Botany**, v.51, n.4, p.275-285, 2013.

GUALA, G.F.A. Cladistic analysis and revision of the genus *Apoclada* (Poaceae: Bambusoideae: Bambuseae). **Systematic Botany**, v.20, n.3, p.207-223, 1995.

GUIMARÃES, M.J.; NOVACK, K.M.; BOTARO, V.R. Caracterização anatômica da fibra de bambu (*Bambusa vulgaris*) visando sua utilização em compósitos poliméricos. **Revista Ibero americana de Polímeros**, v.11, p.442-456, 2010.

HERMAN, A.; HERMAN, A.P.; DOMAGALSKA, B.W.; MLYNARCZYK, A. Essential oils and herbal extracts as antimicrobial agents in cosmetic emulsion. **Indian Journal Microbiological**, v.53(2): p.232-237, 2012.

HONG, E.J.; JUNGA, E.M.; LEEA, G.S.; KIMA, J.Y.; NAA, K.J.; PARK, M.J.; KANG, H.Y. Protective effects of the pyrolyzates derived from bamboo against neuronal damage and hematoaggregation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, p.594-599, 2010.

HU, C.; ZHANG, Y.; KITTS, D.D. Evaluation of antioxidant and prooxidant activities of bamboo *Phyllostachys nigra* var. *henonis* leaf extract *in vitro*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.3170-3176, 2000.

IKAWA, M.; SCHAPER, T.D.; DOLLARD, C.A.; SASNER, J.J. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.1811-1815, 2003.

JIAO, J .J., ZHANG, Y., LOU, D.D., WU, X.Q., ZHANG, Y. Antihyperlipidemic and antihypertensive effect of a triterpenoid-rich extract from bamboo shavings and vasodilator effect of friedelin on phenylephrine-induced vasoconstriction in thoracic aortas of rats. **Phytotherapy Research**, v.21, n.12, p.1135-1141, 2007.

JUDZIEWICZ, E.J.; CLARK, L.G.; LONDOÑO, X.; AND STERN, M.J. **American bamboos**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1999.

JUDZIEWICZ, E.J.; CLARK, L.G. Classification and biogeography of new world grasses: anomochlooideae, pharoideae, ehrhartoideae, and bambusoideae. **ALISO**, v.23, n.1, p.303-314, 2007.

KAMAROVA, N.I.; ROGACHEV, A.D.; CHEMYAK, E.I.; MOROZOV, S.V.; FOMENKO, V.; SALAKHUTDINOV, N.F. Quantative HPLC determination of main flavonoid content of *Rhododendron adamii* leaves and stems. **Chemistry of Natural Compounds**, v.45, n.1, p.27-31, 2009.

KABARA, J.J. Aroma preservatives, essential oils and fragrances as antimicrobial agents. In: KABARA, J.J., ed. **Cosmetic and drug preservation, principles and practices**. New York: Marcel Dekker, p.2301-2303, 1984.

KUROKAWA, T.; ITAGAKI, S.; YAMAJI, T.; NAKATA, C.; NODA, T.; HIRANO, T.; ISEKI, K. Antioxidant activity of a novel extract from bamboo Grass (AHSS) against ischemia-reperfusion injury in rat small intestine. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.29, p.2301-2303, 2006.

KUROSUMI, A.; SASAKI, C.; KUMADA, K.; KOBAYASHI, F.; MTUI, G.; NAKAMURA, Y. Novel extraction method of antioxidant compounds from *Sasa palmata* (Bean) Nakai using steam explosion. **Process Biochemistry**, v.42, p.1449-1453, 2007.

INDERJIT; DUKE, S.O. Ecophysiological aspects of allelopathy. **Plant**, v.217, p.529-539, 2003.

LARSON, R.; FARBER, B. **Estatística aplicada**. 4.ed. São Paulo: Pearson Education do Brasil, 2009.

LIESE, W. **Bamboos**: biology, silvics, properties, utilization. Estocolm: GTZ, 1985. 218p.

LONDOÑO, X. **Diversity and distribution of New World Bamboos, *Bambuseae***. New Delhy: International Network for Bamboo and Rattan, 1996.p.1-15. (INBAR Working Paper, n.8). Disponível em: http://www.inbar.int/sites/default/files/resources/inbar_working_paper_no08.pdf. Acesso em: 08 jul. 2014.

LONDOÑO, X. **Evaluation of bamboo resources in Latin America**: a summary of the final report of project n.96-8300-01-4. Cali: International Network for Bamboo and Rattan, 1999. Disponível em: http://www.inbar.int/sites/default/files/resources/inbar_working_paper_no35.pdf. Acesso em: 08 jul. 2014.

LONDOÑO X. **Evaluation of bamboo resources in Latin America**.Cali: Instituto Vallecaucano de Investigaciones Científicas, 2010.

LU, B.; LIU, L.; LU, B.; ZHEN, X.; WU, X.; ZHANG, Y. Anti-tumor activity of triterpenoid-rich extract from bamboo shavings (*Caulis bamfusae* in Taeniam).**African Journal of Biotechnology**, v.9, n.38, p.6430-6436, 2010.

LU, B.; WU, X.; SHI, J.; DONG, Y.; ZHANG, Y. Toxicology and safety of antioxidant of bamboo leaves. Part2: developmental toxicity test in rats with antioxidant of bamboo leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p.1739–1743, 2006.

LU, B.; WU, X.; TIE, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y. Toxicology and safety of anti-oxidant of bamboo leaves. Part 1: Acute and subchronic toxicity studies on anti-oxidant of bamboo leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, p.783-792, 2005.

MACWAN, C.; PATEL, H.V.; KALIA, K. A comparative evaluation of *in vitro* antioxidant properties of bamboo *Bambusa arundinacea* leaves extracts. **Journal of Cell and Tissue Research**, v.10, n.3, p.2413-2418, 2010.

MANGENA, T.; MUYIMA, N.Y. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteroniaincana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. **Letters in Applied Microbiology**, v.28, p.291–296, 1999.

MACCIONI, A.M.; ANCHISI, C.C.; SANNA, A.; SARDU, C.; DESSI, S. Preservative systems containing essential oils in cosmetic products. **International Journal of Cosmetic Science**, v.24, p.53-59, 2002.

MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. **Mensagem Doce**, v.46, n.3, p.234-239, 1998.

MARQUES, G.S.; LEÃO, W.F.; LYRA, M.A.M.; PEIXOTO, M.S.; MONTEIRO, R.P.M.; ROLIM, L.A.; XAVIER, H.S.; NETO, P.J.R.; SOARES, L.A.L. Comparative evaluation of UV/VIS and HPLC analytical methodologies applied for quantification of flavonoids from leaves of *Bauhinia forticata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.23, p.51-57, 2013.

MCCLURE, F. A. The Bamboos, Smithsonian Institution Press. 1993, 368p.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.D.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, n.2, p.27-130, 2001.

MEJÍA, A.I.; GALLARDO, C.; VALLEJO, J. Plantas del género *Bambusa*: Importancia y aplicaciones en la industria farmacêutica, cosmética y alimentaria. **Vitae**, v.16, n.3, p.396-405, 2009.

MONTGOMERY, D.C.; RUNGER, G.C. **Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros**. 2.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2003.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. 8.ed. Arizona State University. 2013, 730p.

MORENO, P.R.H.; SARTORI, M.C.; FUKUDA, G.R.; JOSÉ, C.M.; YOUNG, M.C.M.; FILGUEIRAS, T.S.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R.; VELASCO, V.R.; SILVA, V.R.L.; GROMBONE-GUARATINI, M.T. Evaluation of the antioxidant and antimicrobial properties of native Brazilian bamboo species for future uses in cosmetics. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL FEDERATION OF SOCIETIES OF COSMETIC CHEMISTS, 21, Bangkok, 2011. **Proceeding**. Bangkok: IFSCC, 2011. p. 430-435.

MORENO, P.H.R.; COSTA-ISSA, F.I.; RAJCA-FERREIRA, A.K.; PEREIRA, M.A.A.; KANEKO, T.M. Native Brazilian plants against nosocomial infections: a critical review on their potential and the antimicrobial methodology. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.13, p.3040-3078, 2013.

NAGAI, T.; SUZUKI, N.; TANOUE, Y.; KAI, N.; NAGASHIMA, T. Antioxidant activities of the extracts from bamboo powder as underutilized resource. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.7, n.2, p.228-232, 2009.

NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4.ed. Porto Alegre:Bookman, p.315-361, 2010.

NISHINA, A.; UCHIBORI, T. Antimicrobial Activity of 2,6-Di-methoxy-p-benzoquinone, Isolated from Thick-stemmed bamboo, and its analogs. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.55, n.9, p.2395-2398, 1991.

NISHIMURA, T. Apparatus for carbonization production of bamboo charcoal and bamboo pyrolytic vinegar liquid. **Fuel and Energy Abstract**, v.44, n.5, p.305, 2003.

OLIVEIRA, L.F.A. **Conhecendo bambus e suas potencialidades para uso na construção civil**. Minas Gerais, 2013. 82p. Monografia de Especialização – Pós-graduação em Construção Civil– Universidade Federal de Minas Gerais.

PARK, E.J.; JHON, D.Y. The antioxidant, angiotensin converting enzyme inhibition activity, and phenolic compounds of bamboo shoot extracts. **Food Science and Technology**, v.43, p.655-659, 2010.

PHARMACOPÉE Française. 10.ed. Paris: Adrapharm, 1980. 1898p.

PEREIRA, M.A.R. **Bambu: espécies, características e aplicações**. Bauru: UNESP, 1999.

PEREIRA, M.A.R. **Bambu: espécies, características e aplicações**. Bauru, São Paulo: UNESP, 2001. 58p. [Apostila].

PEREIRA, M. A. R.; BERALDO, A. L. **Bambu de corpo e alma**. 1. Ed. Bauru. SP: Canal 6, 2007. 240p.

PRESZNHUK, R.A.O. **Estudo da viabilidade do filtro de carvão de bambu como pós tratamento em estação de tratamento de esgoto por zona de raízes: tecnologia ambiental e socialmente adequada**. Paraná, 2004. 110p. Dissertação de Mestrado - Pós-Graduação em Tecnologia - Centro Federal de Educação e Tecnologia do Paraná.

POZZI, A.C.S. **Desenvolvimento de métodos de análise espectrofométrica de flavonoides do “maracujá” (*Passiflora alata* e *Passiflora edulis*)**. São Carlos, 2007. 73p. Dissertação de Mestrado - Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo.

QUITAIN, A.T.; KATOH, S.; MORIYOSHI, T. Isolation of antimicrobials and antioxidants from moso-bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) by supercritical CO₂ extraction and subsequent hydrothermal treatment of the residues. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.43, p.1056-1060, 2004.

RAJEBHOSALE, V.A.; BURTE, R.G.; TORO, V.A. Nutritive value of bamboo (*Dendrocalamus calostachyus*) leaves for crossbred calves. **Indian Journal of Animal Nutrition**, v.15, p.58-60, 1998.

RIAÑO, R.M.; LONDOÑO, X.; LÓPEZ Y.; GÓMEZ, J.H. Plant growth and biomass distribution on *Guadua angustifolia* Kunth in relation to ageing in Valle del Cauca. **Colombia Bamboo Science and Culture**, v. 16, n.1, p.43-51, 2002.

RICE, E.L. **Allelopathy**. New York: Academic Press, 1974.353p.

SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluated the free scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science Technology**, v.8, p.121-137, 2002.

SÃO PAULO (Estado). Secretária de Estado do Meio Ambiente. Resolução SMA n.48, de 21 de setembro de 2004. Lista oficial das espécies da flora do Estado de

São Paulo ameaçadas de extinção. Disponível em: http://www.ambiente.sp.gov.br/wp-content/uploads/resolucao/2004/2004_Res_SMA48.pdf. Acesso em: 10 maio 2015.

SEMMLER, C. T. **Estudos de pré-formulação e desenvolvimento de preparações cosméticas**. Araraquara, 2011. 150p. Monografia de conclusão de curso – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista.

SEO, S.B.; RYU, C.S.; AHN, G.W.; KIM, H.B.; JO, B.K.; KIM, S.H.; LEE, J.D.; KAJIUCHI, T. Development of natural preservative system using the mixture of chitosan-*Inula helenium* L. extract. **International Journal of Cosmetic Science**, v.24, p.195-206, 2002.

SHIBATA, M.; YAMATAKE, M.; SAKAMOTO, M.; KANAMORI, K.; TAKAGI, K. Pharmacological studies on bamboo grass: acute toxicity and anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of water-soluble fraction (Folin) extracted from *Sasa albomarginata* Makino et Shibata. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, v.71, p.481-485, 1975.

SODERSTROM, T.R.; JUDZIEWICZ, E.J.; CLARK, L.G. Distribution patterns of neotropical bamboos. In: WORKSHOP ON NEOTROPICAL DISTRIBUTION PATTERNS. **Proceedings**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, p.121-157, 1988.

SODERSTROM, T.R.; CALDERÓN, C.E. A commentary on the Bamboo (Poaceae: Bambusoideae). **Biotropica**, v.11, n.3, p.161-172, 1979.

SODERSTROM, T.R.; CALDERÓN, C.E. Primitive forest grass and evolution of the Bambusoideae. **Biotropica**, v.6, n.3, p.141-153, 1974.

SUNGKAEW, S.; STAPLETON, C.M.A.; SALAMIN, N.; HODKINSON, T.R. Non-monophyly of the woody bamboos (Bambuseae; Poaceae): a multi-gene region phylogenetic analysis of Bambusoideae. **Journal of Plant Research**, v.122, p.95-108, 2009.

TAKAHASHI, T.; MIZUI, K.; MIYAZAWA, M. Volatile compounds with characteristic odour in moso-bamboo stems (*Phyllostachys pubescens* Mazel ex Houz. De ehaie) **Phytochemical analysis**, v.21, p.489-495, 2010.

TORTORA, G.L.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. p.837.

TRIPLETT, J.K.; CLARK, L.G. Phylogeny of the temperate woody bamboos (Poaceae: Bambusoideae) with an emphasis on *Arundinaria* and allies. **Systematic Botany**, v.35, 102-120, 2010.

TRIPLETT, J.K.; WEAKLEY, A.; CLARK, L.G. Hill cane (*Arundinaria appalachiana*), a new species of bamboo (Poaceae: Bambusoideae) from the Southern Appalachian Mountains. **SIDA Contributions to Botany**, v.22, n.1, p.79-95, 2006.

TRIPLETT, J.K.; OLTROGGE, K.A.; CLARK, L.G. Phylogenetic relationships and natural hybridization among the North American woody bamboos (Poaceae: Bambusoideae) from the Southern Appalachian Mountains. **American Journal of Botany**, v.97, p.471-492, 2006.

TRIPLETT, J.K.; CLARK, L.G. Phylogeny of the temperate woody bamboos (Poaceae: Bambusoideae) with an emphasis on *Arundinaria* and allies. **Systematic Botany**, v.35, 102-120, 2010.

VIGIL, A.L.M; PALOU, E. ALZAMORA, S.M. Naturally occurring compounds – Plants sources. In: DAVIDSON, P.M.; SOFOS, J.N.; BRANEN, A.L. **Antimicrobials in food**. 3.ed. Boca Raton: CRC Press, 2005. Cap.9, p.429-451.

WANG, J.; TANG, F.; YUE, Y.; GUO, X.; YAO, X. Development and validation of an HPTLC method for simultaneous quantitation of isoorientina, isovitexina, orientin, and vitexina in bamboo-leaf flavonoids. **Journal of AOAC International**, v.93, n.5, p.1376-1383, 2010.

WANG, H.; YUE, Y.; GUO, X.F.; TANG, F.; WANG, J.; YAO, X.; SUN, J. Preparation and comparative analysis of antioxidant activity of bamboo leaf extracts from different varieties. **Anhui NongyeDaxueXuebao**, v.39, n.4, p.540-544, 2012.

YANG, Z. Food storage in pre-Qin days. **Agricultural Archaeology**, v.3, p.2-8, 1997.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna: métodos de estudo: fitoterápicos e fitofármacos: biotecnologia: patente, p.98-102, 2001.

ZHANG, Y. Natural functional extract of bamboo leaves-bamboo leaf anthoxanthin. **China Food Additives**, v.3, p.54-58, 1995.

ZHANG, Y. Natural functional extract of bamboo leaves-bamboo leaf anthoxanthin. **China Food Additives**, v.3, p.54-58, 2002.

ZHANG, W.; CLARK, G. Phylogeny and classification of the Bambusoideae (Poaceae). **Grasses: systematics and evolution**, p.35-42, 2000.

ZHANG, Y.; BAO, B.; LU, B.; REN, Y.; TIE, X.; ZHANG, Y. Determination of flavone C glucosides in antioxidant of bamboo leaves (AOB) fortified foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet diode array detection. **Journal of Chromatography A**, v.1065, n.5, p.177-185, 2005.

ZHANG, Y.; TIE, X.; BAO, B.; WU, X.; ZHANG, Y. Metabolism of flavone C-glucosides and *p*-coumaric acid from antioxidant of bamboo leaves (AOB) in rats. **British Journal of Nutrition**, v.97, n.3, p.484-494, 2007.

ZHANG, Y.; WU, X.; REN, Y.; FU, J.; ZHANG, Y. Safety evaluation of a triterpenoid-rich extract from bamboo shavings. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.1867-1875, 2004.

ZHANG, Y.; YAO, X.; BAO, B.; ZHANG, Y. Anti-fatigue activity of a triterpenoid-rich extract from Chinese bamboo shavings (*Caulis bambusae* in taeniam). **Phytotherapy Research**, v.20, p.872-876, 2006.

ZHANG, J.; GONG, J.; DING, Y.; LU, B.; WU, X.; ZHANG, Y. Antibacterial activity of water-phase extracts from bamboo shavings against food spoilage microorganisms. **African Journal of Biotechnology**, v.9, n.45, p.7710-7717, 2010.