UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Composição química e atividades biológicas de extratos de
***Guadua angustifolia* Kunth**

Danielle Cristina Silva de Oliveira

São Paulo
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Composição química e atividades biológicas de extratos de
***Guadua angustifolia* Kunth**

Danielle Cristina Silva de Oliveira

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 6018/2011

Tese para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

O48c	<p>Oliveira, Danielle Cristina Silva de Composição química e atividades biológicas de extratos de <i>Guadua angustifolia</i> Kunth / Danielle Cristina Silva de Oliveira. - São Paulo, 2019. 98 p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia. Orientador: Moreno, Paulo Roberto Hrihorowitsch</p> <p>1. bambu. 2. atividade antioxidante. 3. atividade antimicrobiana. 4. atividade inibidora da tirosinase. 5. composição química. I. T. II. Moreno, Paulo Roberto Hrihorowitsch, orientador.</p>
------	---

Danielle Cristina Silva De Oliveira

Composição Química e Atividades Biológicas de Extratos de
Guadua Angustifolia Kunth

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno
Orientador/Presidente

Prof.^a Dra. Patrícia Santos Lopes
1º examinador

Prof.^a Dra. Ivana Barbosa Suffredini
2º examinador

Prof. Dr. Marcelo José Pena Ferreira
3º examinador

São Paulo, 06 de março de 2020

DEDICATÓRIA

Ao Nikola Canela.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Paulo R. H. Moreno, pelo acolhimento, conhecimento transmitido, paciência e compreensão durante a realização deste trabalho.

À Professora Dra. Maria Tereza Grombone-Guaratini do Instituto de Botânica, pela parceria e auxílio na parte da coleta do material vegetal.

Aos caros Professores Dr. Marcelo José Pena Ferreira, Dra. Telma M. Kaneko, Dra. Maria Cláudia Marx Young, Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros, Dra. Elfriede Marianne Bacchi, pelos ensinamentos e ajuda na realização dos testes.

Aos meus pais Osmar e Eliana, ao meu irmão Marcelo, à minha avó Miriam, à toda minha família, pelo amor, apoio e compreensão nos momentos de ausência.

Ao Walter pela presença, paciência e amor.

Aos queridos: Kasia, Kamilla, Fabiana, Paulo, Marcos, Felipe, Agnieszka, Tomas, Rafael, Paola, Cynthia, Fabiola, Ki, Isabella, Carlos, João, Márcia, Ingrid, Joyce e outros companheiros não mencionados aqui, pelas amizades.

Aos técnicos Roberto e Edgar, pela ajuda.

À dona Rosa, pelo carinho e atenção.

Ao David, pelas orientações.

À todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelo suporte técnico-científico e desenvolvimento humano, e à CAPES, pelo financiamento deste projeto.

RESUMO

OLIVEIRA, D. C. S. **Composição química e atividades biológicas de extratos de *Guadua angustifolia* Kunth.** 2019. 98 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A maioria dos estudos com o gênero *Guadua* descreve suas características físicas e estão concentrados nas áreas de construção civil e engenharia de materiais. Neste contexto, objetivo do presente trabalho foi a caracterização dos compostos majoritários e avaliação das atividades biológicas de extratos e frações de *Guadua angustifolia* Kunth. coletada em Tatuí, Estado de São Paulo. A análise da composição do óleo essencial das folhas revelou que este é composto em sua maior parte por terpenos e apresenta hexa-hidrofarnesil acetona e Z-fitol como compostos majoritários. Os compostos fenólicos ácido *p*-cumárico e quercetina-3-*O*-galactosideo foram identificados nas frações das folhas e colmos, além de 36 outros compostos como α -tocoferol, esqualeno, fitol e neofitadieno. Os compostos fenólicos foram quantificados com teores semelhantes para os extratos brutos de folhas e colmos ($35,9 \pm 1,23$ e $31,0 \pm 1,24$ μg de EAG/mg, respectivamente). Dentre as frações, a clorofórmica dos colmos foi a que apresentou o maior teor ($57,46 \pm 5,67$ μg de EAG/mg). Com relação aos flavonoides, o extrato bruto das folhas apresentou teor mais elevado que os colmos ($1,57 \pm 0,03$ e $0,37 \pm 0,2$ μg de EQ/mg, respectivamente), e a fração acetato de etila das folhas foi a que apresentou maior teor desses compostos ($1,27 \pm 0,19$ μg de EQ/mg). O óleo essencial, os extratos brutos e as frações não apresentaram atividade antimicrobiana importante, com valores de MIC > 500 $\mu\text{g/mL}$ para *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404). Os extratos brutos e frações não apresentam atividade intensa no ensaio da inibição da enzima tirosinase, com valores de CE₅₀ acima de 1 mg/mL. Na avaliação da atividade antioxidante, os extratos brutos apresentaram atividade moderada, com valores CE₅₀= $360,6 \pm 5,8$ $\mu\text{g/mL}$ para o extrato bruto das folhas e CE₅₀= $472,2 \pm 15,4$ $\mu\text{g/mL}$ para os colmos. A fração acetato de etila dos colmos apresentou a atividade mais intensa, CE₅₀= $135,5 \pm 4,7$ $\mu\text{g/mL}$. Informações a respeito do potencial farmacológico e composição química do gênero *Guadua* ainda são escassas. O presente trabalho contribuiu para fornecer uma análise química mais detalhada da espécie, o que pode servir de direcionamento para estudos futuros. Além disso, verificou-se que os extratos de *G. angustifolia* possuem potencial antioxidante moderado, tornando-os potenciais agentes adjuvantes do sistema conservante de produtos alimentícios e/ou cosméticos.

Palavras chave: Poaceae, *Guadua angustifolia*, bambu, antimicrobiana, antioxidante, atividade inibidora da tirosinase.

ABSTRACT

OLIVEIRA, D. C. S. **Chemical composition and biological activities of extracts of *Guadua angustifolia* Kunth.** 2019. 98 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Most studies on the *Guadua* genus describe their physical characteristics and are concentrated in the areas of construction and materials engineering. In this context, the objective of the present work was the characterization of the major compounds and evaluation of the biological activities of extracts and fractions of *Guadua angustifolia* Kunth. collected in Tatuí, São Paulo state. Analysis of the composition of the essential oil of the leaves revealed that it is composed mostly of terpenes and hexahydro-farnesyl acetone and Z-phytol are the major compounds. Phenolic compounds *p*-coumaric acid and quercetin-3-*O*-galactoside were identified in leaf and stem fractions, as well as 36 other compounds such as α -tocopherol, squalene, phytol and neofitadiene. Phenolic compounds were quantified and crude leaf and stem extracts had similar contents (35.9 ± 1.23 and 31.0 ± 1.24 $\mu\text{g EAG} / \text{mg}$, respectively) and the chloroform fraction of the stems presented the highest content ($57.46 \pm 5.67 \mu\text{g EAG} / \text{mg}$). The crude leaf extract presented higher content of flavonoids than the stems (1.57 ± 0.03 and 0.37 ± 0.2 $\mu\text{g of EQ} / \text{mg}$, respectively), and the ethyl acetate fraction of the leaves had the highest flavonoid content (1.27 ± 0.19 $\mu\text{g EQ} / \text{mg}$). Essential oil, crude extracts and fractions did not show significant antimicrobial activity, with MIC values > 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) and *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Candida albicans* (ATCC 10231) and *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404). Crude extracts and fractions do not show intense activity in the tyrosinase inhibition assay, with EC_{50} values above $1 \text{ mg} / \text{mL}$. In the antioxidant activity evaluation, the crude extracts presented moderate activity, with EC_{50} values = 360.6 ± 5.8 $\mu\text{g} / \text{mL}$ for the raw leaf extract and $\text{EC}_{50} = 472.2 \pm 15.4$ $\mu\text{g} / \text{mL}$ for the stems. The ethyl acetate fraction of the stems showed the most intense activity, $\text{EC}_{50} = 135.5 \pm 4.7$ $\mu\text{g} / \text{mL}$. Information about the pharmacological potential and chemical composition of the genus *Guadua* is still scarce. The present work contributed to provide a more detailed chemical analysis of the species, which may serve as a guide for future studies. In addition, *G. angustifolia* extracts have been found to have moderate antioxidant potential, making them potential adjuvant agents in the preservative system of food and / or cosmetics.

Keywords: Poaceae, *Guadua angustifolia*, bamboo, antimicrobial, antioxidant, tyrosinase inhibitory activity.

Lista de equações

Equação 1 - Rendimento do óleo essencial.	33
Equação 2 - Rendimento dos extratos brutos	33
Equação 3 - Índice de retenção linear (IR)	37
Equação 4 - Inibição do radical livre DPPH	39
Equação 5 - Crescimento microbiano.....	41
Equação 6 - Inibição do crescimento microbiano	41
Equação 7 - Atividade inibidora da tirosinase.....	43

Lista de figuras

Figura 1. Ilustração com identificação das partes de um bambu lenhoso.	17
Figura 2. Estrutura química da 2,6-dimetóxi- <i>p</i> -benzoquinona, composto isolado de <i>Phyllostachys heterocycla</i> var. <i>pubescens</i> (Pradelle) Ohwi.	18
Figura 3. Estruturas químicas de iso-orientina (a), iso-orientina 2-O- α -L-ramnosídeo (b), e apigenina 6-C- β -D-xilopiranosil-8-C- β -D-glucopiranosídeo (c), compostos isolados de <i>Sasa borealis</i> (Hack.) Makino & Shibata.	19
Figura 4. Estruturas químicas do ácido 3-O-(3'-metil-cafeoil)-quínico (a), ácido 5-O-cafeoil-4-metilquínico (b), ácido 3-O-cafeoil-1-metilquínico (c), compostos isolados de <i>Phyllostachys edulis</i> (Carrière) J. Houz.	20
Figura 5. Biossíntese da melanina.	21
Figura 6. Estruturas químicas dos compostos presentes em <i>Phyllostachys nigra</i> (Lodd.) Munro var. <i>henonis</i> (Mittf) Stapf ex Rendle, catequina (a), ácido clorogênico (b), ácido cafeico (c), ácido <i>p</i> -cumárico (d) e no seu produto obtido da condensação do vapor gerado pela pirólise, chamado “ <i>Bambusae caulis in Liquamen</i> ” (BCL), pirocatecol (e) e hidroquinona (f).	21
Figura 7. Estruturas químicas de lup-20(29)-en-3-ona (a), friedelan-3-ona (b), lup-20(29)en-3-ol (c), α -amirina (d), olean-12-eno (e), isolados do extrato de <i>Bambusa tuldoidea</i> Munro.	23
Figura 8. Estruturas químicas de guaicol (a) e siringol (b), substâncias isoladas dos pirolisados de <i>Phyllostachys pubescens</i> e <i>Phyllostachys nigra</i> , respectivamente.	24
Figura 9. Colmos de <i>Guadua angustifolia</i> Kunth com destaque para faixa de tricomas nos nós.	25
Figura 10. Colmos, galhos e folhas de <i>Guadua angustifolia</i> Kunth.	26
Figura 11. Estrutura química de <i>p</i> -guaiacol, composto isolado do vinagre de <i>Guadua angustifolia</i> Kunth.	28
Figura 12. Colmos e folhas de <i>Guadua angustifolia</i> Kunth coletados em Tatuí (SP, Brasil).	32
Figura 13. Aspecto visual do pó obtido a partir da moagem dos colmos (A) e folhas (B). ...	33
Figura 14. Mudança de cor do reagente Folin-Ciocalteu na presença de compostos fenólicos. Amostra (A) e branco da amostra (B).	35
Figura 15. Coloração observada na presença de flavonoides na amostra. Amostra (A) e branco da amostra (B).	36
Figura 16. Coloração do reagente DPPH. Reagente oxidado (A) e reagente reduzido (B). ...	39
Figura 17. Mudança de coloração ocorrida no ensaio da atividade inibidora da tirosinase. A linha superior corresponde à amostra e contém a enzima e o substrato. A linha inferior corresponde ao branco da amostra e contém somente o substrato.	43
Figura 18. Estrutura dos compostos majoritários identificados no óleo essencial de <i>Guadua angustifolia</i> , Z-fitol (a) e hexa-hidro-farnesil acetona (b)	46
Figura 19. Curva de calibração do ácido gálico utilizada para os cálculos dos compostos fenólicos totais dos extratos brutos e frações.	49
Figura 20. Curva de calibração da quercetina utilizada para os cálculos do conteúdo de flavonoides dos extratos brutos e frações.	50
Figura 21. Placa cromatográfica após aspersão do reagente NP/PEG em luz ultravioleta 365 nm.	52
Figura 22. Cromatogramas obtidos para as frações clorofórmicas das folhas (A) e colmos (B) de <i>G. angustifolia</i> através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em 280 nm.	54
Figura 23. Cromatogramas obtidos para as frações acetato de etila das folhas (A) e colmos (B) de <i>Guadua angustifolia</i> através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em 280 nm.	54

Figura 24. Cromatogramas obtidos para as frações butanólicas das folhas (A) e colmos (B) de <i>Guadua angustifolia</i> através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em 280 nm.	55
Figura 25. Espectro de absorção no UV do ácido <i>p</i> -cumárico (Padrão).	56
Figura 26. Espectros de absorção no UV para os picos identificados como ácido <i>p</i> -cumárico nas frações de <i>Guadua angustifolia</i>	56
Figura 27. Espectros de absorção no UV da quercetina-3- <i>O</i> -galactosídeo (Padrão) e para o pico identificado como essa substância na fração butanólica das folhas de <i>Guadua angustifolia</i>	57
Figura 28. Estrutura molecular do heterosídeo quercetina-3- <i>O</i> -galactosídeo (Hiperosídeo)..	57
Figura 29. Cromatograma obtido para a fração hexânica das folhas de <i>Guadua angustifolia</i> por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM).	59
Figura 30. Cromatograma obtido para a fração hexânica dos colmos de <i>Guadua angustifolia</i> por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM).	60
Figura 31. Cromatograma obtido para a fração clorofórmica das folhas de <i>Guadua angustifolia</i> por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM).	61
Figura 32. Cromatograma obtido para a fração clorofórmica dos colmos de <i>Guadua angustifolia</i> por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM).	62
Figura 33. Compostos identificados nas frações de <i>Guadua angustifolia</i> através Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM). Nonacosano (a), esqualeno (b), neofitadieno (c)	63
Figura 34. Cromatograma obtido para a fração acetato de etila das folhas de <i>Guadua angustifolia</i> através Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM).	63
Figura 35. Cromatograma obtido para a fração acetato de etila dos colmos de <i>Guadua angustifolia</i> através Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM).	64
Figura 36. Compostos identificados nas frações de <i>Guadua angustifolia</i> através Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM). (<i>E</i>)-álcool coniferílico (a), α -tocoferol (b), <i>E</i> -5-icoseno (C).....	65
Figura 37. Turbidez que as amostras (óleo essencial, extratos brutos e frações) apresentaram no ensaio antimicrobiano frente à <i>Aspergillus brasiliensis</i> , indicando que as amostras não foram capazes de inibir o crescimento do micro-organismo.	72

Lista De Tabelas

Tabela 1. Composição química do óleo essencial das folhas de <i>Guadua angustifolia</i>	46
Tabela 2. Rendimento dos extratos brutos das folhas e colmos de <i>Guadua angustifolia</i>	47
Tabela 3. Rendimento das frações obtidas através dos extratos brutos das folhas e colmos de <i>Guadua angustifolia</i>	48
Tabela 4. Teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos brutos e frações de <i>Guadua angustifolia</i>	49
Tabela 5. Teor de flavonoides presentes nos extratos brutos e frações de <i>Guadua angustifolia</i>	51
Tabela 6. Tempos de retenção dos compostos e das substâncias de referência identificados por cromatografia líquida de alta eficiência.	55
Tabela 7. Composição química das frações das folhas e colmos de <i>Guadua angustifolia</i> por GC-EM.	66
Tabela 8. Capacidade antioxidante dos extratos brutos e frações de <i>Guadua angustifolia</i> pelo método da captura do radical livre DPPH.	68
Tabela 9. Porcentagem de inibição da enzima tirosinase pelos extratos brutos e frações de <i>Guadua angustifolia</i> na concentração de 1 mg/mL.	70
Tabela 10. Porcentagem de inibição do crescimento microbiano do óleo essencial, extratos brutos e frações de <i>Guadua angustifolia</i>	72

Lista De Quadros

Quadro 1. Condições de análise do óleo essencial e frações de <i>Guadua angustifolia</i> Kunth por CG-EM.	37
---	----

Sumário

INTRODUÇÃO.....	14
1. Introdução.....	15
1.1.1 Bambus: aspectos botânicos	16
1.1.2 Bambus: propriedades biológicas	18
1.2 <i>Guadua</i> Kunth	24
1.2.1 <i>Guadua angustifolia</i> Kunth	25
OBJETIVOS	29
2. Objetivos.....	30
2.1 Objetivos específicos.....	30
METODOLOGIA.....	31
3. Metodologia.....	32
3.1 Material vegetal	32
3.2 Análises químicas	32
3.2.1 Extração do óleo essencial.....	32
3.2.2 Obtenção dos extratos brutos.....	33
3.2.3 Fracionamento dos extratos brutos	34
3.2.4 Determinação de compostos fenólicos totais	34
3.2.5 Determinação de flavonoides	35
3.2.6 Análise dos extratos brutos e frações por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)..	36
3.2.7 Análise do óleo essencial e frações por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)	36
3.2.8 Análise das frações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	37
3.3 Análises biológicas	38
3.3.1 Determinação do potencial antioxidante	38
3.3.2 Atividade antimicrobiana por microdiluição	40
3.3.3 Atividade inibidora da tirosinase	42
3.4 Análises estatísticas	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4. Resultados e discussão	45
4.1 Análises químicas	45
4.1.1 Rendimento e composição química do óleo essencial.....	45
4.1.2 Rendimento dos extratos brutos e frações	47
4.1.3 Teor de compostos fenólicos totais	48
4.1.4 Teor de flavonoides	50
4.1.5 Análise dos extratos brutos e frações por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)..	52
4.1.6 Identificação de compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	53
4.1.7 Análise das frações por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM).....	58
4.2 Análises biológicas	68
4.2.1 Determinação do potencial antioxidante	68
4.2.2 Atividade inibidora da tirosinase	70
4.2.3 Atividade antimicrobiana	71
CONCLUSÕES	75

5 Conclusões.....	76
REFERÊNCIAS	77
6. Referências	78
ANEXOS	88
ANEXO A – Currículo Lattes	89
ANEXO B – Ficha do Aluno.....	91
ANEXO C – Publicações	94

INTRODUÇÃO

1. Introdução

O uso de plantas medicinais vem acompanhando a história dos seres humanos desde o período Paleolítico Médio, há 60.000 anos (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001). A utilização de plantas com finalidade curativa pode ser verificada nos antigos sistemas de medicina asiáticos, Ayurveda e Medicina Tradicional Chinesa, permanecendo até os dias atuais. Entre a grande variedade de plantas utilizadas na Medicina Chinesa, encontramos os bambus, que são aplicados no tratamento de diversas enfermidades, como febres, hipertensão, doenças cardiovasculares e em processos de desintoxicação (LU et al., 2005; PATWARDHAN et al., 2005; VAIRAPPAN et al., 2015; WRÓBLEWSKA et al., 2018). Os bambus vêm sendo utilizados na Ásia por mais de 5.000 anos, indicando que as populações dessa região sempre procuraram aplicações para essas plantas, sendo estimados mais de 4.000 usos (SODERSTROM, 1985; HSIUNG, 1991).

Os bambus são plantas versáteis que encontram utilidade em diversas áreas, desde construção civil, artesanato, agricultura, alimentação e até mesmo na indústria de papel, na Índia, por exemplo, os bambus são importante fonte de matéria prima para essa indústria (HSIUNG, 1991). Na Ásia, tornou-se popular o emprego dos colmos para embalar alimentos, pois se acreditava que os alimentos embalados com esse material eram preservados. Estudos científicos atuais demonstraram que os colmos possuem substâncias antimicrobianas, o que pode estar relacionado com essa capacidade de conservação (TAKAHASHI; MIZUI; MIYAZAWA, 2010).

Diversos estudos já foram publicados a respeito das propriedades biológicas dos bambus, evidenciando atividade antioxidante (HU; ZHANG; KITTS, 2000), atividade antimicrobiana (FUJIMURA et al, 2005), atividade neuroprotetora (AKAO et al., 2004), capacidade de inibição da enzima tirosinase (ILHAM et al, 2008). Além disso, a composição química de algumas espécies já foi avaliada, indicando a presença de compostos como polifenóis, flavonoides (AFIFI; SHERVINGTON; DARWISH, 1997; ZHANG et al., 2005), antocianinas (FOSSEN et al., 2001), polissacarídeos (DING et al., 1998). O conhecimento da composição química pode influenciar na aplicação prática de uma espécie, como exemplo, um estudo sugeriu o uso das espécies *Dendrocalamus asper* (Schult f.) Backer ex Heyne e *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J.C.Wendl. no setor alimentício por serem boas fontes de amido e fibras (FELISBERTO et al., 2017).

A Ásia é o maior polo de concentração de espécies, junto com a Oceania, somando mais de 1.000 espécies (BYSTRIAKOVA; KAPOS; LYSENKO, 2003). Dentro do continente

americano, o Brasil é o país que possui o maior número de espécies em seu território, contando com 50 gêneros e 254 espécies (BYSTRIAKOVA; KAPOK; LYSENKO, 2004; PARMA et al., 2016).

Dentre as espécies nativas do continente americano, temos os bambus gigantes, pertencentes ao gênero *Guadua* Kunth, que competem em tamanho e utilidade com as espécies gigantes asiáticas (JUDZIEWICZ; CLARK, 1991). Contudo, os estudos a respeito dessas espécies são direcionados majoritariamente para suas propriedades físicas e mecânicas, com aplicação na engenharia civil e de materiais. Considerando o alto potencial de uso para *Guadua spp.*, os estudos sobre atividades biológicas e composição química dessas espécies podem ser usados como base para a geração de novas aplicações para essas plantas.

1.1.1 Bambus: aspectos botânicos

A família das gramíneas (Poaceae) é responsável por 31-43% da cobertura vegetal do planeta Terra. Esta família está dividida em 12 subfamílias e compreende espécies como arroz, aveia, trigo e os bambus. Os bambus são as maiores gramíneas do mundo e estão inseridos na subfamília Bambusoideae (LONDOÑO, 1992; GIBSON, 2009). O grupo representa a maior variedade de espécies entre as gramíneas, possuindo uma extensa diversidade de formas e tamanhos. Além disso, são consideradas as espécies mais basais dessa família, pois apresentam estruturas que não são mais encontradas em espécies mais derivadas (SODERSTROM; CALDERON, 1979).

Bambusoideae encontra-se ainda dividida em três tribos: Arundinarieae (bambus lenhosos de clima temperado), Bambuseae (bambus lenhosos de clima tropical) e Olyreae (bambus herbáceos), as quais somam 1.680 espécies distribuídas em 127 gêneros, sendo ainda novas espécies identificadas e descritas (CLARK; OLIVEIRA, 2018).

Várias características diferenciam bambus lenhosos dos bambus herbáceos, mas de maneira simplificada, podem ser citados os colmos, que são ricos em lignina e rígidos nos bambus lenhosos, enquanto bambus herbáceos são bem menos lignificados e podem ser quebrados com as mãos (HAUBTICH, 1981; CLARK; LONDOÑO; RUIZ-SANCHEZ, 2015).

Bambus possuem uma grande variedade morfológica, com colmos de poucos centímetros em bambus herbáceos a colmos com até 25 metros de altura e 20 centímetros de diâmetro em bambus lenhosos gigantes (HSIUNG, 1991). O colmo é o eixo aéreo que emerge do solo, partindo do rizoma, é subdividido em nós e entrenós. O rizoma é o eixo subterrâneo

que dá sustentação a planta. Estas estruturas podem ser visualizadas na Figura 1, que exemplifica a morfologia de um bambu lenhoso. Além das estruturas acima citadas, os bambus ainda possuem outras estruturas como as folhas caulinares, inflorescências, frutos e flores. Embora as flores sejam a unidade básica utilizada para descrição e classificação taxonômica, nos bambus, todas suas estruturas são utilizadas, pois, seu o ciclo de floração é longo, com intervalos que podem variar de 10 a 120 anos (LONDOÑO, 1992).

Figura 1. Ilustração com identificação das partes de um bambu lenhoso.

Fonte: adaptada de Song et al. (2016).

Os bambus encontram-se distribuídos das regiões tropicais até as regiões temperadas, do nível do mar até 4.000 metros de altitude. Fatores como temperatura e umidade influenciam sua distribuição no mundo e as condições encontradas no sudeste da Ásia, América Central e regiões costeiras, como calor e chuva, favorecem seu crescimento. Ao que tudo indica, bambus não crescem em regiões cujo clima apresenta temperaturas médias abaixo de 10°C e precipitação anual menor que 800 mm (HSIUNG, 1991).

1.1.2 Bambus: propriedades biológicas

O reino vegetal é uma fonte muito rica de novas moléculas, as quais podem ser utilizadas para fins medicinais. Somente uma pequena parcela desse reino foi explorada, por isso a pesquisa por produtos naturais biologicamente ativos é promissora (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001). Na literatura, podemos encontrar diversos estudos a respeito das atividades biológicas para espécies da subfamília Bambusoideae.

A atividade antimicrobiana de espécies de bambu foi avaliada frente a diversos micro-organismos, apresentando valores de concentração inibitória mínima (CIM) de 10 a 50.000 µg/mL. Os extratos clorofórmicos dos colmos de *Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens* (Pradelle) Ohwi apresentaram os maiores valores de CIM, com 50.000 µg/mL para *Pseudomonas aeruginosa*, 10.000 µg/mL para *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* e 2.000 µg/mL para *Staphylococcus aureus* (VALENTINO et al., 2015). Um composto isolado dessa espécie, 2,6-dimetóxi-*p*-benzoquinona (figura 2), foi avaliado frente aos mesmos micro-organismos e apresentou valores de CIM inferiores ao extrato, 800 µg/mL para *P. aeruginosa*, 400 µg/mL para *E. coli* e *S. typhimurium* e 200 µg/mL para *S. aureus* (NISHINA et al., 1991). Contudo, o óleo essencial das folhas de *P. heterocycla* var. *pubescens* exibiu uma atividade mais potente que o extrato e o composto isolado. O óleo essencial foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* e *E. coli* na concentração de 31,76 µg/mL. Esse resultado é similar ao apresentado por óleos essenciais de outras espécies como *P. kwangsiensis* W.Y. Hsiung, Q.H. Dai & J.K. Liu. e *P. heterocycla* fo *gracilis* (W.Y. Hsiung ex Houz.) T.P. Yi, que apresentaram CIM de 31,76 µg/mL frente a *E. coli* e CIM variando de 22,23 a 45,24 µg/mL frente a *S. aureus* (JIN; YUAN; ZHANG, 2011).

Figura 2. Estrutura química da 2,6-dimetóxi-*p*-benzoquinona, composto isolado de *Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens* (Pradelle) Ohwi.

O método da supressão do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) é uma das metodologias que podem ser utilizadas para avaliar a capacidade antioxidante de substâncias. O resultado desse ensaio pode ser dado como CE₅₀, que é a concentração necessária de

amostra para suprimir 50% desse radical livre (WRÓBLEWSKA et al., 2018). Assim como observado para a atividade antimicrobiana, a variação dos resultados para a atividade antioxidante dos bambus foi grande, com valores de CE_{50} entre 5.300 $\mu\text{g/mL}$ até 2,85 $\mu\text{g/mL}$. Os extratos aquosos dos brotos de *P. nigra* (Lodd. Ex Lindl) Munro e *P. pubescens* apresentaram os maiores valores, CE_{50} = 5.300 e 4.700 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (PARK; JHON, 2010). Extratos etanólicos de *M. pluriflora* ex. C. G Camus apresentaram valores intermediários, com CE_{50} = 181,9 $\mu\text{g/mL}$ para os colmos e CE_{50} =119,5 $\mu\text{g/mL}$ para as folhas (GAGLIANO; GROMBONE-GUARATINE; FURLAN, 2018). Valores menores foram observados em alguns compostos isolados da espécie *Sasa borealis* (Hack) Makino & Shibata como iso-orientina (CE_{50} =9,5 $\mu\text{g/mL}$), iso-orientina 2-*O*- α -L-ramnosídeo (CE_{50} =34,5 $\mu\text{g/mL}$) e apigenina 6-*C*- β -D-xilopiranosil-8-*C*- β -D-glucopiranosídeo (CE_{50} =161,5 $\mu\text{g/mL}$), (PARK et al., 2007) (figura 3) e outros isolados da espécie *P. edulis* (Carrière) J. Houz., ácido 3-*O*-(3'-metilcafeil)-quínico (CE_{50} =16 $\mu\text{g/mL}$), ácido 5-*O*-cafeoil-4-metilquínico (CE_{50} =8,8 $\mu\text{g/mL}$) e ácido 3-*O*-cafeoil-1-metil quínico (CE_{50} =6,9 $\mu\text{g/mL}$) (KWEON; HWANG; SUNG, 2001) (figura 4). Valores ainda menores de CE_{50} e, conseqüentemente, maior atividade, foram observados nos óleos essenciais de *P. heterocycla* cv. *Pubescens* (CE_{50} =2,85 $\mu\text{g/mL}$) (JIN; YUAN; ZHANG, 2011), *Pseudosasa amabilis* McClure (CE_{50} =5,29 $\mu\text{g/mL}$) e *Indocalamus litifolius* (Keng) McClure (CE_{50} =4,99 $\mu\text{g/mL}$) (HU et al., 2011).

Figura 3. Estruturas químicas de iso-orientina (a), iso-orientina 2-*O*- α -L-ramnosídeo (b), e apigenina 6-*C*- β -D-xilopiranosil-8-*C*- β -D-glucopiranosídeo (c), compostos isolados de *Sasa borealis* (Hack.) Makino & Shibata.

Figura 4. Estruturas químicas do ácido 3-*O*-(3'-metil-cafeoil)-quínico (a), ácido 5-*O*-cafeoil-4-metilquínico (b), ácido 3-*O*-cafeoil-1-metilquínico (c), compostos isolados de *Phyllostachys edulis* (Carrière) J. Houz.

A enzima tirosinase está envolvida na biossíntese de melanina (figura 5) e por isso, substâncias com a capacidade de inibir esta enzima são interessantes em produtos para o tratamento de hiperpigmentação cutânea (JIANYOU et al., 2014; CHOI et al, 2018). O extrato aquoso de aparas de bambus WEBS (Water-phase extract from bamboo shavings), que pode ser das espécies *Bambusa tuldoidea* Munro, *Sinocalamus beecheyana* var. *pubescens* P.F. Li ou *P. nigra* (Lodd.) Munro var. *henonis* (Mitf) Stapf ex Rendle, e possui em sua composição flavonoides, antraquinonas e ácidos fenólicos, foi avaliado quanto a sua capacidade em inibir a enzima tirosinase. O extrato WEBS apresentou CI_{50} (concentração necessária de amostra para apresentar 50% de inibição enzimática) com valor de 6 mg/mL. Esse valor foi superior ao obtido para o controle positivo arbutina ($CI_{50}=0,35$ mg/mL), um produto natural utilizado no tratamento de distúrbios pigmentares no Japão (JIANYOU et al., 2014). Por outro lado, a fração acetato de etila da espécie *P. nigra* var. *henonis*, que possui em sua composição catequina, ácido clorogênico, ácido caféico e ácido *p*-cumárico (figura 6), apresentou CI_{50} inferior ao da arbutina, 0,243 mg/mL (CHOI et al., 2018). Pirocatetol e hidroquinona (figura 6), compostos isolados do produto obtido da condensação do vapor gerado pela pirólise de *P. nigra* var. *henonis*, chamado de “*Bambusae caulis in Liquamen*” (BCL), apresentaram atividade anti-tirosinase e foram capazes de inibir a produção de melanina em células de melanoma B16-F10 (PARK; LEE, 2012).

Figura 5. Biossíntese da melanina.

Fonte: Rocha, Moreira (2007).

Figura 6. Estruturas químicas dos compostos presentes em *Phyllostachys nigra* (Lodd.) Munro var. *henonis* (Mitf) Stapf ex Rendle, catequina (a), ácido clorogênico (b), ácido cafeico (c), ácido p-cumárico (d) e no seu produto obtido da condensação do vapor gerado pela pirólise, chamado “*Bambusae caulis in Liquamen*” (BCL), pirocatecol (e) e hidroquinona (f).

Os bambus apresentam outras atividades biológicas além das mencionadas acima. O produto BCL, além de apresentar atividade frente a células de melanoma e anti-tirosinase, também atua como imunorregulador, hipoglicemiante, hipolipemiante, hipotensivo e antibacteriano (PARK; LEE, 2012). O extrato das aparas da espécie *Bambusa tuldoidea* Munro apresentou atividade anti-fadiga no ensaio da natação em camundongos BALB/c. Os compostos apontados como responsáveis por esta atividade foram os triterpenoides lup-20(29)-en-3-ona, friedelan-3-ona, lup-20(29)en-3-ol, α -amirina e olean-12-eno (figura 7) (ZHANG et al., 2006).

Figura 7. Estruturas químicas de lup-20(29)-en-3-ona (a), friedelan-3-ona (b), lup-20(29)en-3-ol (c), α -amirina (d), olean-12-eno (e), isolados do extrato de *Bambusa tuldoidea* Munro.

Os produtos obtidos da condensação do vapor gerado pela pirólise de *P. pubescens* e *P. nigra* apresentaram efeito anti-apoptótico e se mostraram úteis para o tratamento de lesão isquêmica. *P. pubescens* e *P. nigra* reduziram a apoptose em neurônios corticais expostos a *N*-metil-D-aspartato (NMDA) e o produto de *P. nigra* também apresentou atividade anti-plasmina. Guaiacol e siringol foram os compostos majoritários dos pirolisados de *P. pubescens* e *P. nigra*, respectivamente (figura 8) (HONG et al., 2010).

Figura 8 - Estruturas químicas de guaicol (a) e siringol (b), substâncias isoladas dos pirolisados de *Phyllostachys pubescens* e *Phyllostachys nigra*, respectivamente.

Assim, é possível observar que os bambus de origem asiática concentram o maior número de estudos com relação a atividades biológicas e composição química. Essas espécies são ricas em compostos fenólicos e possuem variadas atividades biológicas. Considerando o grande potencial das espécies asiáticas, as espécies americanas, dando ênfase nas encontradas em território brasileiro, tornam-se candidatas promissoras na pesquisa por novos produtos naturais biologicamente ativos.

1.2 *Guadua* Kunth

O gênero *Guadua* foi descrito por Kunth em 1822, após concluir que novos bambus americanos inicialmente identificados como pertencentes ao gênero *Bambusa* Schreb., possuíam características suficientes para formar um novo gênero (SODERSTROM; LONDOÑO, 1987). A presença de folhas caulinares triangulares com bordas contínuas ou quase contínuas e uma faixa de tricomas curtos e brancos acima e abaixo das linhas que demarcam os nós (Figura 9) são algumas das características que diferenciam *Guadua* de outros gêneros (LONDOÑO, 1992).

Este gênero, endêmico da América, compreende 33 espécies (CLARK; OLIVEIRA, 2018) espalhadas desde o México (22°55'N) até a Argentina (30°S), do nível do mar até 2.200 metros de altitude (LONDOÑO, 1998). O Brasil conta com 19 espécies identificadas em seu território, sendo 5 delas endêmicas (DRUMOND; WIEDMAN, 2017), popularmente conhecidas como tabocas ou taquaras. As Guaduas não são adaptadas a temperaturas abaixo de 0°C e maior parte delas cresce em áreas com precipitação anual superior a 1.200 mm (LONDOÑO, 1998).

Figura 9. Colmos de *Guadua angustifolia* Kunth com destaque para faixa de tricomas nos nós.

Fonte: Arquivo pessoal.

As Guaduas são os maiores bambus lenhosos do Novo Mundo, motivo pelo qual se destacam de outros gêneros nativos (MARULANDA; MÁRQUEZ; LONDOÑO, 2002). Além de contribuir como importante agente de manutenção do ambiente, preservando o solo contra os efeitos da erosão (UBIDIA, 1986), as características físicas desses bambus conferem a eles grande importância social, econômica e cultural. *G. incana* Londoño e *G. chaparensis* Londoño & Zurita são espécies encontradas em regiões de floresta tropical e utilizadas pelas populações locais para construção rural, como currais e cercas e na condução de água (LONDOÑO; ZURITA, 2008). Durante o século XIX, na Colômbia, foram desenvolvidas técnicas de construção civil utilizando *G. angustifolia* Kunth (CASTRO, 1985). No Equador, achados arqueológicos evidenciam o uso das Guaduas também para a construção de casas e templos. O uso desses bambus se estende até períodos mais recentes da história, servindo como matéria prima para manufatura de objetos de uso diário e habitação (UBIDIA, 1986).

1.2.1 *Guadua angustifolia* Kunth

G. angustifolia foi descrita pela primeira em 1806 como *Bambusa guadua* Humboldt e Bonpland. Após reconhecer que os bambus americanos pertenciam a um gênero distinto de *Bambusa*, em 1822 Kunth alterou o nome da espécie para *G. angustifolia* (SODERSTROM;

LONDOÑO, 1987). A espécie é nativa da Colômbia, Equador e Venezuela e foi introduzida em outros países da América do Sul e Central, região sul dos Estados Unidos da América, Europa e Ásia (MARULANDA; MÁRQUEZ; LONDOÑO, 2002). A sua principal característica são os colmos lenhosos, resistentes e ocos, com paredes grossas ou estreitas, que se apresentam eretos ou ligeiramente curvados; sua altura varia entre 7 e 30 m e seu diâmetro, entre 5 a 20 cm; possui rizomas simpodiais bem desenvolvidos. Suas condições ótimas de crescimento são 0-1.500 metros de altitude, variação térmica entre 20-26°C, umidade relativa do ar de $\pm 80\%$ e níveis de chuva variando entre 1.300-4.000 mm. Os locais de ocorrência preferidos são margens de rios e terrenos com solos argilosos (LONDOÑO, 1998).

Após o aparecimento dos brotos, os colmos de *G. angustifolia* atingem sua altura máxima em 6-7 meses, e a maturidade total dos colmos é atingida de 4 a 6 anos. Possui um crescimento rápido, característico dos bambus, e pode chegar a crescer até 21 cm por dia (LONDOÑO et al, 2002).

G. angustifolia é de grande utilidade para as comunidades nativas e rurais, devido às características físicas que apresenta, sendo um material de construção ideal, com a vantagem de casas erguidas com esse material serem também resistentes a abalos sísmicos (LONDONO et al., 2002). Além do importante papel que desempenham no dia-a-dia das populações das regiões onde é encontrada, *G. angustifolia* contribui também com o próprio meio ambiente, agindo na conservação do solo, prevenindo a erosão, e protegendo a fauna e a flora (LONDOÑO, 1998).

Figura 10. Colmos, galhos e folhas de *Guadua angustifolia* Kunth.

Fonte: Arquivo pessoal.

Em virtude da sua utilização na construção civil, os colmos de *G. angustifolia* tiveram a sua resistência frente ao fogo analisada. Os parâmetros utilizados foram capacidade de ignição, propagação de chama, taxa de carbonização e variação da resistência com a temperatura. Os colmos, tanto na sua forma arredondada *in natura* como na forma de compensado laminar, apresentaram maior resistência que compensados de madeira (*Pinus radiata* D. Don), conferindo a essa espécie segurança no uso como material para construção de estruturas e acabamentos internos (MENA et al., 2012). Além desse trabalho, existem diversos outros estudos a respeito das propriedades físicas e mecânicas (GHAVAMI; MARINHO, 2005; OSORIO et al., 2005; VELÁSQUEZ; SARAZ; RESTREPO, 2005; SARAZ; BEDOYA; GALEANO, 2008; CORREAL; ARBELÁEZ, 2010; LUNA; LOZANO; TEKEUCHI, 2014).

Brito e colaboradores (1987), avaliaram a possibilidade do uso de diversas espécies de bambu para a produção de carvão vegetal. *G. angustifolia* apresentou um dos melhores rendimentos ao lado de *Bambusa vulgaris* cv *vittata* (Rivière & C. Rivière) McClure, levando a conclusão de que ambos os bambus podem ser empregados como matéria-prima para a produção de carvão vegetal.

Em relação às atividades biológicas, o número de estudos é escasso. Em um deles, foi proposta a obtenção do vinagre de *Guadua*. O vinagre de bambu é amplamente utilizado na China e no Japão, com aplicações que vão desde cuidados com a saúde e medicina tradicional, até agricultura e proteção do meio ambiente. Este vinagre é obtido a partir da condensação do vapor gerado nos estágios preliminares da produção do carvão de bambu (SULAIMAN et al., 2005). Assim, o vinagre de *G. angustifolia* foi avaliado para atividade antimicrobiana frente à *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, concluindo-se que este tem potencial para ser utilizado em formulações antissépticas (GALLÓN; TORRES; CABRERA, 2011). Em outro estudo, foi avaliado o potencial do vinagre de *Guadua* para uso alimentício. Concluiu-se que o vinagre não apresentou toxicidade após o refino (processo que visou eliminar compostos tóxicos) e que pode ser incorporado em formulações alimentícias que se tornam uma fonte de antioxidantes naturais. Compostos como siringol (figura 8) e *p*-guaiacol (figura 11) foram identificados neste vinagre (ECHAVARRÍA; YEPES; TORRES, 2012).

Figura 11. Estrutura química de *p*-guaiacol, composto isolado do vinagre de *Guadua angustifolia* Kunth.

Na Colômbia, as folhas de *G. angustifolia* são um tipo de resíduo da agroindústria. Buscou-se uma alternativa para a utilização dessas folhas avaliando-se o extrato etanólico das mesmas. Em sua composição, foram identificados aminoácidos, triterpenóides, esteroides, flavonoides e compostos fenólicos e o extrato apresentou atividade antioxidante, que pode ser útil em aplicações cosméticas (ALVAREZ; CABRERA; CONTRERAS, 2015).

As características físicas de *G. angustifolia* fazem com que esta espécie seja utilizada como matéria-prima na construção civil em países da América do Sul. Com isso, são numerosos os estudos evidenciando suas características físicas e mecânicas, e pouco se sabe sobre suas atividades biológicas. Portanto, estudos que avaliem também essas atividades são importantes para agregar valor a esta espécie.

OBJETIVOS

2. Objetivos

Devido à falta de estudos sobre as espécies de bambus americanos, o objetivo principal deste projeto é avaliação da composição química e das atividades biológicas de extratos e frações das folhas e colmos de *Guadua angustifolia* Kunth, buscando novas aplicações econômicas para essa espécie.

2.1 Objetivos específicos

- Análise da composição do óleo essencial por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas;
- Análise dos perfis químicos dos extratos e frações por Cromatografia em Camada Delgada, Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;
- Quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides presentes nos extratos brutos e frações;
- Determinação do potencial antioxidante dos extratos, frações e óleo essencial utilizando o método de supressão do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH);
- Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial, extratos brutos e frações pelo método da microdiluição, frente a modelos de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos;
- Avaliação da atividade inibitória da tirosinase dos extratos brutos e frações, visando aplicação em formulações cosméticas para o tratamento de hiperpigmentação cutânea;

METODOLOGIA

3. Metodologia

3.1 Material vegetal

As folhas e colmos de *Guadua angustifolia* Kunth (figura 12) foram coletados no dia 11 de abril de 2017 na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento (UPD) de Tatuí -SP, Brasil (23° 17' 4.000" S 47° 53' 58.000" W) vinculada a Agência Paulista de Tecnologia de Agronegócios (APTA) da Secretaria de Agricultura e Abastecimento. O material vegetal recolhido foi então identificado pelo Dr. Tarcisio Filgueiras do Instituto de Botânica de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil). Uma amostra testemunha foi depositada no Herbário dessa mesma instituição sob o número Moreno 600.

Figura 12. Colmos e folhas de *Guadua angustifolia* Kunth coletados em Tatuí (SP, Brasil)

Fonte: Arquivo pessoal.

3.2 Análises químicas

3.2.1 Extração do óleo essencial

O óleo essencial foi obtido a partir das folhas do material vegetal seco à sombra por 15 dias. As folhas foram separadas dos galhos, fragmentadas com auxílio de tesoura e a extração foi realizada através do processo de destilação por arraste a vapor (ANVISA, 2010). Em balão de fundo redondo com capacidade de 3000 mL, foram acondicionadas as folhas e água

destilada (1500 mL). Após 3 horas de extração, o óleo essencial foi recolhido do frasco florentino do equipamento e secado sobre sulfato de sódio anidro. Esse processo foi repetido 3 vezes utilizando um total de 355,58 g de folhas. Finalmente, o óleo foi pesado para determinação do rendimento. O óleo essencial foi armazenado em freezer (-25°C) até sua utilização nas análises. O rendimento da extração foi calculado de acordo com a equação 1:

Equação 1. Rendimento do óleo essencial

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{(\text{massa do óleo essencial})}{(\text{massa do material vegetal})} \times 100$$

3.2.2 Obtenção dos extratos brutos

O material vegetal foi separado em folhas e colmos (incluindo os galhos) e submetido à secagem em estufa de circulação de ar forçada à temperatura de 40°C. Após a secagem, o material foi moído em moinho de facas até a obtenção de um pó fino (figura 13).

Figura 13. Aspecto visual do pó obtido a partir da moagem dos colmos (A) e folhas (B).

Fonte: Arquivo pessoal.

O pó das folhas (462,65 g) e dos colmos (506,74 g) foi pesado e a extração foi feita, separadamente, em Soxhlet com etanol a 60%. Os extratos obtidos são considerados extratos brutos. A concentração dos extratos foi feita em evaporador rotatório (BÜCHI Rotavapor R-124) e após concentração, foram liofilizados (Thermo Fisher Scientific – Modulyo D Freeze Dryer) e armazenados em freezer a -20°C. O rendimento da extração foi calculado após a liofilização, de acordo com a equação 2:

Equação 2. Rendimento dos extratos brutos

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{(\text{massa do extrato})}{(\text{massa do material vegetal})} \times 100$$

3.2.3 Fracionamento dos extratos brutos

Os extratos brutos foram submetidos à extração sólido-líquido com solventes de polaridades crescentes (hexano, clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol). A separação foi realizada através de agitação eletromagnética (IKA®, modelo C-MAG HS 10) a temperatura ambiente utilizando o total de 400 mL de cada solvente para cada 5g de extrato bruto (100 mL de solvente por vez, durante 15 minutos). À medida que os solventes foram trocados, cada fração orgânica foi filtrada para posterior secagem em evaporador rotatório. As oito frações obtidas a partir dos extratos brutos foram completamente secas em chapa de aquecimento a 60°C e armazenadas em frascos de vidro em dessecador sob vácuo.

3.2.4 Determinação de compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos foram quantificados de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Ainsworth e Gillepsie (2007) com algumas modificações, utilizando o reagente Folin-Ciocalteu.

Os extratos brutos e frações das folhas e colmos foram dissolvidos em metanol:água 80:20 (v/v) na concentração de 5 mg/mL. Ácido Gálico (Sigma Aldrich®) foi utilizado para a construção da curva de calibração, nas concentrações finais de 1,25 a 30 µg/mL em metanol:água 80:20 (v/v). Como reagente adicional, foi preparada também uma solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 700 mmol/L em água destilada.

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços e as amostras (extratos brutos, frações e padrão) e reagentes foram distribuídos da seguinte forma:

- Amostra: 20 µL da amostra, 30 µL de H₂O destilada, 50 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 100 µL de solução de carbonato de sódio.
- Branco da amostra: 20 µL da amostra, 80 µL de H₂O destilada e 100 µL da solução de carbonato de sódio.
- Controle: 20 µL de metanol 80%, 30 µL de H₂O destilada, 50 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 100 µL de solução carbonato de sódio.
- Branco do controle: 20 µL de metanol 80%, 80 µL de H₂O destilada e 100 µL de solução carbonato de sódio.

Após 2 horas de reação no escuro com a microplaca coberta com folha de alumínio, as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro (Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader – Biotek) em $\lambda = 760$ nm. A mudança de coloração do reagente na presença de compostos fenólicos pode ser observada na figura a seguir.

Figura 14. Mudança de cor do reagente Folin-Ciocalteu na presença de compostos fenólicos. Amostra (A) e branco da amostra (B).

Fonte: Arquivo pessoal.

O conteúdo dos compostos fenólicos foi expresso em microgramas equivalentes de ácido gálico (EAG) por miligrama de amostra ($\mu\text{g EAG/mg}$). Este valor foi calculado a partir da equação gerada pela curva de calibração. As análises foram realizadas em triplicada, e os resultados mostrados como média seguida do seu desvio padrão.

3.2.5 Determinação de flavonoides

Os flavonoides foram quantificados de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Woisky e Salatino (1998) com algumas modificações, utilizando cloreto de alumínio (AlCl_3) como agente complexante.

Os extratos brutos e frações das folhas e colmos foram dissolvidos em metanol:água 80:20 (v/v) na concentração de 5 mg/mL. Quercetina (Sigma Aldrich®) foi utilizada para a construção da curva de calibração, nas concentrações finais de 0,1562 a 10 $\mu\text{g/mL}$ em metanol:água 80:20 (v/v). Cloreto de alumínio foi utilizado na concentração de 2% em metanol:água 80:20 (v/v).

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços e as amostras (extratos brutos, frações e padrão) e reagentes foram distribuídos da seguinte forma:

- Amostra: 20 μL da amostra, 160 μL da solução de metanol 80% e 20 μL da solução de AlCl_3 .
- Branco da amostra: 20 μL da amostra e 180 μL de metanol 80%.
- Controle: 180 μL de metanol 80% e 20 μL da solução de AlCl_3 .
- Branco do controle: 200 μL de metanol 80%.

Após 30 minutos de reação no escuro com a microplaca coberta com folha de alumínio, as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro (Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader – Biotek) em $\lambda = 425 \text{ nm}$. A mudança de coloração após a complexação dos flavonoides com AlCl_3 pode ser observada na figura a seguir.

Figura 15. Coloração observada na presença de flavonoides na amostra. Amostra (A) e branco da amostra (B).

Fonte: Arquivo pessoal.

O conteúdo de flavonoides totais foi expresso em microgramas equivalentes de quercetina (EQ) por miligrama de amostra ($\mu\text{g EQ/mg}$). Este valor foi calculado a partir da equação gerada pela curva de calibração. As análises foram realizadas em triplicada, e os resultados mostrados como média seguida do seu desvio padrão.

3.2.6 Análise dos extratos brutos e frações por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A análise preliminar cromatográfica dos extratos brutos e das frações foi obtida por Cromatografia em Camada Delgada, utilizando o revelador NP/PEG (*Natural products-polyethylene glycol reagent*) (WAGNER; BLADT, 2001) para pesquisa de flavonoides.

Foram utilizadas cromatoplasas de alumínio com sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck®) como fase estacionária. As placas foram eluídas no seguinte sistema de solventes: clorofórmio:metanol:ácido fórmico (94,5:05:0,5, v/v).

Os extratos brutos e frações das folhas e colmos foram dissolvidos em metanol na concentração de 10 mg/mL. Quercetina foi utilizado como substância de referência, também dissolvido em metanol, na concentração de 1 mg/mL. Adicionou-se às cromatoplasas, aproximadamente, 10 μL de cada extrato e fração e 5 μL da substância de referência.

Após desenvolvimento das cromatografias, as placas foram nebulizadas com o revelador e observadas sob luz UV-Vis em comprimentos de onda (λ) de 366 e 254 nm.

3.2.7 Análise do óleo essencial e frações por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)

As análises do óleo essencial e das frações (hexano, clorofórmio e acetato de etila) de *G. angustifolia* foram realizadas no laboratório do Instituto de Botânica de São Paulo, com supervisão da Dra. Maria Cláudia Marx Young. Utilizou-se o CG-EM Agilent® (série 6890) acoplado a espectrômetro de massas, com sistema quadrupolo (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector) e energia de ionização de 70 eV. A coluna capilar utilizada foi DB-5 (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 μm) e Hélio foi utilizado como gás de arraste. As amostras foram dissolvidas em metanol (1 mg/mL), e o volume de injeção com divisão de

fluxo-split/splitless foi 1 µL. As condições cromatográficas para o óleo essencial e as frações encontram-se descritas no quadro 1.

Quadro 1. Condições de análise do óleo essencial e frações de *Guadua angustifolia* Kunth por CG-EM.

Parâmetro	Óleo essencial	Frações
Temperatura do injetor	250°C	250°C
Temperatura do detector	250°C	250°C
Temperatura inicial	40°C (1 min)	100°C (1 min)
Temperatura final	240°C (10 min)	290°C (15 min)
Taxa de aquecimento	3°C/min	10°C/min
Fluxo do gás de arraste (He)	1 mL/min	1 mL/min

O índice de retenção de linear (IR) foi calculado utilizando uma série homóloga de n-alcanos (C8-C40) submetidas às mesmas condições de análise cromatográfica das amostras. O índice retenção linear foi calculado de acordo com Dool e Kratz (1963) e está mostrado na equação 3:

Equação 3. Índice de retenção linear (IR).

$$IR = 100Z + \frac{100[(TR^X) - (TR^Z)]}{(TR^{Z+1}) - (TR^Z)}$$

X - composto de interesse; Z - número de átomos de carbono do alcano com tempo de retenção anterior ao tempo de retenção de X; TR^X - tempo de retenção do composto X; TR^Z - tempo de retenção de Z; TR^{Z+1} - tempo de retenção do alcano com tempo de retenção posterior ao tempo de retenção de X.

A identificação dos compostos voláteis foi realizada através da comparação dos índices de retenção e espectros de massa obtidos com as bibliotecas instaladas no equipamento (NIST 08/Willey 2014) e com a literatura (ADAMS, 2007; LINSTROM; MALLARD, 2019)

3.2.8 Análise das frações por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises das frações (*n*-hexano, clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol) de *G. angustifolia* foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Biociências - USP, com supervisão do Prof^o Dr. Marcelo J. Pena Ferreira. Utilizou-se o CLAE Agilent 1260 com detector por varredura de espectro no Ultravioleta por arranjo de fotodiodos com célula de fluxo de 60 mm. A coluna utilizada foi Zorbax Eclipse Plus de fase reversa C18 (4,6

x 150 mm) 3,5 μ m de diâmetro de partícula e um fluxo de 1,0 mL por minuto. Foram utilizados solventes de grau cromatográfico da marca T. J. Baker.

O sistema de eluição das amostras foi elaborado de acordo com a polaridade das mesmas. Os dois sistemas empregam o modo gradiente e são constituídos por H₂O acidificada com 0,1% de ácido acético e acetonitrila (ACN).

Para a fração clorofórmica, o sistema de eluição (S1) foi iniciado por uma mistura de 90% de H₂O acidificada com 0,1% de ácido acético e 10% de ACN, no qual ACN atinge 25% em 10 minutos; de 10 a 30 minutos, ACN atinge 50%; de 30 a 50 minutos, ACN atinge 100%, o qual foi mantido por mais dez minutos.

Para as frações acetato de etila e *n*-butanol, o sistema de eluição (S2) foi iniciado com uma mistura de 90% de H₂O acidificada com 0,1% de ácido acético e 10% de ACN, que foi mantido até 6 minutos; até 7 minutos, 10 a 15% de ACN; de 7 a 22 minutos 15% de ACN; de 22 a 23 minutos, 15 a 20% de ACN; de 23 a 33 minutos 20% de ACN; de 33 a 34 minutos, 20 a 25% de ACN; de 34 a 44 minutos, 25% de ACN; de 44 a 54 minutos, 25 a 50% de ACN; e finalmente de 54 a 60 minutos, 50 a 100% de ACN.

A identificação dos compostos fenólicos foi realizada através da comparação dos tempos de retenção e espectros ultravioleta obtidos com uma série de padrões conhecidos e avaliados utilizando a mesma metodologia das amostras.

3.3 Análises biológicas

3.3.1 Determinação do potencial antioxidante

Para a avaliação do potencial antioxidante dos extratos foi empregado o método colorimétrico de captura do radical livre DPPH descrito por Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995), com algumas modificações. Este método se baseia na redução do radical DPPH através da transferência de elétrons dos compostos de interesse. Com a redução do DPPH, ocorre o decaimento de sua absorbância e também mudança de coloração (roxo para amarelo).

Diluições seriadas dos extratos brutos e frações das folhas e colmos foram preparadas utilizando metanol como solvente. As concentrações variaram de 50 μ g/mL a 500 μ g/mL. O óleo essencial foi avaliado somente em uma concentração. Quercetina (Sigma Aldrich®) e extrato de *Ginkgo biloba* EGB 761 (Abbott) foram as substâncias de referência utilizadas no ensaio, nas concentrações finais de 2 a 7 μ g/mL, também dissolvidas em metanol. A solução

estoque de DPPH foi preparada para que atingisse a concentração final no ensaio de 60 µg/mL (Solução estoque: 0,08 mg/mL). Esta solução foi mantida ao abrigo da luz até o momento de utilização.

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços e as amostras (óleo essencial, extratos brutos, frações e padrões) e reagentes foram distribuídos da seguinte forma:

- Amostra: 50 µL da amostra + 150 µL de DPPH
- Branco da amostra: 50 µL da amostra + 150 µL de metanol.
- Controle: 150 µL de DPPH + 50 µL metanol.
- Branco do controle: 200 µL de metanol.

As microplacas foram cobertas com papel alumínio para que a reação ocorresse no escuro. Após 30 minutos de reação, as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro (Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader – Biotek) em 515 nm. A figura a seguir ilustra a coloração do reagente DPPH oxidado e reduzido.

Figura 16. Coloração do reagente DPPH. Reagente oxidado (A) e reagente reduzido (B).

Fonte: Arquivo pessoal.

Os ensaios foram realizados em triplicata e a porcentagem de inibição do radical DPPH para cada concentração de amostra foi calculada a partir da seguinte equação 4:

Equação 4. Inibição do radical livre DPPH.

$$I (\%) = \frac{(\text{Controle} - \text{Controle em branco}) - (\text{Amostra} - \text{Amostra em branco})}{(\text{Controle} - \text{Controle em branco})} \times 100$$

O resultado é dado como o valor médio de CE₅₀ (concentração efetiva para se obter 50% de resposta) entre as repetições e seu respectivo desvio padrão. O valor de CE₅₀ é calculado através de regressão linear.

3.3.2 Atividade antimicrobiana por microdiluição

A avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial, extratos brutos e frações foi realizada no Laboratório de Controle Biológico de Medicamentos e Cosméticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, utilizando-se o método de microdiluição (MORENO et al., 2013; MACHADO et al., 2017).

Foram utilizados 5 micro-organismos para esta avaliação. Três bactérias: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Escherichia coli* (ATCC 8739), e dois fungos: *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404). Estas cepas encontravam-se liofilizadas e cada uma foi suspensa em solução salina estéril 0,9% (p/v) e em seguida ativadas, transferindo-se a suspensão para caldo nutritivo com incubação adequada para cada micro-organismo (Bactérias: 35-37 °C por 24 horas, *C. albicans*: 20-25 °C por 48 horas, *A. brasiliensis* a 20-25 °C por 7 dias). Partindo deste caldo, os micro-organismos foram transferidos em estrias para superfície de meio de cultura sólido e incubados em estufa. *A. brasiliensis* foi estriado em ágar acondicionado em tubos de ensaio inclinados. As bactérias foram incubadas a 35-37 °C por 24 horas, *C. albicans* a 20-25 °C por 48 horas para e *A. brasiliensis* a 20-25 °C por 7 dias. A partir dessas culturas, foram realizadas no máximo 5 subculturas.

As bactérias, foram cultivadas em caldo nutritivo e ágar caseína de soja (*Tryptic Soy Broth* e *Tryptic Soy Agar* - Difco®). Para os fungos, foi utilizado caldo nutritivo e ágar Sabouraud Dextrose (*Sabouraud Dextrose Broth* e *Sabouraud Dextrose Agar* - Difco®). Todos os meios de cultura foram preparados de acordo com as instruções do fabricante.

A massa celular resultante do crescimento em meio sólido foi recolhida em 9 mL de solução salina estéril 0,9% (p/v) e padronizada através de escala McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Polissorbato 80 foi utilizado para auxiliar no recolhimento da massa celular de *A. brasiliensis*. O inóculo é composto da solução salina + micro-organismo diluída em meio de cultura, até que se atinja a concentração final de 2×10^3 UFC/mL. Esta concentração foi conferida através de contagem das unidades formadoras de colônias. Para cada experimento foi realizada a semeadura para confirmação da viabilidade do inóculo.

Foram empregados como controles positivos cloranfenicol (USP) para *E. coli* e *S. aureus*, amicacina (Sigma Aldrich®) para *P. aeruginosa* e nistatina (USP) para *C. albicans* e *A. brasiliensis*. As soluções estoque foram preparadas na concentração de 1 mg/mL para atingirem a concentração de 50 µg/mL no poço da microplaca.

As amostras foram solubilizadas em DMSO:MeOH 1:1. A concentração final no poço da microplaca foi de 500 µg/mL para o óleo essencial e frações e de 2 mg/mL para os extratos brutos.

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços e as amostras (Óleo essencial, extratos brutos, frações e agentes antimicrobianos) e controles foram distribuídos da seguinte forma:

- Amostra: 10 µL de amostras + 190µL de inóculo
- Amostra em branco: 10 µL de amostra + 190 µL do meio de cultura.
- Controle de crescimento: 200µL de inóculo
- Controle de esterilidade: 200µL meio de cultura.
- Controle de solvente: 10 µL de + 190 µL de inóculo
- Branco de crescimento: 10 µL de DMSO:MeOH +190 µL de meio de cultura.

As microplacas foram incubadas em estufa por 48 h a 25°C para *C. albicans*, por 72 horas a 25 °C para *A. brasiliensis* e 24 h a 35°C para os demais micro-organismos. Passado o período de incubação, a leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro (Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader – Biotek) em λ 630 nm. Com os valores de absorbância das amostras e dos controles foi possível calcular a porcentagem de inibição de crescimento microbiano. As equações utilizadas encontram-se a seguir.

Equação 5. Crescimento microbiano.

$$\text{Crescimento microbiano(\%)} = \frac{(\text{Amostra} - \text{Amostra em branco})}{(\text{Controle de solvente} - \text{Branco de crescimento})} \times 100$$

Equação 6. Inibição do crescimento microbiano.

$$\text{Inibição (\%)} = 100 - \text{Crescimento microbiano}$$

Para *A. brasiliensis*, essa avaliação foi feita visualmente. Caso as amostras se apresentassem límpidas como as amostras em branco (amostras sem o micro-organismo), seria considerado 100% de inibição. Por outro lado, caso as amostras apresentassem turbidez, em qualquer intensidade, seria considerado que as amostras não foram capazes de inibir o crescimento deste micro-organismo (inibição igual à zero).

3.3.3 Atividade inibidora da tirosinase

Para a avaliação da atividade inibidora da enzima tirosinase foi empregada metodologia descrita por Masuda et al. (2005) e Hubert et al. (2016), com algumas modificações.

Os extratos brutos e frações das folhas e colmos foram avaliados na concentração final de 1 mg/mL. Para tanto, preparou-se uma solução-mãe com 25 mg de amostra, 100 µL de Tween 20 e 900 µL de DMSO. A solução final utilizada no ensaio foi preparada a partir de 100 µL de solução-mãe mais 800 µL de tampão fosfato pH 6,8. O preparo das amostras foi feito em dois passos para facilitar a dissolução dos extratos e para que o volume de DMSO e Tween não ultrapassasse 5% no poço da microplaca. Como substâncias de referência foram escolhidos um extrato vegetal, *Curcuma longa* (Ache[®]), e um composto isolado, ácido kójico (Gamma[®]), reconhecidos por sua capacidade de inibir a enzima. O preparo dessas amostras obedeceu ao mesmo processo dos extratos, com a diferença que foram realizadas diluições seriadas pois o resultado foi dado como CE₅₀ (concentração efetiva para se obter 50% de resposta).

A enzima tirosinase (Sigma-Aldrich[®]) foi diluída em tampão fosfato pH 6,8 obtendo-se uma solução com concentração de 0,033 mg/mL. Essa solução foi mantida sob refrigeração até o momento do uso. O substrato utilizado para esta enzima foi a 3,4-di-hidroxi-*L*-fenilalanina (*L*-DOPA) (Sigma-Aldrich[®]) na concentração de 0,5 mg/mL, utilizando o mesmo tampão como solvente.

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços e as amostras (extratos brutos, frações e substâncias de referência) e reagentes foram distribuídos da seguinte forma:

- Amostra: 40 µL de amostra + 80 µL de tampão + 40 µL de tirosinase
- Branco da amostra: 40 µL da amostra + 120 µL de tampão
- Controle: 40 µL de solvente da amostra + 80 µL de tampão + 40 µL de tirosinase
- Branco do controle: 40 µL de solvente da amostra + 120 µL de tampão

Protegida da luz a placa sofreu agitação moderada e foi incubada por 10 minutos a 30°C. Passado este tempo, adicionou-se o substrato (40 µL de *L*-DOPA) em todos os poços. A placa foi agitada e incubada novamente por 10 minutos a 30°C. Em seguida, realizou-se a leitura em espectrofotômetro (SynergyTM HT Multi-Detection Microplate Reader – Biotek) em λ de 475 nm. Na figura a seguir (figura 17) é possível observar a mudança na coloração após a adição do substrato da enzima.

Figura 17. Mudança de coloração ocorrida no ensaio da atividade inibidora da tirosinase. A linha superior corresponde à amostra e contém a enzima e o substrato. A linha inferior corresponde ao branco da amostra e contém somente o substrato.

Fonte: Arquivo pessoal.

Os ensaios foram realizados em triplicata e a porcentagem de atividade inibidora da tirosinase foi calculada a partir da seguinte equação:

Equação 7. Atividade inibidora da tirosinase.

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(\text{Controle} - \text{Branco do Controle}) - (\text{Amostra} - \text{Amostra em branco})}{\text{Controle} - \text{Branco do controle}} \times 100$$

Para as substâncias referência foram calculados os valores de CE_{50} enquanto os extratos foram avaliados em uma única concentração (1 mg/mL).

3.4 Análises estatísticas

Para os ensaios de determinação de compostos fenólicos totais, determinação de flavonoides, determinação do potencial antioxidante e atividade inibidora da tirosinase, os resultados foram submetidos à análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido por teste de Tukey utilizando o software Minitab® 17.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e discussão

4.1 Análises químicas

4.1.1 Rendimento e composição química do óleo essencial

A extração do óleo essencial das folhas de *G. angustifolia* foi realizada a partir de 355,58 g de material vegetal, resultando em um total de 0,097 g de óleo. O rendimento da extração foi de $0,027 \pm 0,03\%$. Este rendimento foi maior que o apresentado por *Phyllostachys pubescens* (Pradelle) Mazel ex J. Houz., onde as folhas apresentaram um rendimento de 0,01% do óleo essencial (TAKAHASHI; MIZUI; MIYAZAWA, 2010). Entretanto, em comparação com óleos essenciais extraídos dos colmos de espécies do gênero *Schizostachyum* Nees, a quantidade de óleo essencial em *G. angustifolia* foi inferior. Nas espécies *S. blumei* Nees., *S. brachycladum* Nees., *S. lima* (Blanco) Merrill., e *S. pilosum* S. Dransf., os respectivos teores de óleos essenciais foram 3,2 %, 4,9 %, 5,1 % e 7,3 % (VAIRAPPAN et al., 2015).

O óleo essencial de *G. angustifolia* consistia em uma mistura de pelo menos 15 compostos, dos quais 11 foram identificados, representando 77,5% da composição total. A tabela 1 relaciona os compostos, os índices de retenção calculados e os encontrados na literatura, bem como a porcentagem de cada composto no óleo essencial.

Tabela 1. Composição química do óleo essencial das folhas de *Guadua angustifolia*.

Composto	IR ^a	IR (lit.) ^b	%
α -ionona	1419	1430	5,6
geranil acetona	1447	1455	4,4
β -ionona	1476	1488	6,4
butilhidroxitolueno (BHT)	1499	1515	1,5
N.I.1: 196 (M ⁺), 57(100%), 43(87%), 41(67%)	1670	-	2,0
Tetradecanal	1713	1618	1,0
N.I.2: 196 (M ⁺), 69(100%), 57(83%), 43(72%)	1732	-	1,8
hexa-hidro-farnesil acetona (6,10,14-trimetil-2-pentadecanona)	1840	1801	23,1
di-isobutilftalato	1855	1877	6,4
Homosalato	1877	1903	1,6
<i>E,E</i> - farnesil acetona	1905	1913	4,7
ácido hexadecanóico	1962	1972	1,4
<i>Z</i> -fitol	2105	2112	21,3
N.I.3: 292 (M ⁺), 83(100%), 55(69%), 41(51%)	2168	-	9,9
N.I.4: 294 (M ⁺), 113(100%), 43(58%), 41(31%)	2174	-	8,8
Identificados			77,5
N.I.			22,5
Ácidos graxos e derivados			2,4
Artefatos			7,9
Fenóis prenilados			1,6
Terpenos			65,5

^a Índice de retenção-coluna DB-5; ^b Valores da literatura (ADAMS,2007; NIST;Willey). N.I. - não identificado

Os terpenos são responsáveis pela maior parte da composição química (65,5%), sendo os compostos majoritários hexa-hidro-farnesil acetona (6,10,14-trimetil-2-pentadecanona) (23,1%) e *Z*-fitol (21,3%). Estes dois terpenos já foram anteriormente identificados nos óleos essenciais de outras espécies de bambu, como em *P. pubescens*, onde hexa-hidro-farnesil acetona é um dos compostos principais (TAKAHASHI; MIZUI; MIYAZAWA, 2010) e em *Indocalamus tessellatus* (Munro) Keng f., no qual encontramos *Z*-fitol entre os majoritários (NONG et al.,2002).

Figura 18. Estrutura dos compostos majoritários identificados no óleo essencial de *Guadua angustifolia*, *Z*-fitol (a) e hexa-hidro-farnesil acetona (b)

Além disso, foram identificados dois artefatos, butil-hidróxitolueno (BHT) e diisobutilftalato, somando 7,9 % da composição total. O uso de solventes contaminados durante a extração (MALTESE; KOOY; VERPOORTE, 2009) e/ou a contaminação da planta por poluição ambiental poderiam explicar a presença dessas substâncias na composição do óleo essencial (FRIES; PUTTMANN, 2003; OMIDPANAHI et al., 2018).

4.1.2 Rendimento dos extratos brutos e frações

Os extratos brutos de *G. angustifolia* foram obtidos através da extração por Soxhlet em etanol:água (60:40), utilizando ao total 462,65g de pó das folhas e 506,74g de pó dos colmos. O aparelho de Soxhlet resulta em uma extração eficiente empregando quantidade reduzida de solvente, o qual é renovado a cada ciclo. Ademais, misturas etanólicas e metanólicas extraem a maioria das substâncias de interesse para análise fitoquímica, abrangendo compostos de alta, média e baixa polaridade (SIMÕES et al., 2003; LIU, 2011). Na tabela 2, são mostrados o rendimento e a massa obtida para cada extrato. É importante ressaltar que o rendimento foi calculado somente após a liofilização dos extratos brutos.

Tabela 2. Rendimento dos extratos brutos das folhas e colmos de *Guadua angustifolia* Kunth.

Parte da planta	Material seco moído (g)	Massa do extrato bruto (g)	Rendimento (%)
Folhas	462,65	75,97	16,4
Colmo	506,74	50,29	9,92

O extrato bruto das folhas apresentou rendimento maior que o extrato bruto dos colmos. Além do método extrativo e solventes empregados, o rendimento também depende da composição do material vegetal (GUPTA; NARANIWAL; KOTHARI, 2012; MACWAN; PATEL; KALIA, 2010). Os resultados apresentados sugerem que o extrato das folhas possui maior variedade e/ou concentração de compostos. Utilizando a mesma metodologia do presente trabalho, outros bambus nativos do continente americano apresentaram rendimentos semelhantes aos obtidos por *G. angustifolia*, com valores de 10,1% e 9,9% para folhas e colmos de *Aulonemia aristulata* (Döll) McClure e 14,2% e 12,2% para folhas e colmos de *Chusquea bambusoides* Rupr. Ex Döll (WRÓBLEWSKA; GUARATINI; MORENO, 2016).

Os ensaios químicos e biológicos foram realizados com os extratos brutos e suas frações, as quais foram preparadas a partir de 62,5 g de extrato bruto das folhas e 37,0 g de extrato bruto dos colmos, utilizando solventes de polaridades crescentes (hexano, clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol). O fracionamento dos extratos permite a separação dos compostos

de acordo com a polaridade dos solventes utilizados (SIMÕES et al., 2003). A massa e o rendimento de cada fração encontram-se na tabela a seguir.

Tabela 3. Rendimento das frações obtidas através dos extratos brutos das folhas e colmos de *Guadua angustifolia* Kunth.

Amostra	Massa da fração (g)	Rendimento (%)
FH	5,430	8,68
FCL	6,562	10,49
FAC	0,472	0,75
FBUT	0,755	1,21
CH	0,600	1,62
CCL	1,002	2,71
CAC	0,366	0,99
CBUT	0,814	2,20

FH - Fração hexânica das folhas, FCL - Fração clorofórmica das folhas, FAC - Fração de acetato de etila das folhas, FBUT - Fração butanólica das folhas, CH - Fração hexânica dos colmos, CCL - Fração clorofórmica dos colmos, CAC - Fração acetato de etila dos colmos, CBUT - Fração butanólica dos colmos.

Os maiores rendimentos foram obtidos pelas folhas, nas frações clorofórmica e hexânica (10,49% e 8,68%, respectivamente), enquanto suas outras frações e todas as frações dos colmos de uma forma geral apresentaram rendimentos menores, variando de 2,71 % para a clorofórmica dos colmos até 0,75% para acetato de etila das folhas. A composição de cada fração está ligada à polaridade do solvente utilizado na partição. Solventes apolares, como hexano, e de baixa polaridade, como o clorofórmio, extraem compostos lipofílicos como alcanos, ácidos graxos esteróis, alguns terpenos, compostos aromáticos, ésteres e alcaloides. Flavonoides e quinonas podem ser extraídos por solventes de média polaridade como acetato de etila, enquanto o *n*-butanol, solvente de maior polaridade utilizado, pode extrair glicosídeos e polifenóis como taninos e antocianinas (LIU, 2011). Diante do apresentado, pode-se dizer que o extrato bruto das folhas apresenta maior proporção de compostos com menor polaridade ou lipofílicos enquanto nos colmos, os compostos polares e apolares apresentam distribuição mais homogênea.

4.1.3 Teor de compostos fenólicos totais

A quantificação dos compostos fenólicos nos extratos brutos e frações foi realizada através do ensaio que se baseia na transferência de elétrons dos fenóis para o reagente Folin-Ciocalteu, formando complexos azuis que são determinados em comprimento de onda específico (AINSWORTH; GILLEPSIE, 2007). Ácido gálico foi a substância de referência e

sua curva de calibração é mostrada na figura 19, com a respectiva equação da reta e o coeficiente de correlação linear (r^2).

Os teores de compostos fenólicos totais foram calculados com base na equação gerada pela curva de calibração (Figura 19), e são apresentados em microgramas equivalentes de ácido gálico por miligrama de amostra (μg de EAG/mg). Esses valores são mostrados na tabela 4, expressos como média seguida do desvio padrão.

Figura 19. Curva de calibração do ácido gálico utilizada para os cálculos dos compostos fenólicos totais dos extratos brutos e frações.

Tabela 4. Teor de compostos fenólicos totais presentes nos extratos brutos e frações de *Guadua angustifolia* Kunth.

Amostra	Fenólicos totais (μg de EAG/mg)
FEB	27,41 $\pm$ 0,84 ^C
CEB	24,04 $\pm$ 0,85 ^C
FCL	44,03 $\pm$ 5,50 ^B
FAC	31,68 $\pm$ 1,71 ^C
FBUT	47,32 $\pm$ 3,50 ^B
CCL	57,43 $\pm$ 5,67 ^A
CAC	42,77 $\pm$ 2,94 ^B
CBUT	46,81 $\pm$ 4,51 ^B

O teor de compostos fenólicos totais é expresso como a média entre as três repetições realizadas seguida do desvio padrão. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$. Os resultados que não compartilham as mesmas letras são estatisticamente diferentes. FEB-Extrato bruto das folhas, CEB-Extrato bruto dos colmos, FCL - Fração clorofórmica das folhas, FAC - Fração de acetato de etila das folhas, FBUT - Fração butanólica das folhas, CCL - Fração clorofórmica dos colmos, CAC - Fração acetato de etila dos colmos, CBUT - Fração butanólica dos colmos.

A concentração de compostos fenólicos totais presentes nos extratos brutos das folhas ($27,41 \pm 0,84 \mu\text{g}$ de EAG/mg) é ligeiramente maior que aquela encontrada para os colmos ($24,04 \pm 0,85 \mu\text{g}$ de EAG/mg). Os extratos brutos de *G. angustifolia* apresentaram teores mais elevados em comparação com *B. arudinacea* (Retz.) Willd., espécie nativa da Índia ($14,6 \mu\text{g}$ de EAG/mg) (MACWAN; PATEL, KALIA, 2010). Comparando com uma espécie nativa do Brasil, *Apoclada simplex* McClure & Smith, esses teores foram inferiores, apresentando $131,4 \pm 5,97 \mu\text{g}$ de EAG/mg para os colmos e $58,36 \pm 1,69 \mu\text{g}$ de EAG/mg para as folhas (ISSA, 2015). Nessa espécie o teor de compostos fenólicos nos colmos foi mais que o dobro do encontrado nas folhas, diferente dos resultados de *G. angustifolia*, a qual apresentou valores próximos para colmos e folhas. Em relação às frações, a clorofórmica dos colmos apresentou o maior teor ($57,43 \pm 5,67 \mu\text{g}$ de EAG/mg) e entre as frações das folhas, a butanólica apresentou o maior teor ($47,32 \pm 3,50 \mu\text{g}$ de EAG/mg).

4.1.4 Teor de flavonoides

A determinação do teor de flavonoides nos extratos brutos e frações de *G. angustifolia* foi realizada através do método colorimétrico que utiliza cloreto de alumínio (AlCl_3) como agente complexante. O ensaio foi realizado em triplicata e a curva de calibração média para o padrão de quercetina com a respectiva equação da reta e o coeficiente de correlação linear (r^2) calculado neste experimento encontram-se na figura a seguir (figura 20).

Figura 20. Curva de calibração da quercetina utilizada para os cálculos do conteúdo de flavonoides dos extratos brutos e frações.

O teor de flavonoides nos extratos brutos e frações foi calculado através da equação da reta gerada a partir da curva de calibração. O resultado foi apresentado como μg de EQ/mg (micrograma de equivalente de quercetina / miligrama de amostra) e na tabela 5 estão apresentados os teores para cada amostra, seguidos do seu desvio padrão.

Tabela 5. Teor de flavonoides presentes nos extratos brutos e frações de *Guadua angustifolia* Kunth.

Amostra	Flavonoides (μg de EQ/mg)
FEB	$1,57 \pm 0,84^A$
CEB	$0,36 \pm 0,85^D$
FCL	$0,92 \pm 5,5^C$
FAC	$1,27 \pm 1,71^B$
FBUT	$0,91 \pm 3,5^C$
CCL	$0,23 \pm 5,67^D$
CAC	$0,34 \pm 2,94^D$
CBUT	$0,42 \pm 4,51^D$

O teor de flavonoides é expresso como a média entre as três repetições realizadas seguida do desvio padrão. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$. Os resultados que não compartilham as mesmas letras são estatisticamente diferentes. FEB-Extrato bruto das folhas, CEB-Extrato bruto dos colmos, FCL - Fração clorofórmica das folhas, FAC - Fração de acetato de etila das folhas, FBUT - Fração butanólica das folhas, CCL - Fração clorofórmica dos colmos, CAC - Fração acetato de etila dos colmos, CBUT - Fração butanólica dos colmos.

O extrato bruto das folhas ($1,57 \pm 0,02 \mu\text{g}$ de EQ/mg) possui concentração de flavonoides quatro vezes maior que os colmos ($0,36 \pm 0,02 \mu\text{g}$ de EQ/mg). Comparando-se o resultado deste ensaio com os resultados obtidos no ensaio de quantificação de compostos fenólicos totais, pode-se afirmar que menos de 10 % dos compostos fenólicos dos extratos brutos são flavonoides. Os teores encontrados nos extratos das folhas e colmos de *G. angustifolia* foram inferiores aos encontrados nos extratos de outra espécie nativa *A. simplex*, que apresentou $12,40 \pm 0,39 \mu\text{g}$ de EQ/mg para as folhas e $4,44 \pm 0,08 \mu\text{g}$ de EQ/mg para os colmos (ISSA, 2015). Algumas espécies da Ásia também exibiram teores mais elevados que *G. angustifolia* em extratos metanólicos das folhas. Em *B. arudinacea* são encontrados $6,71 \mu\text{g}$ de EQ/mg (MACWAN; PATEL; KALIA, 2010), e destacando-se entre os resultados aqui apresentados temos *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) Nees, também uma espécie de bambu-gigante asiático, com um teor de flavonoides de $199 \mu\text{g}$ de EQ/mg (GOYAL; MIDDHA; SEN, 2011). Entre as frações das folhas, a fração acetato de etila apresentou a maior concentração de flavonoides, $1,27 \mu\text{g}$ de EQ/mg. Em relação aos colmos, a fração que concentrou o maior teor de flavonoides foi a butanólica, com $0,42 \mu\text{g}$ de EQ/mg.

4.1.5 Análise dos extratos brutos e frações por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A presença de fenólicos nos extratos brutos e frações de *G. angustifolia* também foi avaliada através da Cromatografia em Camada Delgada. Para tanto, utilizou-se o reagente NP/PEG 28 (*Natural products-polyethyleneglycol reagent*), o qual intensifica a fluorescência de flavonoides quando a placa é exposta a luz ultravioleta em 365 nm. Quercetina foi a substância de referência utilizada. Na figura a seguir, é possível visualizar o perfil cromatográfico de cada amostra após aspersão do reagente NP/PEG e exposição da placa à luz ultravioleta em 365nm.

Figura 21. Placa cromatográfica após aspersão do reagente NP/PEG em luz ultravioleta 365 nm.

1 - Fração hexânica das folhas, 2 - Fração clorofórmica das folhas, 3 - Fração de acetato de etila das folhas, 4 - Fração butanólica das folhas, 5 - Fração hexânica dos colmos, 6 - Fração clorofórmica dos colmos, 7 - Fração acetato de etila dos colmos, 8 - Fração butanólica dos colmos, 9- Extrato bruto das folhas, 10- Extrato bruto do colmo, P- Padrão (Quercetina).

Comparando os perfis cromatográficos dos extratos brutos e frações das folhas e colmos, é possível notar que a maior diferença entre eles é a presença de clorofila nas amostras das folhas, que se apresenta como regiões avermelhadas ao final da análise cromatográfica (R_f 0,77-0,87) (WAGNER; BLADT, 2001).

Em relação aos flavonoides, estes apresentam fluorescência na cor amarela, verde ou azul, as quais são intensificadas após a aplicação do reagente NP/PEG. No extrato bruto das

folhas (Amostra 9) é possível visualizar uma região amarelada perto do ponto de aplicação, que se apresenta novamente em sua fração butanólica (Amostra 4). Essa região tem aparência e fator de retenção similares aos da quercetina (Amostra P), o que pode ser um indicativo da presença deste composto na fração butanólica das folhas. As frações dos colmos apresentam regiões azuladas na faixa de R_f 0,78, o que pode indicar a presença de ácidos fenólicos ou cumarinas (WAGNER; BLADT, 2001).

Em suma, as amostras não apresentaram perfis que indiquem presença de diversos tipos de flavonoides. Esses resultados são avaliados com maior detalhamento na análise por cromatografia líquida de alta eficiência.

4.1.6 Identificação de compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os compostos fenólicos possuem como estrutura básica um anel aromático substituído por uma ou mais hidroxilas (fenol) e são classificados como fenóis simples ou polifenóis, de acordo com o número de anéis fenólicos presentes na molécula. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a melhor técnica para a separação desses compostos (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013). Aliados a CLAE, os detectores UV-vis são ideais para a identificação, visto que todos os fenólicos apresentam diferentes níveis de absorção de luz devido à presença dos anéis aromáticos e das ligações duplas conjugadas presentes em suas moléculas (STALIKAS, 2009). Comprimentos de onda que variam de 190-550 nm são utilizados na identificação desses compostos, e essa ampla faixa se deve ao fato de os fenólicos apresentarem diferentes máximos de absorção de acordo com suas estruturas. Entretanto, a absorção em 280 nm é comum a todos os compostos fenólicos (ALEIXANDRE-TUDO; TOIT, 2018). Por essa razão, para a avaliação das frações, foram selecionados os cromatogramas obtidos nesse comprimento de onda. Esses cromatogramas são mostrados a seguir.

Figura 22. Cromatogramas obtidos para as frações clorofórmicas das folhas (A) e colmos (B) de *Guadua angustifolia* Kunth através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em 280 nm.

Figura 23. Cromatogramas obtidos para as frações acetato de etila das folhas (A) e colmos (B) de *Guadua angustifolia* Kunth através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em 280 nm.

Figura 24. Cromatogramas obtidos para as frações butanólicas das folhas (A) e colmos (B) de *Guadua angustifolia* Kunth através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em 280 nm.

Os tempos de retenção e os espectros de absorção dos picos foram comparados à uma lista de padrões avaliados nas mesmas condições que as amostras. Contudo, foram considerados somente os picos que apresentaram tempos de retenção até 22 minutos para a fração clorofórmica e até 26 minutos para as frações acetato de etila e *n*-butanol. Após esses tempos não foi possível a comparação com os padrões, pois esses foram os maiores tempos de retenção apresentados por eles. Na tabela 6 são apresentados os compostos presentes nas amostras em que os tempos de retenção foram similares aos tempos de retenção dos padrões.

Tabela 6. Tempos de retenção dos compostos e das substâncias de referência identificados por cromatografia líquida de alta eficiência.

Amostra	Tempo de retenção da amostra	Substância de referência	Tempo de retenção do padrão
FCL	7,426	ácido <i>p</i> -cumárico	7,496 ¹
CCL	7,422		
FAC	10,224	ácido <i>p</i> -cumárico	10,428 ²
FBUT	10,217		
CAC	10,102		
CBUT	10,208		
FBUT	13,335	quercetina -3- <i>O</i> -galactosídeo	13,372 ²

FCL - Fração clorofórmica das folhas, CCL - Fração clorofórmica dos colmos, FAC - Fração de acetato de etila das folhas, FBUT- Fração butanólica das folhas, CAC - Fração acetato de etila dos colmos, CBUT - Fração butanólica dos colmos. ¹Tempo de retenção obtido na metodologia para frações mais apolares. ²Tempo de retenção obtido na metodologia para frações mais polares.

Os espectros de absorção no UV dos compostos mencionados na tabela 6, bem como os espectros dos padrões de referência são mostrados nas figuras a seguir.

Figura 25. Espectro de absorção no UV do ácido *p*-cumárico (Padrão).

Figura 26. Espectros de absorção no UV para os picos identificados como ácido *p*-cumárico nas frações de *Guadua angustifolia* Kunth.

Figura 27. Espectros de absorção no UV da quercetina-3-*O*-galactosídeo (Padrão) e para o pico identificado como essa substância na fração butanólica das folhas de *Guadua angustifolia* Kunth.

Avaliando os resultados, é possível sugerir que os resultados gerados pela análise das frações por CLAE tem relação com os resultados fornecidos pela análise por CCD. Assim como sugerido pela CCD, a fração butanólica das folhas possui um derivado de quercetina em sua composição. Contudo, com a avaliação usando CLAE-DAD, verificou-se que esse flavonoide trata-se do heterosídeo quercetina-3-*O*-galactosídeo (Hiperosídeo), que consiste na molécula da quercetina ligada a um açúcar, a galactose. Sua estrutura pode ser vista na figura 28.

Figura 28. Estrutura molecular do heterosídeo quercetina-3-*O*-galactosídeo (Hiperosídeo).

A segunda substância identificada foi o ácido *p*-cumárico (figura 6). Este ácido fenólico está presente nas frações clorofórmica, acetato de etila e butanólica das folhas e colmos. Comparando este resultado com o obtido na CCD, é possível sugerir que a zona

fluorescente azulada nas frações dos colmos pode corresponder a este composto. E apesar das frações das folhas não terem apresentado essa zona característica, elas também possuem ácido *p*-cumárico em sua composição.

Ácido *p*-cumárico também está presente na composição de espécies de bambus asiáticos, como *P. bambusoides*, *P. nigra*, *P. nigra* var. *henonis*, *P. pubescens* e *Pseudosasa japonica*. Entre as propriedades biológicas apresentadas por essa substância, podem ser citadas: atividade neuroprotetora, útil no tratamento da doença de Parkinson (VAUZOUR; CORONA; SPENCER, 2010); atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae* e *Salmonella typhimurium* (LOU et al., 2012); atividade antioxidante através do sequestro do radical OH e a capacidade de redução do colesterol LDL com a sua administração oral (ZANG et al., 2000).

Em relação ao hiperosídeo, até o presente momento não foram encontrados registros da sua identificação em outras espécies de bambus, ao contrário da sua aglicona quercetina, que já foi encontrada em espécies nativas da mata atlântica (*A. aristulata*) e asiáticas (*P. bambusoides*) (PARK; JHON, 2010; ZHAO et al., 2019; GROMBONE-GUARATINI et al., 2009). Também é interessante citar o fato de que os flavonoides identificados nos bambus, quando não estão em seu estado livre, geralmente apresentam-se como C-glicosídeos (CHOI; LEE, 2008; WANG et al., 2012; LIU et al., 2014) e não O-glicosídeos, como no caso do hiperosídeo. A respeito de suas atividades biológicas, este composto apresentou atividade antiviral, antioxidante e anti-inflamatória (KIM; UM, 2011). E a combinação de hiperosídeo e quercetina apresentou citotoxicidade frente a células de câncer de cólon, levando a apoptose dessas células (LI et al, 2013).

Os resultados aqui apresentados devem ser considerados uma análise preliminar, pois para uma análise mais acurada desses compostos, é necessário realizar o isolamento dos mesmos e ensaios adicionais através da espectroscopia de massas e ressonância magnética nuclear, para assim confirmar a estrutura dessas substâncias (SARKER; LATIF; GRAY, 2006; WATSON, 2014).

4.1.7 Análise das frações por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)

As frações de *G. angustifolia* foram avaliadas por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM), técnica que possibilita a identificação dos compostos voláteis e de baixo peso molecular (HILL; ROESSNER, 2013). Usando essa técnica, foi

possível identificar, em média, 90% da composição de cada fração, resultando em um total de 36 compostos caracterizados. Os cromatogramas obtidos para cada fração são mostrados nas figuras a seguir. Os compostos identificados, os índices de retenção calculados e os encontrados na literatura, bem como a distribuição de cada um deles em cada fração, encontram-se na tabela 7.

Figura 29. Cromatograma obtido para a fração hexânica das folhas de *Guadua angustifolia* Kunth por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM).

Figura 30. Cromatograma obtido para a fração hexânica dos colmos de *Guadua angustifolia* Kunth por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM).

As frações hexânicas das folhas e colmos (Figuras 29 e 30) tiveram respectivamente 94,10 e 94,57% de sua composição identificada. Os terpenos são responsáveis pela maior parte da composição dessa fração nas folhas (83,4 %), sendo o diterpeno Z-fitol o composto majoritário (72,0 %) (figura 18). O Z-fitol é utilizado como fragrância na indústria de cosméticos (MCGINTY; LETIZIA; API, 2010), mas também foram observadas algumas atividades biológicas para esse composto. Devido à presença do grupo hidroxila na molécula este pode neutralizar radicais livres pela doação de um radical hidrogênio ($H\bullet$) (SANTOS et al., 2013). Outra atividade descrita para esse composto foi atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* (INOUE et al., 2005).

Já na fração de colmos, três classes de compostos apresentaram proporções semelhantes, que são os hidrocarbonetos (21,75 %), quinonas terpenoídicas (20,55 %) e terpenos (20,5 %), representados por nonacosano (21,75 %) (figura 33), α -tocoferol (20,55 %) (figura 36) e esqualeno (14,24 %) (figura 33), respectivamente. Este último demonstrou ação protetora da pele humana contra peroxidação lipídica causada por luz UV, havendo ainda indicativos que esse triterpeno foi capaz de suprimir o desenvolvimento de células tumorais (KELLY, 1999). O esqualeno possui potencial aplicação em cosméticos dermatológicos por

sua ação antioxidante e por promover a hidratação e emoliência da pele (HUANG; LIN; FANG, 2009). α -Tocoferol compõe a classe de moléculas da vitamina E (α -, β -, γ -, δ -tocoferol), é produzido naturalmente por organismos fotossintéticos e também pode ser sintetizado. Contudo, o composto de origem natural apresenta maior biodisponibilidade que o sintético, o que torna os produtos naturais promissores na sua utilização como suplementos vitamínicos. Possui atividade sequestradora de diversos radicais (MAEDA; DELLAPENNA, 2007; SHEBIS et al., 2013) e também inibiu a adesão e agregação plaquetária e exerceu efeitos anti-inflamatórios em monócitos *in vitro* (KAUL; DEVERAJ; JIALA, 2001). Em relação ao hidrocarboneto nonacosano, há indicativos que este contribuiu para a atividade antimicrobiana apresentada pelo óleo essencial de *Pyrus communis* L. e *Malus domestica* Borkh, pois foi o composto majoritário nas duas espécies (50% e 24%, respectivamente) (EL-HAWARY et al., 2018).

Figura 31. Cromatograma obtido para a fração clorofórmica das folhas de *Guadua angustifolia* Kunth por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM).

Figura 32. Cromatograma obtido para a fração clorofórmica dos colmos de *Guadua angustifolia* Kunth por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM).

A fração clorofórmica das folhas (figura 31) teve 81,27 % da sua composição identificada e assim como na fração hexânica, os terpenos se apresentam em maior proporção (47,1 %). Os diterpenos Z-fitol (29,7 %) (figura 18) e neofitadieno (15,05 %) (figura 33) são os compostos majoritários dessa fração. Diversas propriedades são atribuídas a neofitadieno como, bactericida, antifúngico, antipirético, antioxidante e vermífugo (ABDEL-AAL; HARRON; MOFEED, 2015). A fração clorofórmica dos colmos (figura 32) apresentou a maior porcentagem de identificação entre as frações (96,9 %), tendo como classes principais os fenilpropanoides (26,46 %), quinonas terpenoídicas (22,54 %) e hidrocarbonetos (18,42%). Essas classes são representadas pelos compostos majoritários (*E*)-álcool coniferílico (16,3 %) (figura 36), α -tocoferol (22,54 %) (figura 36) e nonacosano (18,42 %) (figura 33), respectivamente. Álcool coniferílico é um dos principais precursores da lignina (CUNHA et al., 2012), composto presente nas paredes celulares das plantas e que fornece características estruturais importantes, contribuindo para a resistência à compressão e hidrofobicidade da parede celular (KOUTANIEMI et al., 2005).

Figura 33. Compostos identificados nas frações de *Guadua angustifolia* Kunth através de Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM). Nonacosano (a), esqualeno (b), neofitadieno (c)

Figura 34. Cromatograma obtido para a fração acetato de etila das folhas de *Guadua angustifolia* Kunth por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM).

Figura 35. Cromatograma obtido para a fração acetato de etila dos colmos de *Guadua angustifolia* Kunth por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM).

A fração acetato de etila das folhas (figura 34) teve 93,55% de sua composição identificada. Hidrocarbonetos e terpenos foram as principais classes e apresentaram proporções muito semelhantes, 38,19 % e 38,8%, respectivamente. Os compostos majoritários foram *Z*-fitol (31,39 %) (figura 18) e *E*-5-icoseno (11,21 %) (figura 36). A presença do ácido graxo *E*-5-icoseno está ligada à atividade antimicrobiana apresentada pelas espécies *Cestrum nocturnum* Duss, *Allium atrovioleaceum* Boiss. e *Aloe vera* (L.) Burm. f. (YOGESWARI et al., 2012). Já para essa fração dos colmos (figura 35), 90,85 % de sua composição foi identificada. Assim como nas folhas, os hidrocarbonetos (28,42 %) foram uma das maiores classes, juntamente com as quinonas terpenoídicas (18,28 %), tendo esqualeno (11,32 %) (figura 33) e α -tocoferol (18,28%) (figura 36) como compostos majoritários.

Figura 36. Compostos identificados nas frações de *Guadua angustifolia* Kunth por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM). (*E*)-álcool coniferílico (a), α -tocoferol (b), *E*-5-icoseno (C).

De forma geral, as frações dos colmos apresentaram maior número de compostos voláteis que as folhas. A classe dos terpenos, juntamente com os ácidos graxos e seus derivados, foram comuns a todas as frações. Nas frações dos colmos, assim como no óleo essencial das folhas, alguns compostos sintéticos (chamados de artefatos) também estiveram presentes. As porcentagens encontradas (hexano 9,47%, clorofórmio, 5,8% e acetato de etila 8,62%) foram semelhantes à do óleo essencial (7,9%). Segundo alguns autores, a presença dessas substâncias em produtos naturais pode estar ligada ao uso de solventes contaminados. Adicionalmente, estes compostos podem ainda ser o resultado da exposição da planta à poluição do solo e água no seu lugar de origem (FRIES; PUTTMANN, 2003; MALTESE; KOOY; VERPOORTE, 2009; OMIDPANAHI et al., 2018), o que pode ter ocorrido aqui, pois o material foi coletado em uma fazenda experimental. De forma geral, a composição de *G. angustifolia* apresentou diversos compostos já descritos para outras espécies de bambu nativas e asiáticas, como *M. pluriflora* (WRÓBLEWSKA, 2019), *P. pubescens* (WU; PENG; LI, 2009), *P. heterocycla* (Carrière) Mitford cv *heterocycla* e *P. kwangsiensis* W.Y. Hsiung (JIN; YUAN; ZHANG, 2011).

Tabela 7. Composição química das frações das folhas e colmos de *Guadua angustifolia* Kunth por GC-EM.

Composto	IR ^a	IR (lit.) ^b	Folhas (%)			Colmos (%)		
			H	CL	ACE	H	CL	ACE
2,3-di-hidrobenzofurano	1235	1226	-	-	-	-	-	1,6
<i>p</i> -hidróxi-benzaldeído	1388	1323	-	11,8	8,2	-	6,4	3,2
etilparabeno	1550	1467	-	-	-	-	-	0,5
ácido láurico	1566	1567	-	-	-	0,5	-	0,7
hexadeceno	1593	1590	-	-	4,8	-	-	0,7
hexadecano	1598	1600	-	-	2,5	-	-	0,3
3-hidróxi- β -damascona	1642	1617	-	2,4	-	-	-	-
siringaldeído	1692	1667	-	2,4	-	-	1,5	0,5
ácido mirístico	1766	1765	-	-	-	0,7	1,3	0,9
(<i>E</i>)-álcool coniferílico	1776	1727	-	9,4	2,3	0,5	16,3	2,8
1-octadeceno	1792	1790	-	-	7,4	-	-	2,7
N.I.1: 647 (M ⁺⁺), 57 (100%), 71 (60%), 85 (40%)	1796	-	-	-	-	0,5	-	-
octadecano	1797	1800	-	-	2,7	-	-	1,2
N.I.2: 530 (M ⁺⁺), 55 (100%), 57 (79%), 81 (71%)	1890	-	-	-	-	0,3	-	-
(<i>E</i>)-15-heptadecenal	1913	2083			1,6			0,4
N.I.3: 281 (M ⁺⁺), 137 (100%), 180 (67%), 124 (56%)	1923	-	-	8,2	-	-	-	-
N.I.3: 221 (M ⁺⁺), 124 (100%), 111 (24%), 55 (16%)	1923	-	-	-	2,9	-	-	-
neofitadieno	1933	1830	11,5	15,1	7,4	0,6	-	-
N.I.4: 530 (M ⁺⁺), 58 (100%), 71 (75%), 57 (70%)	1944	-	-	-	-	0,2	-	-
N.I.5: 281 (M ⁺⁺), 181 (100%), 182 (9%), 153 (8%)	1952	-	-	-	-	-	0,8	-
N.I.6: 278 (M ⁺⁺), 82 (100%), 81 (93%), 95 (93%)	1959	-	-	4,4	-	-	-	-
N.I.7: 530 (M ⁺⁺), 181 (100%), 226 (72%), 57 (29%)	1959	-	-	-	-	0,4	-	-
N.I.8: 227 (M ⁺⁺), 181 (100%), 226 (72%), 151 (38%)	1959	-	-	-	-	-	2,3	-
N.I.9: 227 (M ⁺⁺), 181 (100%), 226 (84%), 198 (29%)	1959	-	-	-	-	-	-	0,9
ácido pentadecanóico	1965	1869	-	-	-	0,6	-	-
N.I.10: 278 (M ⁺⁺), 81(100%), 82 (96%), 57 (94%)	1979	-	5,9	-	-	-	-	-
N.I.11: 355 (M ⁺⁺), 81 (100%), 82 (91%), 57 (79%)	1979	-	-	6,2	-	-	-	-
N.I.12: 278 (M ⁺⁺), 57 (100%), 82 (92%), 81 (91%)	1979	-	-	-	3,5	-	-	-
di-isobutilftalato	1981	1877	-	-	-	0,6	-	0,6
pentadecanoato de etila	1995	1890	-	-	-	0,4	-	-
7,9-di- <i>terc</i> -butil-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dieno-2,8-diona	2034	1929	-	-	-	-	-	0,6
ferulato de etila	2055	1916	-	-	-	-	-	0,4
ácido palmítico	2068	1978	4,4	4,3	4,4	0,8	1,5	0,8
N.I.13: 530 (M ⁺⁺), 149 (100%), 73 (63%), 57 (60%)	2080	-	-	-	-	0,7	-	-
N.I.14: 281 (M ⁺⁺), 149 (100%), 55 (38%), 57 (35%)	2080	-	-	-	-	-	-	0,7
(<i>E</i>)-5- icoseno	2093	2285	-	-	11,2	-	-	6,7
palmitato de etila	2095	1968	6,2	-	-	3,0	2,2	-
N.I.15: 336 (M ⁺⁺), 55 (100%), 57 (92%), 97 (80%)	2119	-	-	-	-	-	-	0,8
(<i>E</i>)-álcool sináplico	2133	2034	-	6,4	-	-	7,2	1,2
heptadecanoato de etila	2194	2089	-	-	-	0,5	-	-

Continua

Continuação

Composto	IR ^a	IR (lit.) ^b	Folhas (%)			Colmos (%)		
			H	CL	ACE	H	CL	ACE
N.I.16: 341 (M ⁺⁺), 55 (100%), 57 (98%), 69 (85%)	2194	-	-	-	-	-	-	1,0
Z-fitol	2216	2122	72,0	29,7	31,4	2,2	2,1	1,41
linoleato de etila	2267	2164	-	-	-	2,3	1,7	1,9
1-docosano	2291	2190	-	-	5,4	-	-	4,7
estearato de etila	2295	2188	-	-	-	1,2	0,8	-
N.I.17: 355 (M ⁺⁺), 55 (100%), 57 (88%), 252 (69%)	2300	-	-	-	-	-	-	0,5
N.I.18: 355 (M ⁺⁺), 55 (100%), 57 (92%), 69 (68%)	2318	-	-	-	-	-	-	0,1
N.I.19: 355 (M ⁺⁺), 57 (100%), 55 (62%), 69 (46%)	2351	-	-	-	-	-	-	0,8
N.I.20: 341 (M ⁺⁺), 99 (100%), 57 (81%), 55 (72%)	2465	-	-	-	-	-	-	0,7
N.I.21: 355 (M ⁺⁺), 99 (100%), 55 (43%), 57 (40%)	2466	-	-	-	-	0,7	-	-
N.I.22: 355 (M ⁺⁺), 59 (100%), 55 (72%), 72 (59%)	2484	-	-	-	-	0,5	-	-
ciclotetracosano	2490	2589	-	-	4,1	-	-	3,2
N.I.23: 340 (M ⁺⁺), 57 (100%), 88 (70%), 55 (69%)	2492	-	-	-	-	0,6	-	-
N.I.24: 355 (M ⁺⁺), 57 (100%), 71 (64%), 55 (47%)	2591	-	-	-	-	0,4	-	-
bis (2-etilhexil) ftalato	2639	2519	-	-	-	8,9	5,8	7,0
N.I.25: 429 (M ⁺⁺), 57 (100%), 55 (63%), 71 (62%)	2688	-	-	-	-	-	-	2,4
N.I.25: 429 (M ⁺⁺), 57 (100%), 71 (74%), 85 (47%)	2788	-	-	-	-	1,2	-	1,2
esqualeno	2896	2833	-	-	-	14,2	9,2	11,3
α -tocospiro B	2927	2881	-	-	-	3,5	-	-
nonacosano	2989	2900	-	-	-	21,8	18,4	9,0
α -tocoferol	3192	3130	-	-	-	20,6	22,5	18,3
campesterol	3267	3131	-	-	-	4,7	-	3,3
stigmasterol	3294	3170	-	-	-	7,1	-	5,1
Identificados			94,1	81,27	94,1	81,3	93,6	94,6
Não Identificados			5,9	18,73	5,9	18,7	6,5	5,4
Ácidos graxos e derivados			10,6	4,3	4,4	10,0	7,5	4,2
Aldeídos graxos			0	0	1,6	0	0	0,4
Artefatos			0	0	0	9,5	5,8	8,6
Derivados do ácido chiquímico			0	14,1	8,2	0	7,9	5,4
Fenilpropanoides			0	15,8	2,3	0,5	23,5	4,4
Fitoesteróis			0	0	0	11,8	0	8,4
Hidrocarbonetos			0	0	38,2	21,8	18,4	28,4
Quinonas terpenoidicas			0	0	0	20,5	22,5	18,3
Terpenos			83,5	47,1	38,8	20,5	11,3	12,7

^aÍndice de retenção-coluna DB-5; ^bValores da literatura (ADAMS,2007; NIST; Willey).N.I. - não identificado. H - Fração hexânica, CL - Fração clorofórmica, ACE - Fração acetato de etila.

4.2 Análises biológicas

4.2.1 Determinação do potencial antioxidante

A procura por antioxidantes de origem natural para substituir os sintéticos já utilizados na indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia é uma grande tendência (SHEBIS et al., 2013). Para a avaliação do potencial antioxidante dos extratos, frações e óleo essencial de *G. angustifolia*, foi empregado o radical livre estável DPPH (2,2- difenil-1-picril-hidrazila). Os ensaios foram realizados em triplicata e na tabela 8 os resultados são mostrados como os valores médios de CE₅₀ seguidos dos respectivos desvios padrão.

Tabela 8. Capacidade antioxidante dos extratos brutos e frações de *Guadua angustifolia* Kunth pelo método da captura do radical livre DPPH.

Amostra	CE ₅₀ (µg/mL)
FEB	360,6±5,8 ^{DE}
CEB	472,2±15,4 ^A
FH	368,2±47,2 ^{CD}
FCL	281,7±0,9 ^F
FAC	313,3±0,9 ^{EF}
FBUT	321,0±4,8 ^{DEF}
CH	458,3±11,1 ^{AB}
CCL	194,8±2,3 ^G
CAC	135,5±4,7 ^H
CBUT	410,6±11,8 ^{BC}

Os valores de CE₅₀ são expressos como a média entre as três repetições realizadas. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$. Os resultados que não compartilham as mesmas letras são estatisticamente diferentes. FEB-Extrato bruto das folhas, CEB-Extrato bruto dos colmos, FH - Fração hexânica das folhas, FCL - Fração clorofórmica das folhas, FAC - Fração de acetato de etila das folhas, FBUT - Fração butanólica das folhas, CH - Fração hexânica dos colmos, CCL - Fração clorofórmica dos colmos, CAC - Fração acetato de etila dos colmos, CBUT - Fração butanólica dos colmos.

Comparando os extratos brutos, as folhas de *G. angustifolia* (CE₅₀=360,6±5,8µg/mL) apresentaram atividade antioxidante superior aos colmos (CE₅₀=472,2±15,4µg/mL). Entre as frações, a acetato de etila dos colmos (135,5±4,7µg/mL) e as frações clorofórmicas dos colmos (194,8±2,3µg/mL) e folhas (281,7±0,9µg/mL) foram as que apresentaram a maior capacidade de neutralizar o radical DPPH, com os menores valores de CE₅₀ entre as amostras avaliadas. Essa atividade pode ser atribuída à sinergia dos compostos fenólicos identificados nas frações, entre eles *p*-cumárico, *p*-hidroxibenzaldeído, siringaldeído, (*E*)-álcool coniferílico, ferulato de etila, (*E*)-álcool sinapílico, α -tocoferol, os quais possuem grupos

hidroxila que estabilizam um radical livre através da doação de um átomo de hidrogênio ou um elétron (DAI; MUMPER, 2010).

Em relação ao óleo essencial, não foi possível determinar seu CE_{50} , devido ao pequeno volume disponível. O ensaio foi realizado com apenas uma concentração e o óleo apresentou a atividade menos potente entre as amostras testadas, com apenas $21,1 \pm 0,5$ % de inibição do DPPH com a concentração de 2500 $\mu\text{g/mL}$, fato que pode estar ligado à presença de somente um composto fenólico em sua composição e em proporção muito pequena (Homosalato - 1,6%) (tabela 1).

Diversas espécies de bambu tiveram sua capacidade antioxidante determinada através do sequestro do radical livre DDPH, mesma metodologia do presente trabalho. Sobre as espécies asiáticas, pode ser citado o extrato aquoso dos brotos de *P. nigra*, que apresentou CE_{50} de 5.300 $\mu\text{g/mL}$ (PARK; JHON, 2010). Com concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, o extrato dos colmos de *P. pubescens*, também conhecido como bambu Moso, apresentou 41,4% de atividade antioxidante (TAKAHASHI et al., 2010). *D. strictus*, outra espécie asiática, apresentou 47,5% de atividade antioxidante com concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$ do extrato das folhas (GOYAL et al., 2011). Atividade mais potente foi apresentada pelos óleos essenciais, como no caso de *P. heterocyclus* cv. *Pubescens* (2,85 $\mu\text{g/mL}$) e *Indocalamus latifolius* (Keng) McClure (4,99 $\mu\text{g/mL}$). Sobre as espécies brasileiras, *Chusquea capituliflora* Trin. var. *pubescens* McClure e *M. pluriflora* apresentaram valores de EC_{50} de 137,55 $\mu\text{g/mL}$ e 222,52 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (WRÓBLEWSKA GUARATINI; MORENO, 2016), com destaque para a espécie *A. simplex*, que possuía a atividade mais intensa com EC_{50} de 67,5 $\mu\text{g/mL}$ para as folhas e 60,73 $\mu\text{g/mL}$ para os colmos (ISSA, 2015).

Para fins de comparação, foi determinado também o CE_{50} de um extrato reconhecido por capacidade antioxidante, o extrato padronizado de *Gingko biloba* (EGb 761) (MENSOR et al., 2001), que em nosso ensaio apresentou $CE_{50}=36,57 \pm 0,17$ $\mu\text{g/mL}$. Considerando os resultados apresentados por *G. angustifolia* e comparando-os com o extrato de referência de *G. biloba* e com outras espécies de bambus, é possível afirmar que a espécie apresentou capacidade antioxidante moderada. Com isso, pode-se considerar a utilização do potencial antioxidante de *G. angustifolia* como adjuvante no sistema conservante de produtos alimentícios, produtos farmacêuticos, e em formulações cosméticas, como conservante ou ingrediente ativo (KUSUMAWATI; INDRAYANTO, 2013; SHEBIS et al., 2013). Para tanto, são necessárias avaliações mais específicas para determinar o mecanismo e o alvo de ação dos extratos.

4.2.2 Atividade inibidora da tirosinase

A enzima tirosinase está envolvida no processo enzimático de escurecimento dos alimentos e na produção de melanina nos animais. Portanto, agentes inibidores desta enzima podem ser utilizados como conservantes pela indústria de alimentos e como clareadores da pele pela indústria cosmética. Muitas substâncias de origem natural exibem atividade inibidora da enzima tirosinase (MASUDA et al., 2005), assim sendo, avaliou-se essa atividade nos extratos e frações de *G. angustifolia*.

O ensaio que avalia a capacidade de inibição da enzima tirosinase proveniente de cogumelo, mesma metodologia do presente trabalho, é comumente utilizado para avaliar o potencial branqueador de extratos naturais ou moléculas isoladas (HUBERT et al., 2016). Os extratos e frações de *G. angustifolia* foram avaliados na concentração de 1 mg/mL (maior concentração em que foi possível solubilizar as amostras) e o resultado é dado como a porcentagem de inibição da enzima. Na tabela a seguir, os valores são apresentados como as médias entre três repetições realizadas seguidas do seu desvio padrão.

Tabela 9. Porcentagem de inibição da enzima tirosinase pelos extratos brutos e frações de *Guadua angustifolia* Kunth. na concentração de 1 mg/mL.

Amostra	Inibição (%)
FEB	28,98±1,87 ^{AB}
CEB	27,04±5,16 ^{AB}
FH	23,7±4,63 ^{AB}
FCL	15,55±0,29 ^B
FAC	25,33±5,81 ^{AB}
FBUT	35,04±2,26 ^A
CH	16,2±2,22 ^B
CCL	18,24 ^B ±4,77 ^B
CAC	21,48±4,23 ^{AB}
CBUT	21,28±3,72 ^{AB}

As porcentagens de inibição da enzima são expressas como a média entre as três repetições realizadas. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$. Os resultados que não compartilham as mesmas letras são estatisticamente diferentes. FEB-Extrato bruto das folhas, CEB-Extrato bruto dos colmos, FH - Fração hexânica das folhas, FCL - Fração clorofórmica das folhas, FAC - Fração de acetato de etila das folhas, FBUT - Fração butanólica das folhas, CH - Fração hexânica dos colmos, CCL - Fração clorofórmica dos colmos, CAC - Fração acetato de etila dos colmos, CBUT - Fração butanólica dos colmos.

Os extratos brutos das folhas e colmos apresentaram valores semelhantes de inibição, 28,98±1,87% e 27,04±5,16%, respectivamente. Entre as frações, a butanólica dos colmos foi a que apresentou maior atividade, 35,04±2,26%. O resultado apresentado por *G. angustifolia* é

semelhante ao exibido pelas espécies asiáticas *Gigantochloa scortechinii* Gamble, *G. levis* (Blanco) Merr., *G. ligulata* Gamble e *Schizostachyum zollingeri* Steud., as quais os extratos aquosos apresentaram em média 26% de inibição da enzima tirosinase na concentração de 1 mg/mL. Assim como em *G. angustifolia*, ácido *p*-cumárico também foi identificado nessas espécies e após ser avaliado isoladamente, apresentou intensa inibição da enzima tirosinase (ILHAM et al, 2008), o que é indicativo de que este composto contribui para a atividade apresentada. Por outro lado, o potencial apresentado por *G. angustifolia* foi mais intenso que o apresentado pelo produto WEBS, que para apresentar uma atividade semelhante à observada para *G. angustifolia* necessitou aproximadamente 2,5 mg/mL (JIANYOU et al, 2014).

As substâncias de referência utilizadas no ensaio foram escolhidas por sua capacidade inibir a enzima tirosinase (KIM et al., 2008 PARK et al, 2010; PANICH et al, 2011). *C. longa* (extrato) e ácido kójico (substância isolada) apresentaram valores de $CE_{50} = 0,414 \pm 0,002$ mg/mL e $5,2 \pm 1,63$ µg/mL, respectivamente. Em comparação com essas substâncias, os extratos e frações de *G. angustifolia* não apresentaram atividade intensa. Contudo, a enzima tirosinase não é o único alvo a ser explorado na pesquisa por substâncias capazes de inibir a produção de melanina. Em um estudo que avaliou a capacidade do ácido ascórbico em inibir a melanogênese induzida pela radiação ultravioleta, sugeriu-se que sua atividade está ligada à modulação do sistema de defesa antioxidante em células de melanoma humano G361, e não somente à inibição da enzima tirosinase (PANICH et al, 2011). Esta poderia ser uma forma alternativa de avaliar o efeito branqueador de *G. angustifolia*, considerando que seus extratos também apresentaram uma capacidade antioxidante moderada.

4.2.3 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do óleo essencial, dos extratos brutos e frações foi avaliada frente a cinco micro-organismos distintos, duas bactérias Gram-negativas, uma Gram-positiva e dois fungos, um filamentosos e outro leveduriforme. O aspecto visual das amostras após o período de incubação pode ser visto na figura 36. As porcentagens de inibição apresentadas pelas amostras frente a todos os micro-organismos avaliados estão reunidas na tabela 10.

Figura 37. Turbidez que as amostras (óleo essencial, extratos brutos e frações) apresentaram no ensaio antimicrobiano frente à *Aspergillus brasiliensis*, indicando que as amostras não foram capazes de inibir o crescimento do micro-organismo.

Tabela 10. Porcentagem de inibição do crescimento microbiano do óleo essencial, extratos brutos e frações de *Guadua angustifolia* Kunth.

Amostra	Concentração (µg/mL)	Inibição do crescimento (%)				
		<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
FEB	2000	20,0±7,1	0	43,0±8,5	6,9±2,2	67,6±1,97
CEB	2000	15,3±8,0	0	56,13±7,8	18,3±4,6	57,7±1,2
Óleo essencial	500	45,3±9,0	0	0	14,5±3,5	0
FH	500	18,3±1,4	0	45,5±1,5	25,5±9,5	46,8±1,5
FCL	500	14,5±3,5	0	44,1±2	46,6±5,1	40,2±8,6
FAC	500	9,5±1,5	0	11,5±3,5	14,5±5	51,9±14,5
FBUT	500	15,2±1,7	0	61,5±9,5	39,5±6,5	50,1±16,0
CH	500	0	0	0	0	50,5±8,0
CCL	500	34,5±13,2	0	51,5±5,5	29,5±10,5	44,7±22,6
CAC	500	0	0	55,5±0,5	21±5	43,2±8,68
CBUT	500	8,75±0,75	0	43,5±5,5	30,5±5,5	62,6±1,2
Cloranfenicol	50	-	-	100±0	99,8±0,2	-
Nistatina	50	100±0	100±0	-	-	-
Amicacina	50	-	-	-	-	100±0

As porcentagens de inibição do crescimento são expressas como a média entre as três repetições realizadas seguidas do desvio padrão. FEB-Extrato bruto das folhas, CEB-Extrato bruto dos colmos, FH - Fração hexânica das folhas, FCL - Fração clorofórmica das folhas, FAC - Fração de acetato de etila das folhas, FBUT - Fração butanólica das folhas, CH - Fração hexânica dos colmos, CCL - Fração clorofórmica dos colmos, CAC - Fração acetato de etila dos colmos, CBUT - Fração butanólica dos colmos.

Os antimicrobianos empregados como controle positivo foram utilizados na concentração final de 50 µg/mL e todos os micro-organismos apresentaram sensibilidade aos seus respectivos controles.

Em relação aos extratos brutos e frações, nenhum deles foi capaz de inibir totalmente o crescimento dos micro-organismos nas concentrações testadas. A maior porcentagem de inibição apresentada pelos extratos brutos das folhas e colmos foi frente à *P. aeruginosa*, com 67,6% e 57,7%, respectivamente. Entre as frações, as maiores porcentagens de inibição foram apresentadas pela butanólica das folhas frente a *S. aureus* (61,5%) e *E. coli* (39,6%), pela fração clorofórmica dos colmos frente a *C. albicans* (34,5%) e pela fração butanólica dos colmos, que apresentou 62,6% de inibição frente a *P. aeruginosa*. Alguns dos compostos majoritários dessas frações tiveram sua atividade antimicrobiana reportada, como para ácido *p*-cumárico (LOU et al., 2012), fitol (INOUE et al., 2005), nonacosano (EL-HAWARY et al., 2018), neofitadieno (ABDEL-AAL; HARRON; MOFEED, 2015) e *E*-5-icoseno (YOGESWARI et al., 2012), contudo, a presença desses compostos não foi capaz de promover intensa atividade nessas frações.

Apesar da dificuldade de se encontrar estudos em que os resultados fossem apresentados com as mesmas unidades aqui utilizadas, pôde ser verificado que, assim como para *G. angustifolia*, extratos de outras espécies de bambus não apresentam uma atividade antimicrobiana potente. Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) variaram de 400 µg/mL para o extrato etanólico dos colmos de *P. pubescens* frente a *S. aureus*, passando por 10.000 µg/mL do extrato clorofórmico/metanólico das cascas de *P. heterocycla* var. *pubescens* frente a *E. coli*, chegando até o valor de 50.000 µg/mL desse mesmo extrato frente a *P. aeruginosa* (WRÓBLEWSKA et al., 2018).

O óleo essencial também foi incapaz de inibir totalmente o crescimento dos micro-organismos testados, e sua maior capacidade de inibição foi frente à *C. albicans* (45,3%) e *E. coli* (45,3%). Organismos gram-negativos, como *E. coli*, geralmente são menos suscetíveis à ação de óleos essenciais, pois possuem uma camada de lipopolissacarídeo que cobre a membrana externa que circunda a parede celular, o que restringe a difusão de compostos hidrofóbicos (BURT, 2004; GILL; HOLLEY, 2006). Por outro lado, os óleos essenciais encontrados na literatura apresentaram atividade antimicrobiana mais intensa. *P. heterocycla* cv *heterocycla* foi capaz de inibir 100 % o crescimento de *E. coli* e *S. aureus* com 31,76 e 45,24 µg/mL de seu óleo essencial, respectivamente. O óleo de *P. kwangsiensis* apresentou resultado semelhante, com valores de MIC de 31,76 µg/mL para *E. coli* e 22,23 µg/mL frente a *S. aureus* (JIN; YUAN; ZHANG, 2011). Nessas duas espécies, o composto principal

identificado foi *cis*-3-hexen-1-ol (em média, 30%) e um outro estudo (CECOTTI et al, 2013) sugere que essa substância pode ter relação com a atividade antimicrobiana observada. Cabe ressaltar que o óleo volátil da espécie alvo desse estudo não continha o composto considerado ativo nas espécies asiáticas.

Para serem considerados promissores agentes antimicrobianos, extratos vegetais devem apresentar concentração inibitória mínima abaixo de 100 µg/mL (MORENO et al, 2013), o que não ocorreu com nenhuma das amostras avaliadas.

Mesmo que *G. angustifolia* não tenha apresentado atividade intensa a princípio, isso não significa que seu potencial antimicrobiano não possa ser aproveitado. Estudos têm demonstrado que o efeito sinérgico proveniente da associação entre antibióticos e produtos naturais pode promover novos tratamentos para doenças infecciosas, superar a resistência bacteriana, reduzir o uso desses fármacos e consequentemente seus efeitos colaterais. Como exemplo, pode ser citada a combinação de um extrato de sementes de uva à anfotericina B, que foi capaz de reduzir em 75% a concentração do fármaco e manter o nível de inibição frente ao micro-organismo avaliado (HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008). No caso de bambus, estudo semelhante foi realizado com a espécie *A. simplex*, onde seus extratos não apresentaram atividade antimicrobiana intensa (valores de CIM > 1 mg/mL), mas ao serem combinados com os conservantes sintéticos metil- e propilparabeno, apresentaram efeito sinérgico, possibilitando a diminuição da concentração inibitória mínima desses conservantes (ISSA, 2015). Diante do apresentado, pode-se considerar a realização de estudos adicionais avaliando a sinergia entre os extratos de *G. angustifolia* e substâncias antimicrobianas sintéticas.

CONCLUSÕES

5 Conclusões

O presente trabalho visou avaliar a composição química e atividades biológicas da espécie nativa de bambu *G. angustifolia* com o qual podemos tirar as seguintes conclusões:

- Este bambu possui óleo essencial em suas folhas, no qual os terpenos são responsáveis pela maior parte da composição;
- O teor mais elevado de compostos fenólicos está localizado na fração clorofórmica dos colmos;
- A fração acetato de etila das folhas apresentou o maior teor de flavonoides;
- Na composição das folhas e colmos de *G. angustifolia* foram identificados diversos compostos fenólicos como ácido *p*-cumárico, *p*-hidroxibenzaldeído, siringaldeído, (*E*)-álcool coniferílico, ferulato de etila, (*E*)-álcool sinápico, α -tocoferol e compostos de outras classes como ácidos graxos, hidrocarbonetos, fitoesteróis, entre outras.
- Os extratos das folhas e colmos apresentaram capacidade antioxidante moderada e a fração acetato de etila dos colmos apresentou a atividade mais intensa. Essa atividade pode ser atribuída à sinergia dos compostos fenólicos identificados. O óleo essencial apresentou a atividade mais fraca, tendo apresentado somente um composto fenólico em sua composição;
- As frações de *G. angustifolia* não apresentaram intensa atividade inibidora da tirosinase, contudo, considerando a capacidade antioxidante apresentada, outras vias podem ser exploradas visando à inibição da produção de melanina;
- As frações de *G. angustifolia* não apresentaram intensa atividade antimicrobiana, contudo, deve-se considerar a realização de estudos adicionais avaliando a sinergia entre os extratos de *G. angustifolia* e substâncias antimicrobianas sintéticas.

O presente trabalho contribuiu para fornecer uma análise química mais detalhada da espécie, o que pode servir de direcionamento para estudos futuros. Além disso, verificou-se que os extratos de *G. angustifolia* possuem potencial antioxidante moderado, tornando-os possíveis adjuvantes do sistema conservante nos setores alimentício e/ou cosmético.

REFERÊNCIAS

6. Referências

- ABDEL-AAL, E. I.; HAROON, A. M.; MOFEED, J. Successive solvent extraction and GC–MS analysis for the evaluation of the phytochemical constituents of the filamentous green alga *Spirogyra longata*. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 41, p. 233-46, 2015.
- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4. ed. Chicago: Allured Publishing Corporation, 2007.
- AFIFI, F.; SHERVINGTON, A.; DARWISH, R. M. Phytochemical and biological evaluation of *Arum palaestinum*. Part 1: Flavone C-glycosides. **Acta Technologiae et Legis Medicamenti**, v. 8, p. 105-11, 1997.
- ANVISA. **Farmacopéia Brasileira**. 5. ed. Brasília: 2010.
- 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, 2007.
- AKAO, Y. et al. A highly bioactive lignophenol derivative from bamboo lignin exhibits a potent activity to suppress apoptosis induced by oxidative stress in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 4791-801, 2004.
- ALEIXANDRE-TUDO, J. L.; TOIT, W. The role of UV-Visible spectroscopy for phenolic compounds quantification in winemaking. In: SOLÍS-OVIDEO, R. L.; PECH-CANUL, A. C. **Frontiers and new trends in the science of fermented food and beverages**. IntechOpen, 2018.
- ALVAREZ, E. S. D.; CABRERA, C. G.; CONTRERAS, A. C. Estudios para el aprovechamiento potencial de hojas de *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae), para el sector cosmético. **Rev Cubana Farm**, v. 49, n. 3, 2015.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm Wiss Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BRITO, J. O.; TOMAZELLO-FILHO, M.; SALGADO, A. L. B. Produção e caracterização do carvão vegetal de espécies e variedades de bambu. **IPEF**, n. 36, p. 13-7, 1987.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.
- BYSTRIAKOVA, N.; KAPOV, V.; LYSENKO, I. **Bamboo Biodiversity**. International Network for Bamboo and Rattan. UNEP-WCMC/INBAR, 2003.
- BYSTRIAKOVA, N.; KAPOV, V.; LYSENKO, I. **Bamboo Biodiversity**. International Network for Bamboo and Rattan. UNEP-WCMC/INBAR, 2004.

CASTRO, D. Contemporary perspectives for the use of bamboo. **The Journal of the American Bamboo Society**, v. 6, 1985.

CECOTTI, R.; CARPANA, E.; BERGOMI, P.; TAVA, A. Volatile Constituents of *Trifolium pratense* spp. *nivale* Quantified at Different Growth Stages, and Evaluation of their Antimicrobial Activity. **Natural Product Communications**, v. 8, n.11, 2013.

CHOI, S.; LEE, K. Enhanced extraction and Antioxidant activity analysis of Flavone C-glycosides from Black bamboo using Ultrasonic wave. **The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering**, v. 23, n. 4, p. 297-302, 2008.

CHOI, M. et al. Antioxidative and Anti-Melanogenic Activities of Bamboo Stems (*Phyllostachys nigra* variety *henosis*) via PKA/CREB-Mediated MITF Downregulation in B16F10 Melanoma Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p. 409, 2018.

CLARK, L. G.; LONDOÑO, X.; RUIZ-SANCHEZ, E. Bamboo taxonomy and habitat. In: LIESE, W.; KOHL, M. **Bamboo: the plant and its uses**. Springer International Publishing, 2015. cap.1, p.1-30.

CLARK, L. G.; OLIVEIRA, R. P. Diversity and evolution of the new world bamboos (Poaceae: Bambusoideae: Bambuseae, Olyreae). In: LUCAS, S. (Ed.). Proceedings of the 11th World Bamboo Congress. Xalapa, Mexico. **The World Bamboo Organization**, p. 35-47, 2018. Disponível em: <https://worldbamboo.net/wbcxi/keynotes/Clark,%20Lynn%20and%20Patricia%20de%20Oliveira.pdf>. Acesso em: 08 nov. 2019.

CORREAL, J. F.; ARBELÁEZ, J. Influence of age and height position on colombian *Guadua angustifolia* bamboo mechanical properties. **Maderas: Ciencia y tecnologia**, v. 12, n. 2, p. 105-13, 2010.

CUNHA, W. R. et al. Lignans: chemical and biological properties. In: RAO, V. **Phytochemicals - a global perspective of their role in nutrition and health**. IntechOpen, 2012.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, 7313-52, 2010.

DING, Y. Q. et al. Chromatographic analysis of polysaccharides extracted from chinese *Indocalamus tessellatus*. **Biomedical chromatography**, v. 12, p. 86-8, 1998.

DOOL, V. D.; KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p.463-471, 1963.

DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. Rio de Janeiro: ICH, 2017.

ECHAVARRÍA, C. A.; YEPES, F. J.; TORRES, H. P. Determinación del potencial antioxidante em extractos de vinagre *Guadua angustifolia* Kunth para aplicaciones alimenticias. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 17, n. 4, p. 330-42, 2012.

EL-HAWARY, S. S.; EL-TANTAWI, M.E.; KIROLLOS, F.N.; HAMMAM, W.E. Chemical Composition, in Vitro Cytotoxic and Antimicrobial Activities of Volatile Constituents from *Pyrus communis* L. and *Malus domestica* Borkh. Fruits cultivated in Egypt. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 21, n. 6, p. 1642-51, 2018.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n.1, p. 69-75, 2001.

FELISBERTO, M. H. F. et al. Young bamboo culm: potential food source of fiber and starch. **Food research international**, v. 101, p. 96-102, 2017.

FOSSEN, T.; SLIMESTAD, R.; ØVSTEDAL, D. O.; ANDERSEN, Ø. M. Anthocyanins of grasses. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 855-64, 2001.

FRIES, E.; PUTTMANN, W. Monitoring of the antioxidant BHT and its metabolite BHT-CHO in German river water and ground water. **The Science of the Total Environment**, v. 319, p. 269-82, 2004.

FUJIMURA, M. et al. Amino acid sequence and antimicrobial activity of chitin-binding peptides, Pp-AMP 1 and Pp-AMP 2, from Japanese bamboo shoots (*Phyllostachys pubescens*). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 69, p. 642-5, 2005.

GAGLIANO, J.; GROMBONE-GUARATINI, M. T.; FURLAN, C. M. Antioxidant potential and HPLC-DAD profile of phenolic compounds from leaves and culms of *Merostachys pluriflora*. **S Afr J Bot**, v. 115, p. 24-30, 2018.

GALLÓN, A. I. M.; TORRES, E. C.; CABRERA, C. G. Actividad antiséptica de vinagre de *Guadua angustifolia* Kunth. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 16, n. 3, p. 244-52, 2011.

GHAVAMI, K.; MARINHO, A. B. Propriedades físicas e mecânicas do colmo inteiro do bambu da espécie *Guadua angustifolia*. **Revista brasileira de engenharia agrícola e ambiental**, v. 9, n. 1, p. 107-14, 2005.

GIBSON, J. D. **Grasses & grassland ecology**. Nova York: Oxford University Press, 2009.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v.111, p.170-174, 2006.

GOYAL, A.; MIDDHA, S. K.; SEN, A. In vitro antioxidative profiling of different fractions of *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) Nees leaf extracts. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 1, p. 42-48, 2011.

GROMBONE-GUARATINI, M. T.; JESSEN, R. C.; CARDOSO-LOPES, E. M.; TORRES, L. M. B. Allelopathic potential of *Aulonemia aristulata* (Doll) MacClure, a native bamboo of Atlantic Rain Forest. **Allelopathy Journal**, v. 24, p. 183-90, 2009.

GUPTA, A.; NARANIWAL, M.; KOTHARI, V. Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. **International Journal of Applied and Natural Sciences**, v. 1, n. 1, 2012.

HAUBTICH, R. A glossary of bamboo terms. **The Journal of the American Bamboo Society**, v. 2, n. 4, p. 61-70, 1981.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, v. 15, p.639–652, 2008.

HILL, C. B.; ROESSNER, U. Metabolic Profiling by GC-MS, in: WECKWERTH, W.; KAHL, G. (Eds), *The Handbook of Plant Metabolomics*. Wiley-VCH GmbH & Co. KGaW, Weinheim, 2013, pp 1-23.

HONG, E. et al. Protective effects of the pyrolyzates derived from bamboo against neuronal damage and hematoaggregation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 594-599, 2010.

HSIUNG, W. Prospects for bamboo development in the world. **The Journal of the American Bamboo Society**, v.8, v.1-2, p.168-178, 1991.

HU, C. J. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil of Bamboo Leaves from four species in China. **Asian J Chem**, v. 23, n. 6, p. 2543-47, 2011.

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. 3170-6, 2000.

HUANG, Z.; LIN, Y.; FANG, J. Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. **Molecules**, v. 14, p. 540-54, 2009.

HUBERT, J. et al. In Vitro dermo-cosmetic evaluation of bark extracts from common temperate trees. *Planta Med*, v. 82, p. 1351-8, 2016.

ILHAM, A. M. et al. Antioxidant and antityrosinase properties of malaysian bamboo leaf extracts. **Journal of Tropical Forest**, v. 20, n. 2, p. 123-31, 2008.

INOUE, Y. et al. Biphasic effects of geranylgeraniol, teprenone, and phytol on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1770-4, 2005.

ISSA, F. I. C. **Avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos de *Apoclada simplex* McClure & Smith (Poaceae: Bambusoideae)**. 2015. 72f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

JIANYOU, Z. et al. Evaluation of whitening efficacy and safety of the water extract from bamboo shavings. **Journal of Medicinal Plant Research**, v.8, n.6, 345-352, 2014.

JIN, Y.C.; YUAN, K.; ZHANG, J. Chemical Composition, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil of *Phyllostachys heterocycla* cv. *Pubescens* Varieties from China. **Molecules**, v. 16, p. 4318-27, 2011.

JUDZIEWICZ, E.; CLARK, L. An overview of the diversity of the new world bamboos. **The Journal of the American Bamboo Society**, v. 8, n. 1-2, p. 117-22, 1991.

KAUL, N.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Alpha-tocopherol and atherosclerosis. **Exp Biol Med**, v. 226, p. 5-12, 2001.

KIM, S.; UM, J. Anti-Inflammatory activity of hyperoside through the suppression of nuclear factor- κ B activation in mouse peritoneal macrophages. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 39, p. 171-81, 2011.

KELLY, G. S. Squalene and its potential clinical uses. **Alternative Medicine Review: a Journal of Clinical Therapeutic**, v. 4, p. 29-36, 1999.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, v. 18, p. 2328-75, 2013.

KOUTANIEMI, S. et al. Characterization of basic *p*-coumaryl and coniferyl alcohol oxidizing peroxidases from a lignin-forming *Picea abies* suspension culture. **Plant Molecular Biology**, v. 58, p. 141-157, 2005.

KUSUMAWATI, I.; INDRAYANTO, G. Natural antioxidants in cosmetics. **Studies in Natural Products Chemistry**, p. 485–505, 2013.

LINSTROM, P. J.; MALLARD, W. G. **NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69**. National Institute of Standards and Technology: Gaithersburg MD, 20899.

LI, W. et al. Combination of quercetin and hyperoside has anticancer effects on renal cancer cells through inhibition of oncogenic microRNA-27a. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 39, p.171-81, 2013.

LIU, L. et al. Chemical Acylation of Water-Soluble Antioxidant of Bamboo Leaves (AOB-w) and Functional Evaluation of Oil-Soluble AOB (cAOB-o). **Journal of Food Science**, v. 79, p. C1886-C1894, 2014.

LIU, W. J .H. Traditional Herbal Medicine Research Methods: Identification, Analysis, Bioassay, and Pharmaceutical and Clinical Studies. Willey: New Jersey, 2011.

LONDOÑO, X. Distribución, morfología, anatomía, silvicultura y usos de los bambúes del Nuevo Mundo. **Cespedesia**, v. 19, n. 6, p. 87-137, 1992.

LONDOÑO, X. A decade of observations of a *Guadua angustifolia* plantation in Colombia. **The Journal of the American Bamboo Society**, v. 12, p. 37-43, 1998.

LONDOÑO, X. et al. Characterization of the anatomy of *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae) culms. **The Journal of the American Bamboo Society**, v. 16, p. 18-31, 2002.

LONDOÑO, X; ZURITA, E. Two new species of guadua (bambusoideae: guaduinae) from colombia and Bolivia. **Journal of the Botanical Research Institute of Texas**, v. 2, p. 25-34, 2008.

LOU, Z. *p*-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. **Food Control**, v. 25, p. 550-554, 2012.

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.

LUNA, P. et al. Determinación experimental de valores carcterísticos de resistencia para *Guadua angustifolia*. **Maderas: Ciencia y tecnologia**, v. 16, p. 77-92, 2014.

KIM, J. A. et al. Inhibition of Mushroom Tyrosinase and Melanogenesis B16 Mouse Melanoma Cells by Components Isolated from *Curcuma longa*. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 10, p. 1655-8, 2008.

KWEON, M. H.; HWANG, H. J.; SUNG, H. C. Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*). **J Agric Food Chem**, v. 49, n. 10, p. 4646-55, 2001.

MACHADO, K. N. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from two *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechm. Ex Moldenke (Acanthaceae) Populations. **Medicines**, v. 4, p. 26, 2017.

MAEDA, H.; DELLAPENNA, D. Tocopherol functions in photosynthetic organisms. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 10, p. 260-5, 2007.

MALTESE, F.; KOOY, F., VERPOORTE, R. Solvent derived artifacts in natural products chemistry. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 3, 2009.

MARULANDA, M. L.; MÁRQUEZ, P.; LONDOÑO, X. AFLP analysis of *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bamusoideae) in Colombia with emphasis on the Coffee Region. **The Journal of the American Bamboo Society**, v. 16, p. 32-42, 2002.

MASUDA, T.; YAMASHITA, D.; TAKEDA, Y.; YONEMORI, S. Screening for tyrosinade inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. **Biosc Biotechnol Biochem**, v. 69, p. 197-201, 2005.

MACWAN, C.; PATEL, H.; 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. 2413-8, 2010.

MCGINTY, D.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance material review on phytol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, 59-63, 2010.

MENA, J. et al. Assessment of fire reaction and resistance of *Guadua angustifolia* Kunth bamboo. **Construction and building materials**, v. 27, p. 60-5, 2012.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-30, 2001.

MORENO, P. R. H. et al. Native Brazilian plants against nosocomial infections: a critical review on their potential and the antimicrobial methodology. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 24, p. 3040-78, 2013.

NISHINA, A. et al. 2,6-Dimethoxy-*p*-benzoquinone as an antibacterial substance in the bark of *Phyllostachys heterocycla* var. *pubescens*, a species of thick-stemmed bamboo. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 266-9, 1991.

NONG, Y. A. et al. Study of flavour components of ruoye (*Indocalamus tessellatus*). **Fine chemicals**, v. 4, 2002.

OMIDPANAH, S. et al. Phthalate contamination of some plants and herbal products. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 17, p. 61-7, 2018.

OSORIO, J. A. et al. Influencia de parámetros físicos en la resistencia de diseño a compresión de la *Guadua angustifolia* Kunth. **Dyna**, v. 72, n. 147, p. 1-6, 2005.

PANICH, U. et al. Inhibition of UVA-mediated Melanogenesis by Ascorbic Acid through Modulation of Antioxidant Defense and Nitric Oxide System. **Arch Pharm Res**, v; 34, n. 5, p. 811-20, 2011.

PARK, E. et al. Anti-oxidant and Whitening Effects of *Curcuma longa* L. **Kor J Aesthet Cosmetol**, v. 8, p. 111-20, 2010.

PARK, E. J.; JHON, D.Y. The antioxidant, angiotensin converting enzyme inhibition activity, and phenolic compounds of bamboo shoot extracts LWT. **Food Science Technology**, v. 43, n. 4, p. 655-9, 2010.

PARK, H. et al. Antioxidant Flavone Glycosides from the Leaves of *Sasa borealis*. **Arch Pharm Res**, v. 30, n. 2, p. 161–6, 2007.

PARK, K. H.; LEE, M. W. Anti-oxidative, anti-inflammatory and whitening effects of phenolic compounds from *Bambusae Caulis in Liquamen*. **Natural Product Research**, v. 26, n. 18, 1687-1691, 2012.

PARMA, D. F. et al. Two new species of *Merostachys* (Poaceae: Bambusoideae) from the Brazilian Atlantic forest. **Phytotaxa**, v. 267, n. 3, p. 219-27, 2016.

PATWARDHAN, B. et al. Ayurveda and Traditional Medicine: a comparative overview. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 4, p. 465-73, 2005.

ROCHA, L. M.; MOREIRA, L. M. A. Diagnóstico laboratorial do albinismo oculocutâneo. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, p. 25-30, 2007.

SANTOS, C.C.M.P. et al. Antinociceptive and Antioxidant Activities of Phytol in Vivo and In Vitro Models. **Neuroscience Journal**, v. 2, 2013.

SARAZ, J. A. O. et al. Evaluación de las propiedades mecánicas de la estructura interna de la Guadua con um modelo matematico. **Dyna**, v. 76, n. 160, p. 169-78, 2008.

SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. **Natural Products Isolation**. 2. ed. New Jersey: Humana Press, 2006.

SHEBIS, Y. Natural Antioxidants: Function and Sources. **Food and Nutrition Sciences**, v. 4, 643-9, 2013.

SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/Editora da UFRGS, 2003.

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

SODERSTROM, T. R. Bamboo systematics: Yesterday, today and tomorrow. **The Journal of the American Bamboo Society**, v. 1, p. 4-13, 1985.

SODERSTROM, T. R.; LONDOÑO, X. Two new genera of brazilian bamboos related to Guadua (Poaceae: Bambusoideae: Bambuseae). **American Journal of Botany**, v.74, n.1, p.27-39, 1987.

SONG, X, *et al.* Dynamic allocation and transfer of non-structural carbohydrates, a possible mechanism for the explosive growth of Moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*). **Scientific Reports**, v.6, n.25908, 2016.

STALIKAS, C. D. Phenolic Acid and Flavonoids: Occurrence and Analytical Methods. In: UPPU, R.M., MURTHY, S.N., PRYOR, W.A., PARINANDI, N.L. (Eds.). **Free Radicals and Antioxidant Protocols: Methods in Molecular Biology** 610. New Jersey: Humana Press, 2010.

SULAIMAN R.J. et al. The inhibition of microbial growth by bamboo vinegar. **Journal of Bamboo Rattan**, v.1, p.71–80, 2005.

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.489-95, 2010.

UBIDIA, J.A. M. The Use of Bamboo in Ecuador: Past, Present and Future. **The Journal of the American Bamboo Society**, v.6, p. 64-103, 1986.

VAIRAPPAN, C. S., et al. Chemical constituents and biological activities of essential oils from four species of bamboo genus Schizostachyum. **Journal of tropical biology and conservation**, v.12, p.127-36, 2015.

VALENTINO, M. J. G.; GANADO, L. S.; GANADO, M. R.; UNDAN, J. R. Phytochemical screening and bio assay of the anti-microbial activity of three species of bamboo in Nueva Ecija, Philippines. **Advances in Environmental Biology**, v. 9, p. 389-96, 2015.

VAUZOUR, D.; CORONA, G.; SPENCER, J. P. E. Caffeic acid, tyrosol and *p*-coumaric acid are potent inhibitors of 5-S-cysteinyl-dopamine induced neurotoxicity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, p. 106–11, 2010.

VELÁSQUEZ, H. J. C. et al. Determinación de la resistencia mecánica a tensión y cizalladura de la *Guadua angustifolia* Kunth. **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, v.58, p. 2709-15, 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis, a Thin Layer Chromatography**. Second Edition. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2001.

WANG, J.; YUE, Y.; JIANG, H.; TANG, F. Rapid Screening for Flavone C-Glycosides in the Leaves of Different Species of Bamboo and Simultaneous Quantitation of Four Marker Compounds by HPLC-UV/DAD. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 205, p. 1-8, 2012.

WATSON, R. R. **Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation**. Elsevier, 2014.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99–105, 1998.

WRÓBLEWSKA, K. B.; GUARATINI, M. T. G.; MORENO, P. R. H. **Avaliação da Atividade Antioxidante e do Teor de Compostos Fenólicos e Flavonoides em Bambus Nativos do Sudeste Brasileiro**. Abstract presented XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Minas Gerais, Brasil, 2016.

WRÓBLEWSKA, K. B.; OLIVEIRA, D. C. S.; GROMBONE-GUARATINI, M. T.; MORENO, P. R. H. Medicinal Properties of Bamboos, Pharmacognosy - Medicinal Plants, Shagufta Perveen and Areej Al-Taweel. **IntechOpen**, 2018.

WRÓBLEWSKA, K. B. **Atividade antioxidante e fotoprotetora de bambus nativos do Sudeste brasileiro**. 2019. 176f. Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

WU, Y.; PENG, W.; LI, X. Py-GC/MS Analysis on Biomedical Components of *Phyllostachys pubescens*. **3rd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering 2009**, n. 5163266, 2009.

YOGESWARI, S.; RAMALAKSHMI, S.; NEELAVATHY, R.; MUTHUMARY, J. Identification and Comparative Studies of Different Volatile Fractions from *Monochaetia kansensis* by GCMS. **Global Journal of Pharmacology**, v. 6, n. 2, p. 65-71, 2012.

ZANG, L. et al. Effect of antioxidant protection by *p*-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 279, p. C954-C960, 2000.

ZHANG, Y. et al. Determination of flavone C glucosides in antioxidant of bamboo leaves (AOB) fortified foods by reversed-phase highperformance liquid chromatography with ultraviolet diode array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1065, p. 177 – 185, 2005.

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.

ZHAO, Y.; ZHAO, Y.; DU, Y.; KANG, J. S. Characterization and classification of three common Bambusoideae species in Korea by an HPLC-based analytical platform coupled with multivariate statistical analysis. **Industrial Crops & Products**, v. 130, p. 389-97, 2019.

ANEXOS

ANEXO A – *Currículo Lattes*

<p>Danielle Cristina Silva de Oliveira Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/4196225098093046 Última atualização do currículo em 10/11/2019</p>
<p>Resumo informado pelo autor</p> <hr/> <p>Mestrado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal • Instituto de Química • Universidade de São Paulo (Atual). Graduação em Farmácia pela Universidade Paulista (2016). Trabalho de conclusão de curso realizado em parceria com Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno, no laboratório de Biotecnologia Vegetal • Instituto de Química- Universidade de São Paulo. (Texto informado pelo autor)</p>	
<p>Nome civil</p> <hr/> <p>Nome Danielle Cristina Silva de Oliveira</p>	
<p>Dados pessoais</p> <hr/> <p>Filiação Osmar Barbosa de Oliveira e Eliana Procópio da Silva Nascimento 30/01/1991 • São Paulo/SP • Brasil Carteira de Identidade 493866589 SSP • SP • 30/04/2011 CPF 376.757.468-30</p>	
<p>Formação acadêmica/titulação</p> <hr/> <p>2017 Mestrado em Fármacos e Medicamentos. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil Título: Composição química e atividades biológicas de extratos de <i>Guadua angustifolia</i> Kunth Orientador: Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno 🧐 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior</p> <p>2013 Graduação em Farmácia. Universidade Paulista, UNIP, São Paulo, Brasil Título: Composição química e atividade biológica do óleo essencial de espécie nativa de Myrtaceae Orientador: Michelle M. G. Barão de Aguiar / Paulo Roberto H. Moreno</p> <p>2006 - 2008 Ensino Médio (2o grau) . Escola Estadual Professor Alberto Conte, EEPAC, Brasil, Ano de obtenção: 2008</p>	

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. OLIVEIRA, DANIELLE C. S.; KANEKO, TELMA MARY; YOUNG, MARIA CLÁUDIA MARX; MURAKAMI, CYNTHIA; CORDEIRO, INÊS; MORENO, PAULO ROBERTO HRIHOROWITSCH. Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Eugenia Dysenterica* DC Essential Oil. *Emerging Science Journal*, v.2, p.410 -, 2018.
Referências adicionais: Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.28991/esj-2018-01160]

Capítulos de livros publicados

1. B. Wróblewska, Katarzyna; C.S. de Oliveira, Danielle; Tereza Grombone-Guaratini, Maria; Roberto H. Moreno, Paulo. Medicinal Properties of Bamboos In: *Pharmacognosy - Medicinal Plants*. 1 ed.: IntechOpen, 2019, p. 1-19.
Referências adicionais: Brasil/Português. ISBN: 9781838806101, Home page: <https://www.intechopen.com/books/pharmacognosy-medicinal-plants/medicinal-properties-of-bamboos>

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. MORENO, P. R. H.; OLIVEIRA, D. C. S.; SANTOS, F. T.; NUNES, F. A.; BILEK, T.; GROMBONE-GUARATINI, M. T. Chemical Composition and Antimicrobial Properties from essential oils of two *Guadua* Kunth species (Poaceae-Bambusoideae) In: 49th International Symposium on Essential Oils, ISEO2018, 2018, Nã. Special Issue devoted to 49th International Symposium on Essential Oils, ISEO2018, 2018.
Referências adicionais: Sérvia/Inglês. Home page: [http://casopisi.junis.ni.ac.rs/index.php/FU/PhysChemTech/article/view/3926]

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) XXV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2018. (Simpósio)
Composição química e atividades biológicas de extratos de *Guadua angustifolia* Kunth.

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 10/11/2019 às 19:00:24.

ANEXO B – Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 9890091/1 - Danielle Cristina Silva de Oliveira

Email: dcsoliva@iq.usp.br
Data de Nascimento: 30/01/1991
Cédula de Identidade: RG - 493866589 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutica - Universidade Paulista - Brasil - 2017

Curso: Mestrado
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Insumos Farmacêuticos
Data de Matrícula: 15/02/2017
Início da Contagem de Prazo: 15/02/2017
Data Limite para o Depósito: 13/11/2019
Orientador: Prof(a). Dr(a). Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno - 15/02/2017 até o presente.
 Email: pmoreno@iq.usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 15/02/2017
Trancamento(s): 90 dias
 Período de 01/08/2019 até 29/10/2019
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 13/04/2018
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 15/02/2017
 Trancado em 01/08/2019

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Trancado em 01/08/2019

Impresso em: 10/11/2019 16:51:25

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9138 - 9890091/1 - Danielle Cristina Silva de Oliveira

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5704-6/5	Análise Espectrométrica de Fármacos	06/03/2017	18/06/2017	150	10	90	A	N	Concluída
FBF5710-8/3	Obtenção Racional de Insumos de Plantas Medicinais	07/03/2017	15/05/2017	90	6	95	A	N	Concluída
FBF5777-3/8	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	09/03/2017	22/06/2017	45	3	93	A	N	Concluída
FBF5779-3/1	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	10/03/2017	19/05/2017	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada
BIB5733-2/5	Tópicos em Fitoquímica I (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	15/03/2017	23/05/2017	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBF5805-2/4	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	03/08/2017	11/10/2017	90	6	100	A	N	Concluída
BMF5866-4/3	Tópicos Avançados em Farmacologia (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	09/08/2017	21/11/2017	30	2	84	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	27
Estágios:			
Total:	0	25	27

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Trancado em 01/08/2019

Impresso em: 10/11/2019 16:51:25

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 9890091/1 - Danielle Cristina Silva de Oliveira

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
2807984	Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno	IQ - USP	Presidente

Última ocorrência: Trancado em 01/08/2019

Impresso em: 10/11/2019 16:51:25

ANEXO C – Publicações

Chapter

Medicinal Properties of Bamboos

*Katarzyna B. Wróblewska, Danielle C.S. de Oliveira,
Maria Tereza Grombone-Guaratini and
Paulo Roberto H. Moreno*

Abstract

Bamboos are described as one of the most important renewable, easily obtained, and valuable of all forest resources. These plants belong to the grasses' family (*Poaceae*), which covers about a quarter of the world's plant population, within the subfamily *Bambusoideae*. The estimated diversity of bamboos in the world is approximately 1400 species, distributed in 116 genera. Bamboo species have been used in Southeast Asia, as a base material to produce paper, furniture, boats, bicycles, textiles, musical instruments, and food, and their leaves have also been used as a wrapping material to prevent food deterioration since ancient times. These species accumulate biologically active components such as polyphenols and other secondary plant metabolites that might explain the use of bamboo leaves in Asian traditional medicine for the treatment of hypertension, arteriosclerosis, cardiovascular disease, and certain forms of cancer. Besides the usual secondary metabolites, bamboo extracts may contain biologically active peptides and polysaccharides that still need to be further studied for their activity and their synergistic with other metabolites. Most of the studies found in the literature are from Asian bamboo species, and the potential of the Southern American species is yet to be explored.

Keywords: bamboo, antioxidant, antimicrobial, polyphenols, triterpenes, traditional medicine

1. Introduction

Bamboos are described as one of the most important renewable, easily obtained, and valuable of all forest resources. Bamboo species have been known and used by human kind since the beginning of civilization; its use as building materials can be traced back to the pre-ceramic period 9500 years ago, while relics from bamboo mats and baskets were dated at 3300-2800 BC [1]. In Asian countries, their leaves are used as a food wrapping material to prevent food deterioration since ancient times, besides using the culms as a construction material. In this region, bamboo leaves are described in the traditional medicine for treating hypertension, arteriosclerosis, cardiovascular disease, and certain forms of cancer. These therapeutic properties are most likely mediated by their antioxidant capacity.

These plants form a large subfamily of the grasses (*Poaceae*: *Bambusoideae*), comprising about 1662 species distributed in 121 genera. Bamboos present a large range of functional forms found over numerous biogeographic regions, including dwarf herbaceous species in temperate climates and giant tropical woody species that can reach up to 20 m height [2]. These species can adapt and propagate in

Composição química e atividades biológicas de extratos de *Guadua angustifolia* Kunth

Danielle C. S. de Oliveira¹, Maria Tereza Grombone-Guaratini², Paulo Roberto H. Moreno^{1,3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Farmácia e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil;
² Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil;
³ Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.
 Contato: pmoreno@iq.usp.br

INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com a maior biodiversidade de espécies de bambus do continente americano, contando com 254 delas distribuídas em todos os seus biomas. Dentre as espécies nativas do continente, temos os bambus gigantes, pertencentes ao gênero *Guadua* Kunth. O uso dessas espécies ainda é limitado à construção civil e engenharia de materiais. Contudo, na literatura é possível encontrar diversos estudos citando atividades biológicas de espécies de bambus asiáticos, como atividade antioxidante e antimicrobiana [1,2,3]. Neste contexto, o presente trabalho avaliou as atividades antimicrobiana e antioxidante, bem como o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides dos extratos hidroalcoólicos de folhas e colmos de *Guadua angustifolia* Kunth coletados em Tatui-SP.

Figura 1. Colmos e folhas de *G. angustifolia* coletados em Tatui, SP.

Metodologia

- Material vegetal:** As folhas e colmos de *Guadua angustifolia* Kunth foram coletados na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento (UPD) de Tatui (SP, Brasil) e identificados pelo Dr. Tarciso Figueiras do Instituto de Botânica de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil). Uma amostra testemunha foi depositada na Herbário dessa mesma instituição [Moreno 600].
- Preparo dos extratos brutos:** Os extratos foram obtidos através de extração em Soxhlet com etanol a 60%.
- Fenólicos totais:** Os compostos fenólicos totais foram quantificados por análise colorimétrica utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu e ácido gálico como padrão [4].
- Flavonoides:** A concentração de flavonoides foi determinada por análise colorimétrica utilizando-se $AlCl_3$ e quercetina como padrão [5].
- Capacidade antioxidante:** A capacidade antioxidante foi avaliada pelo método da inativação do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil [DPPH] [6].
- Atividade antimicrobiana:** A análise da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método da microdiluição como descrito por Moreno et al [7], frente aos microrganismos *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 6404), *Candida albicans* (ATCC 10231), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato bruto das folhas apresentou maior rendimento que o dos colmos, 16,4 e 10%, respectivamente. Folhas e colmos apresentaram teores semelhantes de compostos fenólicos (Figura 2), com relação aos flavonoides, o teor foi maior nas folhas (Figura 3). As folhas também apresentaram capacidade antioxidante mais intensa que os colmos (Figura 4). A atividade antimicrobiana das folhas e colmos foi avaliada na concentração de 2 mg/mL, onde somente para *P. aeruginosa* foi observado 100% de inibição do crescimento (Figura 6).

Figura 2. Teor de compostos fenólicos totais dos extratos quantificados pelo reagente de Folin-Ciocalteu.

Figura 3. Teor de flavonoides dos extratos quantificados pelo reagente $AlCl_3$.

Figura 4. Capacidade antioxidante dos extratos e padrões avaliada pelo método da inativação de DPPH.

Figura 5. Atividade antimicrobiana dos extratos avaliada pelo método da microdiluição.

CONCLUSÕES: Os resultados obtidos até o momento indicam que os extratos etanólicos de *G. angustifolia* possuem moderada capacidade antioxidante. A atividade antimicrobiana é considerada seletiva, pois os extratos somente inibem totalmente *P. aeruginosa*. Extratos vegetais são considerados ativos frente a um microrganismo apenas quando inibem totalmente seu crescimento em concentrações menores que 100 µg/mL [7]. Mais estudos são necessários para avaliar a concentração inibitória mínima dos extratos para *P. aeruginosa* bem como a sinergia desses extratos com outras substâncias.

REFERÊNCIAS

- [1] Riquenas T.S., et al. 2016. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- [2] Hu, C. et al. 2003. J Agric Food Chem. 48, 3170 – 3176.
- [3] Fujimura, M. et al. 2005. Biosci Biotechnol Biochem. 69, 642 – 645.
- [4] Ainsworth, E.A.; Gillespie, K.M. 2007. Nat Protoc. 2, 4.
- [5] Wasky, R. G.; Salafino, A., 1996. J Apic Res. 37, 2, 99 – 105.
- [6] Brand-Williams, W. et al., 1995. Lebensson Wiss Technol. 28, 25 – 30.
- [7] Moreno, P.R.H. et al., 2009. J. Essent. Oil Res. 21, 190 – 192.

49th ISEO

FACTA UNIVERSITATIS
Series: Physics, Chemistry and Technology

Vol. 16(1), 2018, p. 1
Special Issue • ISEO 2018

Chemical Composition and Antimicrobial Properties from essential oils of two *Guadua* Kunth species (Poaceae-Bambusoideae)

Paulo R. H. Moreno^{1,2*}, Danielle C. S. de Oliveira², Fabiola T. Santos², Felipe A. Nunes¹, Tomáš Bilek¹, Maria Tereza Grombone-Guaratini³

Keywords: Bamboo, essential oil, antimicrobial activity, *G. angustifolia*, *G. chacoensis*

Bamboos are described as one of the most important renewable, easily obtained, and valuable of all forest resources. Brazil is the country with the greatest diversity of bamboo species in the New World [1]. One of the most important bamboo group growing in South America belong to the *Guadua* genus, from which two species, *G. angustifolia* Kunth. and *G. chacoensis* (Rojas Acosta) Londoño & P.M. Peterson, are morphologically closely related. Due to the taxonomic difficulties presented by the *Guadua* complex, the main objective of this work is to evaluate the potential of their volatile oils for distinguishing the closely related species and to generate new potential applications for these plants. Leaves were collected at an Experimental Unit from the Agronomical Institute from Campinas (IAC) located in Tatui-SP. The oil was obtained by hydrodistillation for 4 h, and the component identification was performed by GC/MS [2]. The yields were 0.027% and 0.00079% (w/w), respectively for *G. angustifolia* and *G. chacoensis*. Terpenes are responsible for most of the composition from all sample oils, the major compounds for both *G. angustifolia* were hexahydro farnesyl acetone (23.1%) and Z-phytol (21.3%) while for *G. chacoensis* were E-β-ionone (8.75%), hexadecanoic acid (6.75%), hexadecenoic acid (6.54%), Z-phytol (5.32%) and E-α-ionone (4.98%). The antimicrobial activity was assayed by the microdilution method in microplates [2] against *Aspergillus brasiliensis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, none of the oils presented a considerable activity (MIC > 250 µg/mL), only extracts with MIC < 100 µg/mL can be considered as candidates for developing new antimicrobial agents [3].

References:

- [1] Judziewicz, E.J. et al., 2007. J. Syst. Evolut. Bot. 23, 303–314.
- [2] Moreno, P.R.H. et al., 2009. J. Essent. Oil Res. 21, 190 – 192.
- [3] Moreno, P.R.H. et al., 2013. Curr. Top. Med. Chem. 13, 3040-3078.

Acknowledgements: Financial support USP, FAPESP and CAPES.

¹Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-000, São Paulo, SP, Brasil;

²Programa de Pós-Graduação em Farmácia e Medicamentos, Universidade de São Paulo,

São Paulo, SP, Brasil; ³Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, São Paulo, Brasil.

*Corresponding author: primoreno@iq.usp.br

Available online at www.IJournalSE.org

Emerging Science Journal

Vol. 2, No. 6, December, 2018

Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Eugenia Dysenterica* DC Essential Oil

Danielle C. S. de Oliveira ^{a, b}, Telma M. Kaneko ^a, Maria Cláudia M. Young ^c,
Cynthia Murakami ^c, Inês Cordeiro ^c, Paulo Roberto H. Moreno ^{a, b*}

^aDepartment of Pharmacy, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^bInstitute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^cInstituto de Botânica, São Paulo, Brazil

Abstract

Eugenia dysenterica DC is a native species from the Cerrado biome and can be found in several states of Brazil. This study evaluated the chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities from the essential oils of a population collected in São Paulo state. Essential oils were obtained by conventional means, and their compositions were analyzed by GC-MS. Screening assays for antimicrobial activity were carried out by the microdilution method and the antioxidant potential was assessed by the DPPH scavenging method. The GC-MS analysis indicated that 52.63% of the essential oil is composed by oxygenated sesquiterpenes and the major compound is (-)-elemenol (1,3,11-trien-12-ol) (24.86%). The antimicrobial assay indicated MIC 42.1 µg/mL for *S. aureus* and MIC > 10000 µg/mL for the other tested microorganisms, Gram negative bacteria and fungi. The oil showed an IC₅₀ of 5.4±0.632 mg/mL for in the DPPH assay. The essential oil had a different chemical composition from previous studies. The essential oil did not present a potent antioxidant activity. However, it can be considered a promising antimicrobial agent against *S. aureus*.

Keywords:

Eugenia Dysenterica;
Essential Oil;
Antioxidant Activity;
Antimicrobial Activity;
GC-MS.

Article History:

Received: 18 September 2018
Accepted: 30 October 2018

1- Introduction

Myrtaceae is an important plant family in Brazil, where approximately 1000 species are found [1]. From these 211 are accounted for Cerrado biome [2]. These species are well known for its edible fruits and are also considered as a source for essential oils. Additionally, several species are traditionally used for medicinal purposes [3]. One of these Cerrado species, *Eugenia dysenterica* DC (also known as "cagaita" or "cagaiteira"), has its fruits widely consumed in this area, both *in natura* or as ingredient for jams and ice creams. The tree is also appreciated for landscaping, due to its numerous flowers, construction (wood) and tannery (barks) [4-5]. In the traditional medicine, its leaves are used to treat diarrhea and dysentery [6]. This activity was evaluated in the essential oil and ethanolic extract from the leaves. The essential oil presented antidiarrheic effect that seems to be linked with its capacity to alter the process of intestinal absorption and/or secretion [7]. The ethanolic extract decreased intestinal motility in induced diarrhea in rats. Therefore, it can be concluded that compounds present in the leaves can have a therapeutic effect in the treatment of diarrhea [8].

Another activity of leaf extract is the gastroprotective effect. Leaf extract could protect the gastric mucosa against ethanol/HCl-induced ulcer in mice and this effect seems to be related to the presence of the condensed tannins in the extract [9]. The extract also showed antiviral activity against simian rotavirus SA11 [10] and molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata*, intermediate host of schistosomiasis [11]. Besides the activities in the gastrointestinal tract, a recent study suggested that the essential oils of *E. dysenterica* leaves possess therapeutic potential in the prevention of neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's disease [12]. The whole oil was able to inhibit the

* CONTACT: Pmoreno@iq.usp.br

DOI: <http://dx.doi.org/10.28991/esj-2018-01160>

© This is an open access article under the CC-BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).