

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Química

FELIPE ALMEIDA NUNES

**Composição química e atividades biológicas de
extratos e frações de *Guadua chacoensis* (Rojas)
Londoño & P.M. Peterson**

Versão corrigida da Dissertação conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

23/03/2020

FELIPE ALMEIDA NUNES

**Composição química e atividades biológicas de
extratos e frações de *Guadua chacoensis* (Rojas)
Londoño & P.M. Peterson**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em Química*

Orientador (a): Prof (a). Dr (a). Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno

São Paulo

2020

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

N972c	Nunes, Felipe Almeida Composição química e atividades biológicas de extratos e frações de <i>Guadua chacoensis</i> (Rojas) Londoño & P.M. Peterson / Felipe Almeida Nunes. - São Paulo, 2020. 102 p.
	Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Departamento de Química Fundamental. Orientador: Moreno, Paulo Roberto Hrihorowitsch
	1. Bambu. 2. Produtos naturais. 3. Flavonoides. 4. Antioxidante. 5. Tirosinase. I. T. II. Moreno, Paulo Roberto Hrihorowitsch, orientador.

À minha amada mãe

AGRADECIMENTO(S)

Ao Professor Dr. Paulo R. H. Moreno por todo o apoio, conhecimento transmitido, paciência e compreensão durante o desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas queridas mãe e irmã, por todo o apoio emocional, amor e carinho.

Aos meus familiares e amigos por todo o carinho, admiração e palavras de encorajamento.

À Cris, Kasia, Kamilla, Danielle, Fabiana, Rafael, Paulo, Fabíola, Cynthia, Matheus, Emanoella e Letícia, por todo o conhecimento, simpatia e ajuda durante a realização deste projeto.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra colaboraram para que eu chegasse até aqui.

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo, por todo o conhecimento, suporte técnico-científico e desenvolvimento humano, e ao CNPQ e Capes, pelo financiamento deste projeto.

“A sabedoria da natureza é tal que não produz nada de supérfluo ou inútil.”

Nicolau Copérnico

RESUMO

(Nunes, F. A.) **Composição química e atividades biológicas de extratos e frações de *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P.M. Peterson.** 2020. 102 p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O Brasil é o país que possui a maior diversidade de bambus em todo o continente americano, com mais de 200 espécies catalogadas. Devido à alta resistência e durabilidade, essas espécies são muito utilizadas na construção civil e confecção de móveis e utensílios. No entanto, faltam estudos que investiguem a composição química e as atividades biológicas. Neste projeto foram avaliados extratos etanólicos de folhas e colmos de *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P.M. Peterson e frações em hexano, clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol. Também se obteve o óleo volátil, mas com um rendimento extremamente baixo (0,00079%). As frações dos extratos apresentaram teores de compostos fenólicos variando entre 1,92 e 15,80 µg EAG/mg. Esses compostos mostraram-se mais abundantes nas amostras de colmos. Em relação ao teor de flavonoides, as folhas apresentaram maior quantidade, variando entre 0,39 e 1,18 µg EQ/mg contra 0,17 a 0,34 µg EQ/mg nos colmos. Investigou-se a atividade antimicrobiana dos extratos, frações e óleo volátil frente cinco microrganismos: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Aspergillus brasiliensis*. As amostras demonstraram potencial inibitório moderado a bom contra *S. aureus* e *C. albicans*, porém fraca para as demais espécies. Testou-se a capacidade antioxidante frente o radical DPPH e os resultados indicaram atividade antioxidante significativa, especialmente as frações acetato e butanol de colmos. As folhas apresentaram EC₅₀ variando entre 67,5 e 124,0 µg/mL e os colmos entre 40,2 e 124 µg/mL. A inibição da enzima tirosinase, que está associada à produção de melanina, também se mostrou boa a uma concentração de 1 mg/mL, com o extrato bruto de colmos apresentando 43% de inibição, seguido pelas frações acetato (36%) e *n*-butanol (38%) de folhas. As análises por CG-MS detectaram pelo menos 44 compostos diferentes no óleo volátil, com vários terpenos e sesquiterpenos, e com β-ionona sendo o componente majoritário (8,75%). As amostras de colmos e folhas apontaram grande diversidade de compostos, cerca de 20 para cada fração, onde os ácidos graxos como ácido palmítico e linoleico e seus ésteres derivados foram os mais abundantes. A análise dos perfis cromatográficos por CCD e CLAE revelaram a presença de ácido *p*-cumárico nos colmos de *G. chacoensis*. Esse composto tem relevante atividade antioxidante e de inibição da tirosinase. Também foi possível identificar a quercetagina-7-O-glicosídeo, uma flavona glicosilada, com propriedades anti-inflamatórias e antidiabéticas. Desta forma, constatou-se que *G. chacoensis* apresenta grande diversidade de metabólitos secundários com atividades biológicas relevantes, como atividade antioxidante e clareadora, abrindo caminho para investigações mais profundas de suas aplicações, especialmente no segmento de cosméticos e produtos naturais.

Palavras-chave: *Guadua chacoensis*, bambu, composição química, antioxidante, tirosinase.

ABSTRACT

(Nunes, F. A.) **Chemical composition and biological activities of extracts and fractions of *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P.M. Peterson.** 2020. 102 p. Master's Thesis - Graduate Program in Chemistry. Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo.

Brazil is the country with the greatest diversity of bamboo in the entire American continent, with more than 200 species catalogued. Due to their high resistance and durability, they are widely used in home construction and manufacture of furniture and utensils. However, studies investigating chemical composition and biological activities are absent. In this project, ethanol extracts from leaves and stems of *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P.M. Peterson and fractions in hexane, chloroform, ethyl acetate and *n*-butanol were evaluated. Volatile oil was also obtained, but with an extremely low yield (0.00079%). The fractions of the extracts presented contents of phenolic compounds varying between 1.92 and 15.80 µg GAE/mg. These compounds were more abundant in culm samples. In relation to the flavonoid content, leaves showed a greater amount, varying between 0.39 and 1.18 µg QE/mg against 0.17 to 0.34 µg QE/mg in culms. The antimicrobial activity of extracts, fractions and volatile oil were investigated against five microorganisms: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Aspergillus brasiliensis*. The samples showed moderate to good inhibitory potential against *S. aureus* and *C. albicans*, but weak for the other species. The antioxidant capacity was tested against the DPPH radical and the results indicated significant antioxidant activity, especially acetate and butanol culm fractions. The leaves presented EC₅₀ varying between 67.5 and 124.0 µg/mL and culms between 40.2 and 124 µg/mL. The inhibition of the enzyme tyrosinase, which is associated with the production of melanin, was also shown to be good at a concentration of 1 mg/mL, with the raw culm extract showing 43% inhibition, followed by acetate (36%) and *n*-butanol (38%) fractions of leaves. CG-MS analysis detected at least 44 different compounds in volatile oil, with several terpenes and sesquiterpenes, and with β-ionone being the major component (8.75%). Culm and leaf samples showed great diversity of compounds, about 20 for each fraction, where fatty acids such as palmitic and linoleic acid and their derivative esters were the most abundant. The analysis of the chromatographic profiles by TLC and HPLC revealed the presence of *p*-coumaric acid in culms of *G. chacoensis*. This compound has relevant antioxidant and tyrosinase inhibiting activity. It was also possible to identify quercetagine-7-*O*-glucoside, a glycosylated flavone, with anti-inflammatory and anti-diabetic properties. Thus, it was found that *G. chacoensis* presents a great diversity of secondary metabolites with relevant biological activities, such as antioxidant and whitening activity, opening ways for deeper investigations of its applications, especially in the segment of cosmetics and natural products.

Keywords: *Guadua chacoensis*, bamboo, chemical composition, antioxidant, tyrosinase.

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Rendimento de extração	34
Equação 2: Cálculo da capacidade antioxidante	39
Equação 3: Fator de retenção, Rf	41
Equação 4. Índice aritmético (IA) empregado nos cálculos.	42
Equação 5. Cálculo de crescimento microbiano.....	46
Equação 6. Cálculo de porcentagem de inibição microbiana.	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ácidos fenólicos comumente encontrados em bambus.....	20
Figura 2. Flavonoides comumente encontrados em bambus.	21
Figura 3. Fotos de <i>Guadua chacoensis</i> (Rojas) Londoño e Peterson.....	27
Figura 4. Ilustração de <i>Guadua chacoensis</i> (Rojas) Londoño e Peterson. (LONDOÑO e PETERSON, 1992).....	27
Figura 5. Distribuição geográfica de <i>Guadua chacoensis</i> no território brasileiro.....	28
Figura 6. Formas radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH.....	38
Figura 7. Estrutura molecular dos quatro compostos majoritários do óleo volátil de <i>Guadua chacoensis</i>	52
Figura 8. Comparativo de rendimento, em porcentagem, da extração de folhas e colmos de espécies de bambus americanos. (WROBLEWSKA, 2019).....	54
Figura 9. Rendimento, em porcentagem, das frações de folhas e colmos de <i>Guadua chacoensis</i>	55
Figura 10. Curva de calibração de ácido gálico para a quantificação de compostos fenólicos presentes em extratos brutos e frações de <i>Guadua chacoensis</i> pelo método com reagente de Folin-Ciocalteu.....	56
Figura 11. Teor de compostos fenólicos de <i>Guadua chacoensis</i> nos extratos brutos de folhas e colmos e nas respectivas frações em hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol pelo método com reagente de Folin-Ciocalteu.....	57
Figura 12. Curva de calibração de quercetina para a quantificação de flavonoides presentes em extratos brutos e frações de <i>Guadua chacoensis</i> determinado pelo método espectrofotométrico com $AlCl_3$	59
Figura 13. Teor de flavonoides de <i>Guadua chacoensis</i> determinado pelo método espectrofotométrico com $AlCl_3$ nos extratos brutos de folhas, colmos, nas respectivas frações em clorofórmio, acetato de etila e n-butanol, acompanhados dos erros padrão.....	60
Figura 14. Potencial antioxidante das amostras de <i>Guadua chacoensis</i> determinado pelo método espectrofotométrico de sequestro do radical livre DPPH acompanhado dos respectivos erros padrão.	63
Figura 15. Cromatoplaça das frações clorofórmio e acetato de etila de folhas e colmos de <i>Guadua chacoensis</i> dissolvidas em metanol. Sistema de eluição: clorofórmio:metanol (9:1, v/v). Visualização: luz UV 254 nm (A), 366 nm (B), após revelação com reagente NP/PEG.66	
Figura 16. Cromatoplaça das frações n-butanol de <i>Guadua chacoensis</i> dissolvidas em metanol. Sistema de eluição: clorofórmio:metanol (9:1, v/v). Visualização: luz UV 254 nm (A), 366 nm (B), após revelação com reagente NP/PEG.	67
Figura 17. Cromatoplaça dos extratos brutos de folhas e colmos e respectivas frações acetato de <i>Guadua chacoensis</i> dissolvidas em metanol. Sistema de eluição: clorofórmio:metanol (9:1, v/v). Visualização: luz UV 254 nm (A), 366 nm (B), após revelação com reagente NP/PEG.68	
Figura 18. Cromatograma da fração hexano de folhas de <i>Guadua chacoensis</i> obtido por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.....	69
Figura 19. Cromatograma da fração clorofórmio de folhas de <i>Guadua chacoensis</i> obtido por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.....	71
Figura 20. Cromatograma da fração acetato de folhas de <i>Guadua chacoensis</i> obtido por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.....	73
Figura 21. Cromatograma da fração hexano de colmos de <i>Guadua chacoensis</i> obtido por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.....	75
Figura 22. Cromatograma da fração clorofórmio de colmos de <i>Guadua chacoensis</i> obtido por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.....	77

Figura 23. Cromatograma da fração acetato de colmos de <i>Guadua chacoensis</i> obtido por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.....	79
Figura 24. Cromatogramas obtidos para a fração acetato de etila de colmos de <i>Guadua chacoensis</i> através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa C18 em 254, 280 e 325 nm.....	82
Figura 25. Espectro de absorção na região UV e tempo de retenção do composto majoritário de <i>Guadua chacoensis</i> registrado nos cromatogramas em 280 e 325 nm para a fração acetato de etila de colmos através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa	83
Figura 26. Espectro de absorção na região UV e tempo de retenção do ácido <i>p</i> -cumárico.	83
Figura 27. Cromatogramas obtidos para a fração <i>n</i> -butanol de folhas de <i>Guadua chacoensis</i> através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa C18 em 280 e 325 nm.	85
Figura 28. Espectro de absorção na região UV e tempo de retenção de um dos compostos majoritários de <i>Guadua chacoensis</i> registrado nos cromatogramas em 280 e 325 nm para a fração <i>n</i> -butanol de folhas através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa C18.....	86
Figura 29. Espectro de absorção na região UV e tempo de retenção da quercetagetina-7-O-glicosídeo.	86
Figura 30. Microplaca de crescimento de <i>A. brasiliensis</i> .	87
Figura 31. Porcentagem de inibição do crescimento microbiano dos extratos brutos e frações de folhas e colmos de <i>G. chacoensis</i> [0,1 mg/mL] frente a cinco microrganismos: <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027), <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538), <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) e <i>Aspergillus brasiliensis</i> (ATCC 16404) [$\sim 2 \cdot 10^2$ UFC/mL]. O óleo volátil [0,5 mg/mL] foi testado frente a <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. albicans</i>	88
Figura 32. Porcentagem de inibição da tirosinase de cogumelos pelos extratos brutos de folhas, colmos, nas respectivas frações em clorofórmio, acetato de etila e <i>n</i> -butanol de <i>Guadua chacoensis</i> utilizando <i>L</i> -Dopa como substrato.....	91
Figura 33. Estrutura da <i>L</i> -tirosina (A) e ácido <i>p</i> -cumárico (B).....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistemas de eluição e padrões utilizados com as frações e extratos brutos na CCD.	40
Tabela 2. Gradiente de eluição CLAE das frações acetato de etila e <i>n</i> -butanol de colmos e folhas, partindo de uma solução aquosa de ácido acético 0,1%.	43
Tabela 3. Componentes identificados do óleo volátil de <i>Guadua chacoensis</i>	51
Tabela 4. Rendimento da obtenção de extrato bruto de folhas e colmos de <i>Guadua chacoensis</i>	53
Tabela 5. Rendimento das frações de folhas e colmos de <i>Guadua chacoensis</i>	55
Tabela 6. Teor de compostos fenólicos (em µg EAG/mg) em amostras de <i>Guadua chacoensis</i> determinado pelo método com reagente de Folin-Ciocalteu, acompanhado dos respectivos erros padrão	58
Tabela 7. Teor de flavonoides em amostras de <i>Guadua chacoensis</i> (em µg EQ/mg) determinado pelo método espectrofotométrico com AlCl ₃ , acompanhado dos respectivos erros padrão	61
Tabela 8. Potencial antioxidante das amostras de <i>Guadua chacoensis</i> determinado pelo método espectrofotométrico de sequestro do radical livre DPPH, acompanhado dos respectivos erros padrão.	62
Tabela 9. Composição química da fração hexano de folhas de <i>Guadua chacoensis</i> por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.	70
Tabela 10. Composição química da fração clorofórmio de folhas de <i>Guadua chacoensis</i> por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.	72
Tabela 11. Composição química da fração acetato de folhas de <i>Guadua chacoensis</i> por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.	73
Tabela 12. Composição química da fração hexano de colmos de <i>Guadua chacoensis</i> por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.	75
Tabela 13. Composição química da fração clorofórmio de colmos de <i>Guadua chacoensis</i> por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.	77
Tabela 14. Composição química da fração acetato de colmos de <i>Guadua chacoensis</i> por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.	79
Tabela 15. Porcentagem de inibição da tirosinase de cogumelos em amostras de <i>Guadua chacoensis</i> acompanhada dos respectivos erros padrão e utilizando <i>L</i> -Dopa como substrato	92

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Bambus na Antiguidade.....	15
1.2 Aspectos Gerais e Botânicos.....	16
1.3 Atividades Biológicas.....	18
1.4 Bambus no Brasil.....	24
1.5 <i>Guadua</i> Kunth.....	25
1.6 <i>Guadua chacoensis</i> (Rojas) Londoño & P.M. Peterson.....	26
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral.....	30
2.2 Objetivos Específicos.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Coleta de Material Vegetal.....	32
3.2 Reagentes	32
3.3 Extração do Óleo Volátil	33
3.4 Obtenção dos Extratos Brutos	33
3.5 Fracionamento dos Extratos Brutos.....	34
3.6 Quantificação de Compostos Fenólicos Totais.....	35
3.7 Quantificação de Flavonoides.....	37
3.8 Capacidade Antioxidante	38
3.9 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)	40
3.10 Cromatografia a Gás Acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)	41
3.11 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	42
3.12 Atividade Antimicrobiana	43
3.13 Atividade Antitirosinase.....	46
3.14 Análise Estatística.....	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 Análise do Óleo Volátil.....	50
4.2 Obtenção dos Extratos Brutos	53
4.3 Fracionamento dos Extratos Brutos.....	54
4.4 Quantificação de Compostos Fenólicos Totais.....	56
4.5 Quantificação de Flavonoides.....	59
4.6 Capacidade Antioxidante	62

4.7 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)	65
4.8 Cromatografia a Gás Acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM).....	68
4.9 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	80
4.10 Atividade Antimicrobiana	86
4.11 Atividade Antitirosinase.....	90
5. CONCLUSÕES.....	94
6. REFERÊNCIAS	96

1. INTRODUÇÃO

1.1 Bambus na Antiguidade

Desde os tempos antigos, produtos naturais obtidos a partir de plantas e animais foram a fonte de inúmeras preparações medicinais. Os seres vivos evoluíram através dos tempos produzindo uma infinidade de metabólitos que puderam ser utilizados pela humanidade para os mais diversos fins (GANESAN, 2008). Baseado em observações empíricas e no conhecimento popular repassado de geração a geração, extratos de produtos naturais foram os primeiros, e por muito tempo os únicos, medicamentos disponíveis para tratar doenças e enfermidades

O bambu é conhecido e utilizado no Oriente há milênios para os mais diversos fins: como alimento, em estruturas de casas, paredes, telhados, confecção de mobiliário, utensílios de cozinha, objetos de decoração, portas, janelas, cercas, pontes, embarcações, entre outras. (DRUMOND e WIEDMAN, 2017). As aplicações medicinais de bambu foram mencionadas pela primeira vez na Índia, há cerca de 10.000 anos, para a preparação do Chyawanprash, um tônico para a saúde preparado a partir de várias ervas, incluindo o maná de bambu, algo semelhante a um sal de origem vegetal, produzido a partir da exsudação de certas espécies, com o intuito de proporcionar juventude, beleza e longevidade (NIRMALAA *et al.*, 2018).

Em alguns países asiáticos, as folhas de bambu eram utilizadas para embalar alimentos e dessa forma prevenir sua deterioração. Na medicina tradicional, a planta é utilizada para tratar hipertensão, febre, doenças cardiovasculares, além de certos tipos de câncer (YANG *et al.*, 2017). Na Coreia do Sul, o sal de bambu, um cozido de sal marinho e colmos de bambu, é utilizado na cozinha tradicional e na medicina como

agente antioxidante de efeitos anti-inflamatórios e antienvelhecimento (ZHAOA *et al.*, 2018). Além disso, o vinagre de bambu, um pirolisado derivado de colmos, apresentou atividades antimicrobianas e antifúngicas (FUJIMURA *et al.*, 2005).

Na América do Sul, sítios arqueológicos no Equador mostram que o bambu começou a ser usado há cerca de 5 mil anos pelos indígenas (DRUMOND e WIEDMAN, 2017). Em países como Colômbia e Costa Rica, o vegetal é empregado na construção de pontes, praças de pedágio, paradas de ônibus e em programas governamentais de habitações sustentáveis resistentes a abalos sísmicos. (NOIA, 2012). A durabilidade ao longo dos anos também é notória, uma vez que estruturas de bambu podem ser vistas em construções centenárias desde os tempos coloniais.

1.2 Aspectos Gerais e Botânicos

Acredita-se que as espécies de bambu sejam originárias da China Central, entretanto, são encontradas em muitas regiões temperadas e tropicais do mundo (HONG *et al.*, 2010). Pertencendo à família das gramíneas perenes (Poaceae) e subfamília Bambusoideae, os bambus são encontrados em todos os continentes, exceto Europa e Antártica. Até a presente data 1670 espécies distribuídas em 125 gêneros foram catalogadas e agrupadas em três tribos: Arundinarieae, bambus lenhosos de clima temperado, Bambuseae, bambus lenhosos de clima tropical, e Olyreae, bambus herbáceos (SORENG *et al.*, 2017). A tribo Bambuseae inclui 966 espécies em 73 gêneros, distribuídos em 11 subtribos. Uma delas, Guaduiniae, é composta por 53 espécies agrupadas em cinco gêneros, os quais se distribuem pelo hemisfério ocidental, nas Américas do Sul e Central, México e ilhas caribenhas (Bahamas e Antilhas). Apesar da tribo Bambuseae ser comumente encontrada em

associação com florestas de planície, ou formar florestas extensivas dominadas por bambus, uma proporção significativa de suas espécies é encontrada em florestas montanhosas ou campos de altitude (CLARK, LONDOÑO e RUIZ-SANCHEZ, 2015).

Os bambus herbáceos (Olyreae) são caracterizados por brotos mais curtos e com menor lignificação, ramificação menos vegetativa, flores unissexuais e padrões de flores anuais ou sazonais. (WYSOCKI *et al.*, 2015). Os bambus lenhosos (Arundinarieae e Bambuseae) compartilham sistemas de rizoma bem desenvolvidos, colmos altamente lignificados, folhas de colmo bem diferenciadas das folhas dos ramos, com ramificação aérea, bem desenvolvida e muitas vezes complexa (CLARK, LONDOÑO e RUIZ-SANCHEZ, 2015). Esses bambus, alguns dos quais podem crescer rapidamente até atingir 45 m de altura, servem como fonte econômica importante para materiais de construção e outros produtos culturais na América Central e do Sul, Ásia, África e Austrália. Seu potencial para estabelecimento rápido, combinado com uma extensa reprodução vegetativa, faz com que os bambus também sejam importantes do ponto de vista ecológico, especialmente como sequestradores de carbono atmosférico. (WYSOCKI *et al.*, 2015).

Segundo um estudo feito em 2005 pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e a Rede Internacional para Bambus e Rattan (INBAR), 16 países asiáticos reportaram um total de 24 milhões de hectares de solo ocupado por bambus distribuídos em florestas exclusivas de bambus, florestas onde estavam disseminados entre outras espécies, sendo ou não a vegetação predominante, e em regiões como fazendas e terras de cultivo. Na África cinco países apresentaram um total de 2,8 milhões de hectares e na América Latina, 10 países reportaram a presença de mais de 10 milhões de hectares em recursos florestais de

bambu (LOBOVIKOV *et al.*, 2005). Apesar da importância mundial, dados estatísticos de uso global sobre recursos, produção e comércio ainda permanecem escassos e inconsistentes. A falta de dados confiáveis e compreensíveis sobre a utilização dos bambus dificulta seu desenvolvimento sustentável e limita seu potencial para a redução da pobreza e melhora da saúde pública (LOBOVIKOV *et al.*, 2005).

1.3 Atividades Biológicas

Até o início do século passado, mais de 80% dos fármacos utilizados para tratamento de doenças e enfermidades advinham de produtos naturais ou eram inspirados em um composto natural. Apesar disso, é provável que a grande maioria das espécies de plantas não tenha sido sistematicamente investigada apropriadamente para a descoberta de novos fármacos (INBAR, 2010).

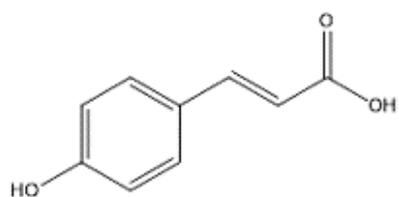
Os metabólitos secundários, grandes responsáveis por muitas das atividades biológicas nos organismos, costumam estar associados a mecanismos de defesa contra patógenos e agentes externos como herbívoros, comunicação com outros organismos (plantas e micro-organismos) ou proteção contra estresse oxidativo (radiação ultravioleta) (ZAYNAB *et al.*, 2018).

Na Ásia, a indústria de bambu já é bem desenvolvida e atuante, com grande destaque para a investigação das atividades biológicas. No entanto, essa indústria caminha a passos lentos na África e América. A atividade antioxidante é a que recebe maior destaque e com a maior quantidade de estudos na literatura. A presença de ácidos fenólicos e flavonoides já foi associada à atividade anti-inflamatória, antidiabética, neuroprotetora, hepatoprotetora e prebiótica, as quais foram

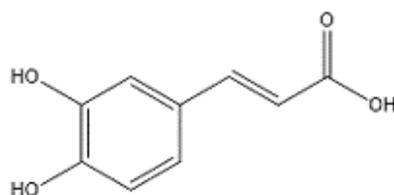
relacionadas com a presença de polissacarídeos específicos (CHEN *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2018; DING *et al.*, 1998). A atividade neuroprotetora foi relacionada com a presença de derivados lignofenólicos, compostos altamente ativos presentes na lignina de *Phyllostachys bambusoides* Siebold & Zucc. Um desses derivados, lignocresol carboximetilado, demonstrou atividade antiapoptótica entre 50-100%, apresentando a maior efetividade dentre todas as espécies pesquisadas (AKAO *et al.*, 2004).

Na China, o antioxidante de folhas de bambu (AOB, *antioxidant of bamboo*, em inglês), um extrato rico em flavonoides, lactonas e ácidos fenólicos, tem autorização do Ministério da Saúde para a comercialização como aditivo em alimentos, laticínios, produtos à base de carne e óleos. Dentre seus principais componentes funcionais estão flavonoides como orientina, iso-orientina, vitexina e isovitexina, lactonas e ácidos fenólicos (Figuras 1 e 2) (ZHANG *et al.*, 2005).

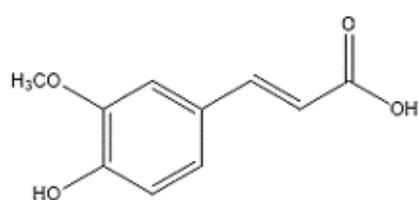
Figura 1. Ácidos fenólicos comumente encontrados em bambus.



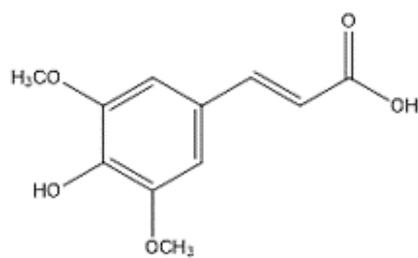
ácido p-cumárico



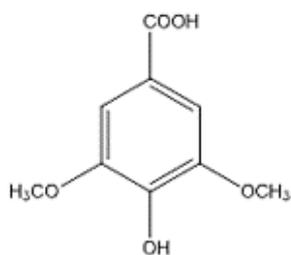
ácido cafeico



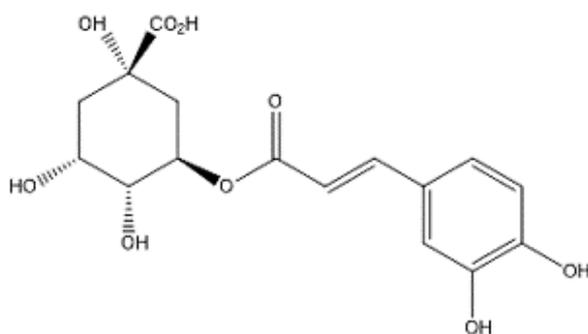
ácido ferúlico



ácido sinápico

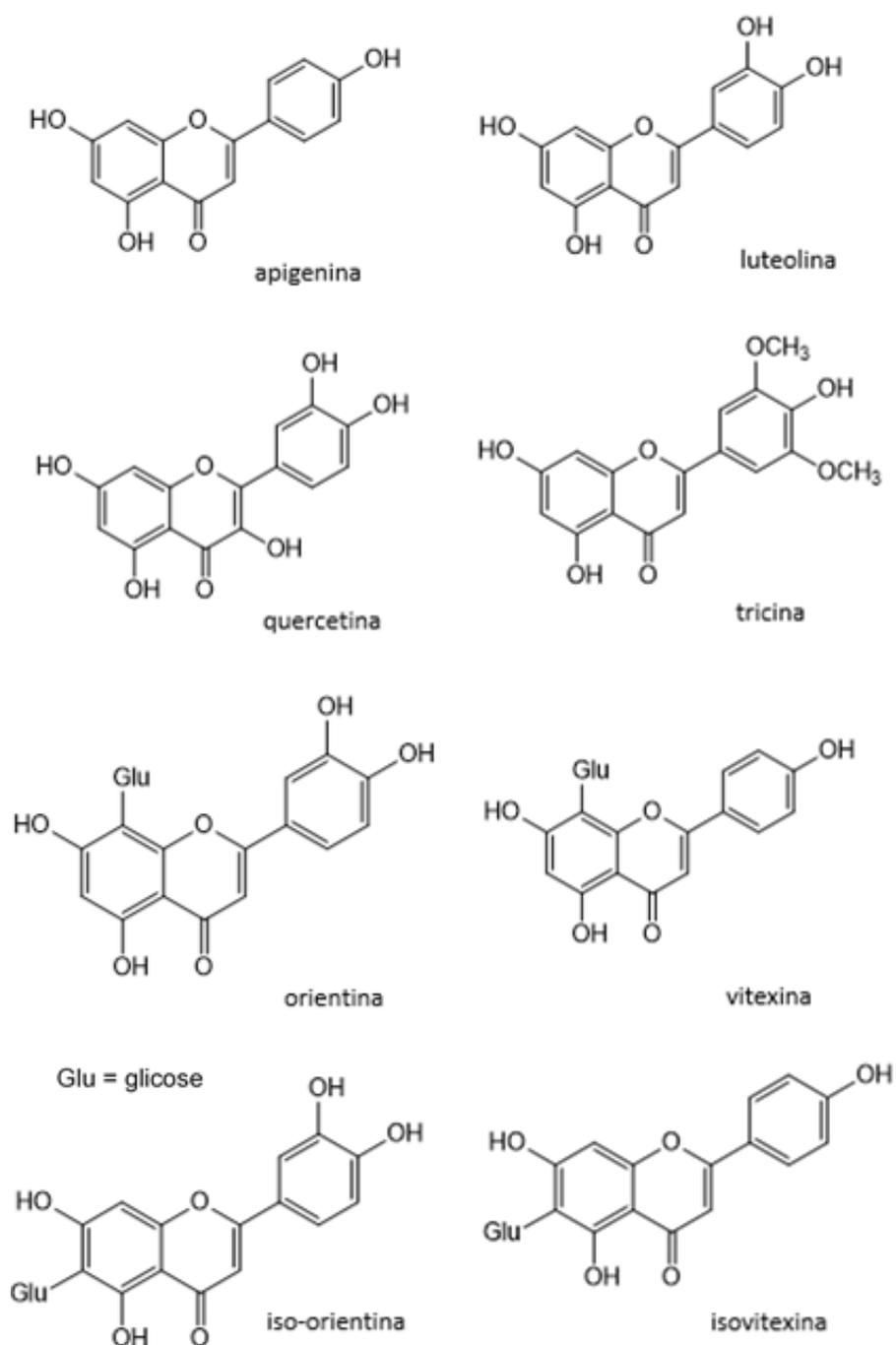


ácido siríngico



ácido clorogênico

Figura 2. Flavonoides comumente encontrados em bambus.



Fonte: adaptado de (WROBLEWSKA, 2019)

Os bambus são reconhecidos por acumularem compostos fenólicos, com características comuns a outras espécies de gramíneas. Muitos desses compostos

encontram-se ligados a uma ou mais moléculas de açúcar (glicídeos), formando o que é chamado de glicosídeo, cuja parte glicídica é denominada glicona e a parte não glicídica, aglicona. Diversas flavonas, classe de flavonoides, são glicosiladas. Em muitas espécies de gramíneas como milho, trigo e arroz (BRAZIER-HICKS *et al.*, 2009), a maioria dos glicosídeos estão conjugados com a flavona via uma ligação C-glicosídica, assim como nos bambus.

No extrato das aparas de colmos, EBS (*extract of bamboo shavings*, em inglês), o qual é obtido da camada intermediária dos colmos, da espécie *Bambusa tuldoides* Munro foram identificados os triterpenoides friedelina, lupeol, lupenona, assim como, α -amirina e β -amirina. Este extrato foi responsável por aumentar a resistência de ratos em provas de natação e os resultados demonstraram uma atividade antifadiga atribuída aos triterpenoides presente no extrato (ZHANG *et al.*, 2006). No EBS de *P. nigra* var. *henonis* foi identificado um total de 73,6% de triterpenoides, dentre eles friedelina, friedelanol, lupenona e lupeol (ZHANG *et al.*, 2004). As atividades antimicrobiana, antifúngica e antiparasitária desta espécie foram atribuídas à presença de derivados de benzoquinona (NISHINA e UCHIBORI, 1991) ou sesquiterpenos (TAO *et al.*, 2018). Além disso, ao compostos fenólicos extraídos de bambus também foram atribuídas atividades anti-inflamatória, antiulcerogênica e antitumoral (WEDLER *et al.*, 2014), anti-hipertensiva (PARK e JHON, 2010), hipomelanogênica (CHOI *et al.*, 2018) e anticonvulsivante (ZHANG *et al.*, 2018). Alguns pesquisadores também relataram atividade antibacteriana do carvão de bambu (YANG *et al.*, 2012) e do vinagre de bambu, produzido da pirólise de colmos da espécie *Gigantochloa scortechinii* Gamble ((SULAIMAN *et al.*, 2005)

Bambus de origem asiática também apresentaram resultados relevantes em relação à capacidade de inibição da enzima tirosinase, uma enzima contendo cobre que está presente em células denominadas melanócitos em animais, plantas e fungos e que catalisa a produção de melanina e outros pigmentos a partir da oxidação da tirosina (HUH *et al.*, 2014). A tirosinase é a responsável pelo escurecimento de vegetais e da pele de animais. Desta forma, a indústria cosmética direciona esforços e pesquisa em inibidores da enzima para tratar de desordens da pele como a hiperpigmentação. Extratos etanólicos de *Gigantochloa ligulata* Gamble e *Schizotachyum zollingeri* Steud. apresentaram inibição quase total da enzima na concentração de 1,0 mg/mL (ILHAM *et al.*, 2008). Já os extratos de *P. bambusoides* a 5,0 mg/mL reduziram significativamente o processo de melanogênese em testes *in vitro* em melanócitos humanos (HUH *et al.*, 2014).

O estresse oxidativo ao qual estamos expostos diariamente principalmente por radiação UV e poluentes atmosféricos também desperta o interesse acadêmico e da indústria para a neutralização dos radicais livres gerados nesse processo, que entre outros danos causam o aparecimento de rugas, fotoenvelhecimento, pele seca ou alterações de cor e textura da pele, inclusive o surgimento de carcinomas e melanomas. Antioxidantes tópicos figuram, então, como uma solução para impedir que essas reações em cadeia se propaguem, pois eles próprios sofrendo oxidação eliminam esses radicais livres e dessa forma protegem a pele do estresse oxidativo. (IDHA e GUNAWAN, 2013). A espécie *Phyllostachys nigra* Munro var. *henonis* Stapf. apresentou uma atividade antioxidante e sequestradora potente do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), atividade esta atribuída à presença de ácido clorogênico, ácido cafeico e luteolina-7-glicosídeo (HU, ZHANG e KITTS, 2000).

A quercetina em particular está quase sempre presente em quantidades substanciais nos tecidos de plantas. É um poderoso antioxidante, quelante de metais, com a capacidade de neutralizar radicais e prevenir a oxidação de lipoproteínas. Outros flavonoides encontrados no vinho tinto como canferol e antocianidinas, e em chás, como catequinas e ésteres de catequina galato também se mostraram como antioxidantes eficazes (DEWICK, 2009).

1.4 Bambus no Brasil

O Brasil é um dos países com a maior diversidade de bambu nas Américas com 34 gêneros e 232 espécies (FILGUEIRAS e SANTOS-GONÇALVES, 2004), distribuídas entre a Mata Atlântica, Cerrado e Amazônia (Flora do Brasil 2020, 2016).

Por aqui os bambus são primariamente utilizados para a construção civil, devido à sua grande resistência mecânica e baixo custo, como, por exemplo, na construção de habitações para populações carentes, além de ser empregado na fabricação de móveis e utensílios. No entanto, o potencial dessa gramínea se mantém subaproveitado devido à resistência cultural de aceitar o bambu como material durável e confiável, além da ideia errônea de associá-lo a obras temporárias ou miséria, diminuindo dessa forma o interesse para investigação científica e tecnológica (BERALDO e AZZINI, 2004)

No sudoeste da Amazônia encontra-se uma das maiores reservas de bambu nativo, com uma área de mais de 180.000 km² (JUDZIEWICZ *et al.*, 1999), compondo uma oportunidade econômica valiosa e pouco explorada. De acordo com o INBAR, o

país possui uma área total de bambuzais que pode chegar a oito milhões de hectares (INBAR, 2010).

Apesar da diversidade de estudos sobre composição química e atividade biológica de tantas espécies asiáticas de bambus, a pesquisa nessa área no Brasil ainda é incipiente, com poucos artigos a respeito.

1.5 *Guadua* Kunth

Guadua pertence a Guaduinae Soderstr. e R. P. Ellis, uma subtribo monofilética, apoiada por dados moleculares e micromorfológicos. (LIZARAZU, AGRASAR e VEGA, 2013). A classificação mais recente dessa subtribo indica que Guaduinae compreende 53 espécies distribuídas em cinco gêneros: *Apoclada* McClure com uma espécie, *Eremocaulon* Soderstr. & Londoño com quatro espécies, *Guadua* Kunth com 32 espécies, *Olmecca* Soderstr., com cinco espécies, e *Otatea* (McClure & E. W. Sm.) Calderón & Soderstr., com oito espécies (CLARK, LONDOÑO e RUIZ-SANCHEZ, 2015). As espécies da subtribo Guaduinae são encontradas do México ao Uruguai e Argentina (JUDZIEWICZ *et al.*, 1999), (CLARK, LONDOÑO e RUIZ-SANCHEZ, 2015). O Brasil possui a maior diversidade de espécies dessa subtribo, com 21 espécies descritas em três gêneros (*Apoclada*, *Eremocaulon* e *Guadua*) (Flora do Brasil 2020, 2016), seguido pelo México, com 20 espécies com o mesmo número de gêneros (*Guadua*, *Olmecca* e *Otatea*).

Guadua é um gênero considerado promissor, tanto do ponto de vista de propriedades físicas quanto de composição química. O gênero ocorre em toda a América tropical, do México ao Brasil e norte da Argentina (LONDOÑO e PETERSON,

1992). As espécies deste gênero apresentam grande importância na América, estando intimamente ligadas com o desenvolvimento econômico de algumas regiões colombianas.

Devido à alta resistência mecânica, durabilidade, facilidade de manuseio como material de construção e substituto da madeira, as espécies deste gênero vieram a ser chamadas de aço vegetal. Seu crescimento é rápido comparado com outros tipos de madeira utilizadas na construção. Isso quer dizer que em cinco anos essas espécies alcançam a altura de 30 metros, diferentemente de árvores comuns, que necessitam mais de 15 a 20 anos para atingir a mesma altura. O gênero *Guadua* é fonte de material sustentável e renovável para estruturas resistentes a terremotos (PEREA-RIVAS *et al.*, 2003). A espécie *Guadua angustifolia* Kunth é considerada uma das 20 espécies mais importantes de bambu em todo o mundo, devido às suas propriedades mecânicas e físicas, incluindo sua grande flexibilidade para edifícios resistentes a terremotos, (LIZARAZU, AGRASAR e VEGA, 2013).

1.6 *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P.M. Peterson

Guadua chacoensis (Rojas) Londoño & P.M. Peterson (Figuras 3 e 4) é uma espécie nativa do Brasil, que também ocorre no norte da Argentina, sudeste da Bolívia, sul do Paraguai e norte do Uruguai (LONDOÑO e PETERSON, 1992). No passado, era erroneamente confundida com *G. angustifolia* Kunth.

Figura 3. Fotos de *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño e Peterson



Fonte: adaptado de (Apuama, 2018)

Figura 4. Ilustração de *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño e Peterson. (LONDOÑO e PETERSON, 1992) - A. Ramo de floração; B. Complemento de folhas; C. Lígula da folha; D. Bainha de colmo; E. Detalhe da lígula da bainha do colmo, vista adaxial; F. Complemento de galho.



A espécie foi descrita pela primeira vez em 1918 pelo botânico argentino Nicolas Rojas Acosta como *Bambusa chacoensis*, a qual era conhecida popularmente

sob o nome de "tacuara", distinguindo-a de duas outras espécies que ocorrem na mesa região, *G. paraguayana* Doell, conhecida como "picanilla" e *Guadua trinii* (Nees) Ruprecht, conhecida como "yatevo", "tacuaruzu" ou "tacuara brava" (NICORA e RÚGOLO DE AGRASAR, 1987; YOUNG, 1985). McClure (1973) chegou a incluir *G. chacoensis* como táxon de status específico não resolvido em sua lista de espécies catalogadas. Young (1985), por outro lado, tratou esta espécie como uma das duas subespécies no complexo variável *Guadua angustifolia* Kunth e indicou um novo tipo. No entanto, o autor apontou que as duas subespécies poderiam ser separadas usando uma combinação de características vegetativas e reprodutivas (LONDOÑO e PETERSON, 1992).

Em território brasileiro existem ocorrências confirmadas nas regiões Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul), Sudeste (São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) (Flora do Brasil 2020, 2016) em áreas de Mata Atlântica, onde ocorre em florestas de galeria, geralmente ao longo das margens de riachos e rios, em elevações de 75 a 450 m (Figura 5).

Figura 5. Distribuição geográfica de *Guadua chacoensis* no território brasileiro.



Fonte: (Flora do Brasil 2020, 2016)

Em relação à reprodução, *Guadua chacoensis* tem um ciclo de floração de aproximadamente 31 anos (GUERREIRO, 2014), podendo florescer ininterruptamente por pelo menos três anos (LONDOÑO e PETERSON, 1992). Os frutos caem no chão, germinam e crescem sob as plantas-mãe, resultando em uma taxa de sobrevivência das sementes maior que de outras espécies do gênero. *G. angustifolia*, por exemplo, apresenta taxa estimada em menos de 1%. No clima correto, as espécies de *Guadua* podem crescer até 11 centímetros por dia e atingir a altura máxima de 30 m em 6 meses.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Devido à falta de estudos sobre as espécies de bambus americanos, o objetivo principal deste trabalho é investigar a composição química de extratos e frações de *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P.M. Peterson e avaliar seu potencial antimicrobiano, antioxidante e inibidor de tirosinase

2.2 Objetivos Específicos

- Obter extratos brutos de folhas e colmos de *G. chacoensis* e fracionar esses extratos em solventes de diferentes polaridades, a saber: hexano, clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol;
- Analisar a composição química dos extratos brutos e frações por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Quantificar o teor de compostos fenólicos e flavonoides presentes nos extratos brutos e frações;
- Determinar a capacidade antioxidante dos extratos brutos e frações utilizando ensaios qualitativos e quantitativos de supressão do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH);
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos e frações pelo teste de microdiluição frente a culturas de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos;

- Avaliar atividade inibitória da enzima tirosinase, visando aplicação em formulações cosméticas para o tratamento de hiperpigmentação cutânea.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta de Material Vegetal

As folhas e colmos de *Guadua chacoensis* foram coletados no dia 11 de abril de 2017 na Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento (UPD) de Tatuí, SP (23°17'16,7" S e 47°54'0,4" O) vinculada à Agência Paulista de Tecnologia de Agronegócios (APTA) da Secretaria de Agricultura e Abastecimento. O material vegetal recolhido foi, então, identificado taxonomicamente e confirmado pelo Dr. Tarcisio Filgueiras do Instituto de Botânica de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil). Uma espécie testemunha foi depositada no Herbário dessa mesma instituição sob o número MORENO 603.

3.2 Reagentes

Para a extração de componentes do material vegetal utilizou-se etanol 98% (v/v) da marca Synth®. Toda água destilada usada na parte experimental foi obtida através de osmose reversa (OS10XLE, GEHAKA). Os solventes utilizados no fracionamento dos extratos de colmos e folhas – hexano, clorofórmio, acetato de etila, *n*-butanol – também foram obtidos da Synth®. O sulfato de sódio anidro grau P.A. foi fornecido por J.T. Baker. Para os ensaios cromatográficos utilizou-se éter etílico da LS Chemicals. Acetona, ácido fórmico, clorofórmio, tetraidrofurano e tolueno da Merck. Os padrões de flavonoides e a enzima tirosinase foram adquiridos da Sigma Aldrich®. O metanol utilizado para dissolução das amostras de ensaios químicos e biológicos foi da marca Synth®. Os reagentes 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), Folin-Ciocalteu e Natural Product Polyethylene Glycol Reagent (NP-PEG) também foram da Sigma Aldrich®. O cloreto de alumínio utilizado no teste de teor de

flavonoides foi da marca Merck e o carbonato de sódio no teste de fenólicos da marca J.T. Baker.

3.3 Extração do Óleo Volátil

O óleo volátil 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 hidrodestilação em aparelho de Clevenger (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Em balão de fundo redondo com capacidade de 3 L, foram acondicionadas as folhas e água destilada (1,5 L). Após 3 horas de extração, o óleo volátil foi recolhido do frasco florentino do equipamento com auxílio de éter etílico, a fim de se retirar alguma porção de óleo que tenha ficado retida em seu interior. Em seguida, foi secado sobre sulfato de sódio anidro. O solvente proveniente da lavagem do equipamento foi eliminado em evaporador rotatório (BÜCHI Rotavapor R-124) a pressão reduzida em temperatura ambiente. Esse processo foi repetido três vezes utilizando-se um total de 201,38 g de folhas. Finalmente, o óleo foi pesado para determinação do rendimento e armazenado em freezer (-25°C) até sua utilização nas análises.

3.4 Obtenção dos Extratos Brutos

O material vegetal foi seco à sombra por aproximadamente 30 dias, separado em folhas ou colmos, incluindo os galhos, e submetido a secagem em estufa de circulação de ar forçada à temperatura de 40° C. Após a secagem, o material foi triturado em moinho de facas (TECNAL TE-580) até a obtenção de um pó fino. A

extração foi realizada com aparelhagem Soxhlet e etanol 60% (v/v) três vezes até a exaustão, isto é, até que a solução se apresentasse límpida e incolor após vários ciclos de refluxo do solvente. Os extratos obtidos nesta etapa serão doravante denominados extratos brutos. A concentração dos extratos brutos foi realizada em evaporador rotatório (BÜCHI Rotavapor R-124) e após concentração, passaram por processo de liofilização (Thermo Fisher Scientific – ModulyoD Freeze Dryer), sendo posteriormente armazenados em freezer (-25° C). O rendimento do processo foi calculado de acordo com a Equação 1.

Equação 1. *Rendimento de extração*

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

3.5 Fracionamento dos Extratos Brutos

Os extratos brutos liofilizados de folhas e colmos de *G. chacoensis* foram fracionados em quatro solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol.

Pesou-se 23,92 g de extrato de folhas em um béquer e dissolveu-se diretamente em 100 mL de hexano. Deixou-se sob agitação magnética intensa por 10 minutos, filtrou-se com papel de filtro, e recolheu-se o solvente. Efetuou-se outras três extrações com hexano seguindo o mesmo procedimento e recolheu-se todo o solvente, totalizando quatro extrações de 100 mL cada, e partindo-se, a seguir, para clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol. Para o fracionamento do extrato bruto de

colmos pesou-se 19,04 g e executou-se o mesmo procedimento para obtenção das frações.

A seguir, eliminou-se grande parte do volume de solvente de cada fração utilizando-se evaporador rotatório (BÜCHI Rotavapor R-124) sob pressão reduzida. Os pequenos volumes restantes foram transferidos para frascos de vidro menores e colocados em chapa de aquecimento a 60-100° C para evaporação total dos solventes.

3.6 Quantificação 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. Esse reagente é o mais amplamente utilizado na determinação de compostos fenólicos totais. Ele é composto pela mistura dos ácidos fosfotúngstico e molibdênico, nos quais tungstênio e molibdênio encontram-se no estado de oxidação +6 (IKAWA *et al.*, 2003). Na presença de compostos redutores, tungstanato e molibdato perdem 1, 2 ou até os 3 átomos de oxigênio produzindo diferentes espécies reduzidas de uma cor azul intensa e característica ($\lambda_{\text{máx}} = 745\text{--}750 \text{ nm}$) (PETERSON, 1979). No entanto, esse método não é seletivo apenas para compostos fenólicos, onde algumas substâncias nitrogenadas como aminas terciárias alifáticas, hidroxilaminas, hidrazinas entre outras, também podem atuar como agentes redutores.

Os extratos brutos de folhas e colmos e suas respectivas frações foram dissolvidos em MeOH:H₂O (80:20, v/v) nas concentrações de 1 mg/mL (frações

acetato de etila de colmos e *n*-butanol de colmos) e 2 mg/mL para as demais frações e extratos brutos. O padrão utilizado no ensaio para a construção da curva de calibração foi ácido gálico (Sigma Aldrich®), com concentrações no ensaio entre 20 a 200 µg/mL em MeOH:H₂O (80:20, v/v). Outro reagente necessário à reação foi carbonato de sódio (Na₂CO₃), preparado a uma concentração de 500 mmol/L em água destilada.

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços e as amostras (extratos brutos e frações) e os demais componentes foram distribuídos da seguinte forma:

- Amostra: 20 µL da amostra + 30 µL de água destilada + 50 µL do reagente de Folin-Ciocalteu + 100 µL de solução de carbonato de sódio;
- Branco de amostra: 20 µL da amostra + 80 µL de água destilada + 100 µL da solução de carbonato de sódio.

Após 2 horas de reação no escuro com a microplaca coberta com folha de alumínio, as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro (BioTek EON Multi-Detection Microplate Reader, BioStack Ready) em $\lambda = 760$ nm.

O conteúdo dos compostos fenólicos foi expresso em microgramas equivalentes de ácido gálico (EAG) por miligrama de amostra (µg EAG/mg), calculado a partir da equação gerada pela curva de calibração. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média seguida de erro padrão.

3.7 Quantificação de Flavonoides

Para a quantificação foi empregado o método espectrofotométrico utilizando cloreto de alumínio (AlCl_3) como agente complexante. A metodologia foi adaptada da Farmacopeia Francesa (ISSA, 2015).

Os extratos brutos das folhas e colmos e suas respectivas frações foram dissolvidos em $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (80:20, v/v) na concentração [5 mg/mL]. O padrão utilizado no ensaio para a construção da curva de calibração foi quercetina (Sigma Aldrich®), nas concentrações finais de 10 a 100 $\mu\text{g/mL}$ em $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (80:20, v/v). Cloreto de alumínio foi utilizado na concentração de 2% (m/v) em $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (80:20, v/v).

Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços e as amostras e demais componentes foram distribuídos da seguinte forma:

- Amostra: 20 μL de amostra + 160 μL de metanol 80% + 20 μL da solução de AlCl_3 ;
- Branco de amostra: 20 μL de amostra + 180 μL de metanol 80%.

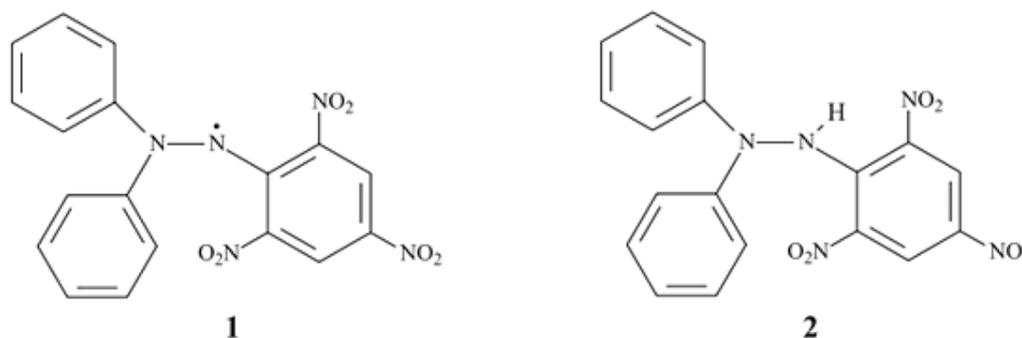
Após 30 minutos de reação no escuro com a microplaca coberta com folha de alumínio, as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro (BioTek EON Multi-Detection Microplate Reader, BioStack Ready) em $\lambda = 425 \text{ nm}$.

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

3.8 Capacidade Antioxidante

Para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos foi empregado o método espectrofotométrico de captura do radical livre DPPH (BRAND-WILLIAMS, 1995), espécie que se mantém estável devido à deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula (Figura 6). Essa deslocalização é caracterizada por uma banda de absorção em metanol em $\lambda \approx 520$ nm, o que confere à solução uma coloração violeta. O ensaio consiste, então, na capacidade de uma determinada substância, o agente antioxidante, atuar como doadora de átomos de hidrogênio ou elétrons e reduzir o radical a hidrazina. Esta redução desloca a banda de absorção para um maior comprimento de onda, resultando em uma mudança de cor de violeta para amarelo pálido. (ALVES *et al.*, 2010).

Figura 6. Formas radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH.



Fonte: (ALVES *et al.*, 2010)

Os extratos brutos de folhas e colmos e suas respectivas frações foram dissolvidos em metanol em concentrações iniciais de 1 a 0,1 mg/mL para triagem preliminar, as quais foram ajustadas posteriormente para definir a EC₅₀ específica de cada amostra. O padrão utilizado no ensaio para a construção da curva de calibração

foi quercetina (Sigma Aldrich®) dissolvida em metanol, nas concentrações finais de 1,5 a 5 µg/mL.

A solução estoque de DPPH foi preparada pela dissolução de 2,0 mg em balão volumétrico de 50 mL de metanol, para uma solução-estoque [0,04 mg/mL] e concentração final no poço da placa Elisa de 0,03 µg/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 (extratos brutos e frações) e demais componentes 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.

Após 30 minutos de reação no escuro com a microplaca coberta com folha de alumínio, as absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro (BioTek EON Multi-Detection Microplate Reader, BioStack Ready) em $\lambda = 515$ nm.

Os ensaios foram realizados em triplicata e a porcentagem de capacidade antioxidante foi calculada de acordo com a Equação 2.

Equação 2: Cálculo da capacidade antioxidante

$$\% \text{ CA} = \frac{[(\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{branco do controle}}) - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco da amostra}})]}{(\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{branco do controle}})} \cdot 100$$

3.9 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

A análise preliminar da composição dos extratos brutos e frações foi feita por CCD, utilizando-se substâncias de referência (padrões) indicados na Tabela 1 e folhas de sílica gel 60 F₂₅₄ (0,2 mm, Merck) como fase estacionária. Os extratos brutos e frações foram dissolvidos a uma concentração de aproximadamente 2 a 5 mg/mL em metanol.

Tabela 1. Sistemas de eluição e padrões utilizados com as frações e extratos brutos na CCD.

Frações	Sistema	Padrões
Hexano	tolueno:éter etílico (1:1, v/v)	Cumarina, umbeliferona
Clorofórmio e acetato de etila	clorofórmio:metanol (9:1, v/v)	ácido cafeico, ácido cinâmico, ácido clorogênico, ácido p-cumárico ácido gálico, quercetina e rutina
<i>n</i> -butanol	THF:tolueno:ácido fórmico:água (16:8:2:1, v/v)	iso-orientina, isovitexina, orientina, quercetina, rutina e vitexina
Extratos brutos e frações acetato	tolueno:acetona (9:1, v/v)	–

As fases móveis foram preparadas em béqueres e a corrida de solvente era interrompida a cerca de 1 cm da borda superior da folha de sílica. Após secagem total foi feita visualização sob luz UV em $\lambda = 254$ nm e $\lambda = 366$ nm. A seguir, revelou-se essas folhas com NP/PEG (difetilboriloxietilamina 1% (m/v) em metanol), um intensificador de fluorescência em $\lambda \sim 365$ nm para flavonoides e ácidos fenólicos, e novamente visualizadas em 366 nm, marcando as manchas e deslocamentos em ambos os casos. Para a comparação das amostras com os padrões, calculou-se o fator de retenção (R_f) de acordo com a Equação 3:

Equação 3: Fator de retenção, Rf

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela substância}}{\text{frente do solvente}}$$

3.10 Cromatografia a Gás Acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)

A análise da composição do óleo volátil das folhas e das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila de *G. chacoensis* foi realizada no laboratório do Instituto de Botânica de São Paulo, supervisionado pela 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) tendo hélio como gás de arraste, pressão de 80 kPa, fluxo de 1 mL/min. As condições empregadas para as análises do óleo volátil e frações são descritas abaixo:

Óleo volátil: Temperatura inicial de 40°C mantida por 1 minuto e aumento subsequente do aquecimento em 3°C/min até atingir 240°C mantendo essa temperatura por 15 min. As temperaturas do injetor e detector foram programadas para 250°C.

Frações: Temperatura inicial de 100°C mantida por 1 minuto e aumento subsequente do aquecimento em 10°C/min até 290°C, com manutenção da temperatura final por 15 minutos. As temperaturas do injetor e detector foram ajustadas para 290°C.

Os índices de retenção aritméticos (IA) (DOOL e KRATZ, 1963) foram calculados conforme descrito na Equação 4. Para tal, utilizou-se uma série homóloga de *n*-alcanos (C8-C22) para o óleo volátil e (C13-C31) para as frações, ambas submetidas às mesmas condições de análise cromatográfica das amostras.

Equação 4. Índice aritmético (IA) empregado nos cálculos.

$$IA = 100Z + \frac{100[(TR_x) - (TR_z)]}{(TR_{z+1}) - (TR_z)}$$

X - composto de interesse; **Z** - número de átomos de carbono do alcano com tempo de retenção imediatamente 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 imediatamente posterior ao tempo de retenção de X.

A identificação dos compostos voláteis foi realizada através da comparação entre os índices de retenção obtidos na análise e os espectros de massas de bibliotecas instaladas no equipamento (Wiley; NIST 2014; ADAMS, 2017), além de comparação com espectros de massa registrados em banco de dados como NIST (National Institute of Standards and Technology). Para caracterizar cada composto considerou-se uma diferença de até $\pm 10\%$ do IA em relação aos valores reportados na literatura.

3.11 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O perfil cromatográfico das frações clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol dos extratos brutos de colmos e folhas foi analisado utilizando-se os solventes ácido acético 0,1% (v/v) e acetonitrila, ambos de grau HPLC da marca T. J. Baker. As análises foram feitas em um cromatógrafo Agilent 1260 com detector de espectro

ultravioleta por fotodiodos com célula de fluxo de 60 mm. Como fase estacionária foi utilizada uma coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm, 3,5 µm de diâmetro de partícula) e fluxo de 1,0 mL/min. O volume de injeção foi de 3 µL e a temperatura da coluna 45° C. O gradiente de eluição das amostras foi o seguinte (Tabela 2).

Tabela 2. Gradiente de eluição CLAE das frações acetato de etila e n-butanol de colmos e folhas, partindo de uma solução aquosa de ácido acético 0,1% (v/v).

Frações acetato e <i>n</i> -butanol		Frações clorofórmio	
Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Tempo (min)	Acetonitrila (%)
0 – 6	10	0 – 10	10 a 25
6 – 7	10 a 15	10 – 30	25 a 50
7 – 22	15	30 – 50	50 a 100
22 – 32	15 a 50	50 – 60	100
32 – 42	50 a 100		
42 – 50	100		

3.12 Atividade Antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos, frações e óleo volátil foi realizada utilizando-se o método de microdiluição empregando microplacas estéreis de 96 poços, adaptando-se os volumes de amostras e controles para 200 µL (ELOFF, 1998). A metodologia para essa análise foi feita conforme descrito a seguir:

Microrganismos: Foram utilizados cinco microrganismos para este ensaio. Três bactérias: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) (Gram-negativa), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) (Gram-positiva) e *Escherichia coli* (ATCC 8739) (Gram-negativa), e dois fungos: *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus*

brasiliensis (ATCC 16404). O óleo volátil de *G. chacoensis* foi testado contra *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. As concentrações finais nos poços da microplaca foram:

- 0,5 mg/mL para o óleo volátil
- 0,1 mg/mL para os extratos brutos e frações
- 0,05 mg/mL para os controles positivos (clorafenicol, amicacina e nistatina)
- $\sim 2 \times 10^2$ UFC/mL para os microrganismos

Estas cepas encontravam-se liofilizadas e cada uma foi ressuspensa em solução salina estéril 0,9% (m/v). A seguir, foram ativadas transferindo-se a suspensão para caldo nutritivo com incubação adequada para cada microrganismo:

- Bactérias: 35-37 °C por 24 horas;
- *C. albicans*: 20-25 °C por 48 horas;
- *A. brasiliensis* a 20-25 °C por sete dias.

Partindo deste caldo, os microrganismos 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. A partir dessas culturas, foram realizadas no máximo cinco subculturas para os ensaios antimicrobianos posteriores.

Meios de cultura: Para as bactérias, foram utilizados caldo nutritivo e ágar caseína de soja — Tryptic Soy Broth (TSB) e Tryptic Soy Agar (TSA) da marca Difco®. Para os fungos, foi utilizado caldo nutritivo e ágar Sabouraud Dextrose — Sabouraud Dextrose Broth (SDB) e Sabouraud Dextrose Agar (SDA) — Difco®. Todos os meios de cultura foram preparados de acordo com as instruções do fabricante.

Preparação do inóculo: A massa celular resultante do crescimento em meio sólido foi recolhida em 9 mL de solução salina estéril 0,9% (m/v) e padronizada através de escala McFarland. Polissorbato 80 foi utilizado como padrão para auxiliar no recolhimento da massa celular de *A. brasiliensis*. Partindo dessa primeira solução, foram realizadas diluições seriadas (em solução salina estéril) até que se obtivesse concentração de 10^4 UFC/mL. A partir dessa diluição foi preparado o inóculo a ser utilizado nos ensaios. O inóculo da diluição 10^4 UFC/mL foi diluído em meio de cultura, até que se atingisse uma concentração final de cerca de $2 \cdot 10^3$ UFC/mL. Para cada experimento foi realizada a semeadura da diluição microbiana para confirmação de viabilidade do inóculo.

Controle positivo (agentes antimicrobianos): Foram empregados 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 para atingirem a concentração de 50 µg/mL no poço da microplaca.

Amostras: As amostras foram solubilizadas em DMSO:MeOH (1:1, v/v). A concentração final no poço da microplaca foi de 0,5 mg/mL para o óleo volátil e de 0,1 mg/mL para os extratos brutos e frações.

O ensaio foi realizado em microplacas de 96 poços e as amostras (óleo volátil, extratos brutos, frações) e os 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: 200 µL de inóculo;
- Controle de esterilidade: 200 µL 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 horas a 25°C para *C. albicans*, 72 horas a 25 °C para *A. brasiliensis* e 24 horas a 35°C para os demais microrganismos. Passado o período de incubação, a leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro (Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader – Biotek) em $\lambda = 630$ nm. A avaliação de inibição de *A. brasiliensis* foi visual, sem o uso de equipamentos, considerando a presença ou ausência de crescimento.

Com os valores de absorvância das amostras e dos controles positivos foi possível calcular a porcentagem de inibição de crescimento microbiano. As equações utilizadas encontram-se a seguir (Equações 5 e 6). Diferentemente das outras espécies testadas, a análise de *A. brasiliensis* foi qualitativa (visual) pela presença ou ausência de crescimento, uma vez que esta espécie de fungo produz filamentos, o que impossibilita a leitura em espectrofotômetro (Figura 30).

Equação 5. Cálculo de crescimento microbiano.

$$\text{Crescimento microbiano (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco de amostra}}}{\text{Abs}_{\text{controle de solvente}} - \text{Abs}_{\text{branco de crescimento}}} \cdot 100$$

Equação 6. Cálculo de porcentagem de inibição microbiana.

$$\text{Inibição (\%)} = \text{Abs}_{\text{controle de solvente}} - \text{Abs}_{\text{branco de crescimento}} - \text{Crescimento microbiano}$$

3.13 Atividade Antitirosinase

Tirosinase é uma enzima (mono-oxigenase) dependente de O₂ que contém cobre e é responsável pelas reações de escurecimento que produzem melanina. A

enzima é responsável pela hidroxilação da tirosina, oxidação da diidroxifenilalanina (DOPA) para dopaquinona entre outras etapas posteriores no mecanismo de escurecimento (DEWICK, 2009).

Os ensaios com tirosinase foram realizados utilizando solução-tampão fosfato de potássio, KH_2PO_4 , pH 6,8. Preparou-se em balão volumétrico de 250 mL uma solução (solução A) com 6,8045 g de KH_2PO_4 em água destilada. Em outro balão de 250 mL, preparou-se uma solução (solução B) com 2,00 g de NaOH em água destilada. Em seguida, em balão volumétrico de 200 mL adicionou-se 50 mL da solução A, 22,4 mL da solução B e completou-se o volume com água destilada.

As amostras de extrato bruto e frações foram preparadas da seguinte forma:

- a) Dissolveu-se 25 mg de cada amostra em 100 μL de Tween 20 (polissorbato 20 – surfactante) e 900 μL de DMSO (dimetilsulfóxido), concentração inicial de 25 mg/mL.
- b) De cada uma dessas soluções, pegou-se 200 μL e adicionou-se 800 μL de tampão fosfato, concentração 5 mg/mL.

A enzima tirosinase (Sigma-Aldrich®) foi preparada previamente a uma concentração [0,1 mg/mL] no tampão fosfato e mantida frasco plástico com tampa sob refrigeração a -25°C . Para os experimentos, transferiu-se para caixa de isopor com gelo e esperou-se a solução enzimática descongelar. Em 2 mL de tampão fosfato foi adicionado 1 mL da enzima para utilização nos ensaios com concentração final [0,033 mg/mL].

O substrato utilizado para a reação enzimática foi a levodopa (*L-Dopa*) (Sigma-Aldrich®). A preparação era efetuada no dia do experimento com o preparo

de uma solução [0,5 mg/mL] em tampão fosfato, sendo descartado qualquer excedente ao término do experimento.

Os ensaios foram realizados em triplicata em microplacas de 96 poços e as amostras (extratos brutos e frações) e demais componentes foram distribuídos da seguinte forma:

- Amostra: 80 μ L tampão fosfato + 40 μ L amostra + 40 μ L tirosinase;
- Branco da amostra: 120 μ L tampão fosfato + 40 μ L tirosinase;
- Controle: 80 μ L tampão fosfato + 40 μ L solvente + 40 μ L tirosinase;
- Branco do controle: 120 μ L tampão fosfato + 40 μ L solvente;

O solvente é o mesmo das amostras, ou seja, Tween 20 + DMSO 1:9 (v/v).

A concentração final de cada amostra nos poços das microplacas foi de 1 mg/mL.

Após adicionar todos os componentes, incubou-se a placa por 10 minutos a 30° C. A seguir, acrescentou-se em todos os poços, isto é, amostra, branco de amostra, controle e branco do controle, 40 μ L de *L-Dopa*. Encubou-se, então, por mais 10 minutos a 30° C e fez-se a leitura em espectrofotômetro (BioTek EON Multi-Detection Microplate Reader, BioStack Ready) em $\lambda = 475$ nm. A porcentagem de inibição da enzima tirosinase foi medida de acordo com a equação (Equação 2:).

3.14 Análise Estatística

As análises estatísticas efetuadas nesse trabalho foram feitas com o auxílio programa Minitab® 19. Foram executadas a análise de variância para 1 fator (ANOVA

One-Way) estabelecendo o nível de significância $\alpha = 0,05$, isto é, nível de confiança de 95%, com posterior aplicação do teste de comparação de Tukey.

Resumidamente, ANOVA é uma análise da dispersão dos valores obtidos em torno da média do resultado apresentado. Ela informa se existe ou não diferença estatística relevante entre os valores numéricos dos resultados, mas não permite concluir qual ou quais valores diferem entre si. Essa comparação é feita pela aplicação do teste de Tukey, que separa os resultados em grupos e aqueles que fazem parte de grupos diferentes são significativamente distintos para poderem ser comparados.

Outros parâmetros envolvidos na análise são o valor-P, que para a ANOVA ser confiável deve ser menor que α , e o valor-F, que deve ser maior que 1 para que o valor-P obtido seja confiável. Quanto maior o valor-F, mais confiável é a significância estatística do valor-P. O número de graus de liberdade expressa o espaço amostral analisado. Quanto maior, melhor é a estimativa de variabilidade entre os resultados apresentados (Suporte ao Minitab® 19).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise do Óleo Volátil

Óleos voláteis são líquidos aromáticos obtidos a partir de material vegetal — flores, ervas, brotos, folhas, frutas, galhos, casca, sementes, madeira e raízes. Os componentes desses óleos e o teor (%) que eles aparecem na composição do óleo varia entre as espécies, entre as partes da planta analisada e até mesmo de acordo com as condições de cultivo e época de coleta (MIRANDA *et al.*, 2016).

Devido à atividade antibacteriana e antifúngica normalmente associada aos óleos voláteis, existe grande interesse em estudar e isolar seus principais componentes de modo que se possa tratar de doenças infecciosas ou empregá-los como conservantes na indústria alimentícia (SOLÓRZANO-SANTOS e MIRANDA-NOVALES, 2012).

Ao final do processo de extração do óleo, obteve-se 0,0016 g resultando num rendimento de 0,00079% (m/m). O rendimento da hidrodestilação do óleo volátil de *G. chacoensis* teve um rendimento bem pequeno se comparado a outras espécies de bambus asiáticos como *Phyllostachys pubescens* 0,01% (m/m) (TAKAHASHI, MIZUI e MIYAZAWA, 2010).

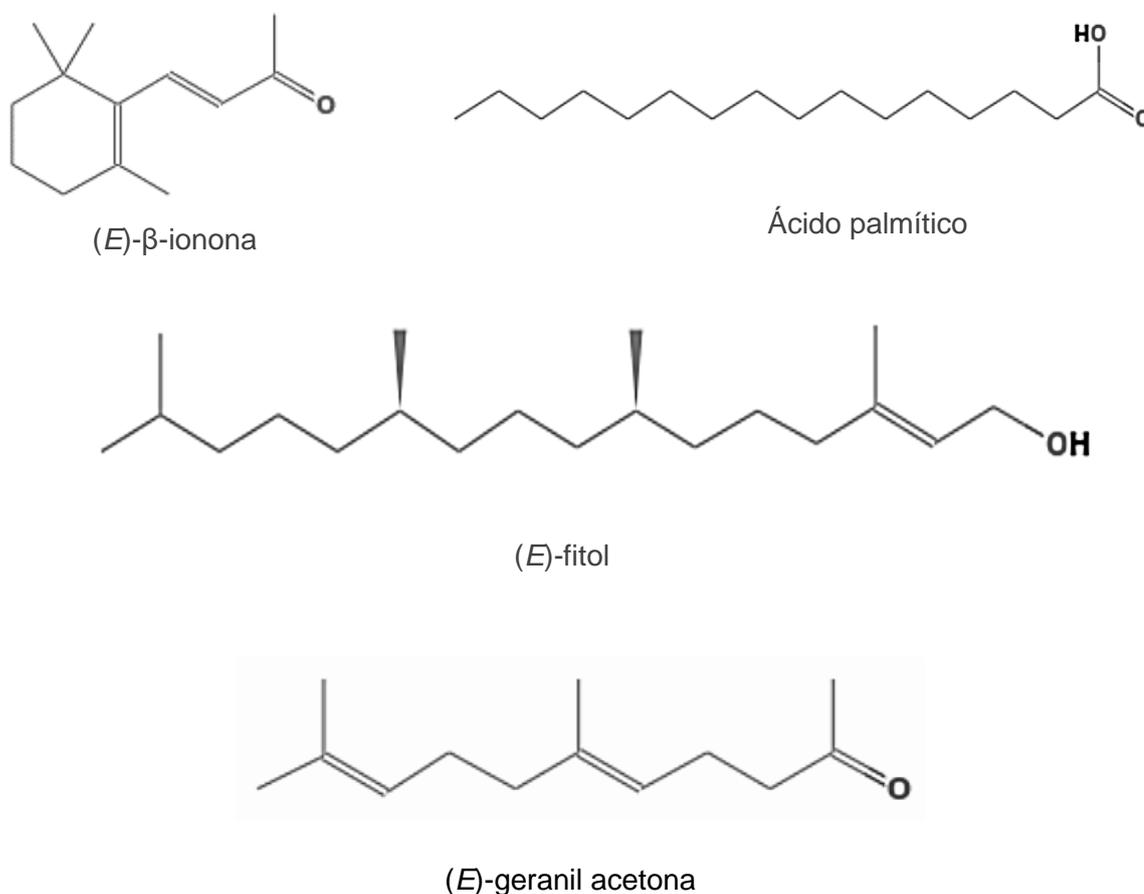
A análise do óleo volátil de *G. chacoensis* por CG-EM indicou a presença de pelo menos 44 compostos diferentes, dos quais 18 puderam ser identificados, perfazendo 57,98% composição total do óleo. Analisando-se os compostos identificados (Tabela 3), a maior parte pertence à classe dos terpenos (mono, di e sesquiterpenos) ou seus derivados oxigenados, os terpenoides (mono, sesqui tetraterpenoides), compondo 41,13% do total. No entanto, os dois compostos majoritários, são ácido palmítico, um ácido graxo, e (*E*)- β -ionona (Figura 7), um

produto de degradação de carotenoides que já foi identificado nos compostos voláteis de *Phyllostachys heterocycla* cv. *Pubescens* Mazel ex Houz. De ehaie, ao qual atribuiu-se atividade antidiabética (GUO *et al.*, 2015). Também se observou a presença do artefato diisobutil ftalato, um plastificante que provavelmente adveio de algum frasco de acondicionamento das amostras.

Tabela 3. Componentes identificados do óleo volátil de *Guadua chacoensis*.

N	Composto	%	IA	IA (lit.)
1	(<i>E</i>)- β -ionona	8,75	1477	1487
2	ácido palmítico	6,54	1829	1963
3	(<i>E</i>)-fitol	5,32	2107	2106
4	(<i>E</i>)-geranil acetona	5,06	1447	1453
5	α -cedreno	4,76	1411	1410
6	Hexa-hidrofarnesil acetona (fitona)	4,73	1840	1842
7	ylangenol	3,30	1647	1666
8	(<i>E,E</i>)-farnesil acetona	3,03	1893	1915
9	(<i>E</i>)- β -damascenona	2,99	1377	1383
10	1,7-di-epi- α -cedrenal	2,70	1663	1639
11	cedren-8-en-15-ol	2,58	1693	1669
12	cedrol	2,17	1604	1600
13	diisobutil ftalato	1,56	1855	1873
14	isofitol	1,22	1857	1946
15	(<i>E</i>)- α -ionona	0,96	1432	1428
16	β -ciclocitral	0,83	1217	1217
17	β -bisaboleno	0,82	1505	1505
18	10-epi-cubebol	0,66	1512	1533

Figura 7. Estrutura molecular dos quatro compostos majoritários do óleo volátil de *Guadua chacoensis*.



Diferentes cultivares (cv.) da espécie asiática *Phyllostachys heterocykla*, *P. heterocykla* cv *Pubescens*, *P. heterocykla* cv. *Gracilis* e *P. heterocykla* cv. *Heterocykla* tiveram a composição dos seus óleos voláteis analisada e apresentaram 53 componentes identificados em ~ 92% da composição total do cultivar. Ácido palmítico foi o principal componente no cv. *Pubescens* (3,19%) e fitol, cedrol e (E)-β-ionona também estavam entre os compostos identificados (JIN, YUAN e ZHANG, 2011).

4.2 Obtenção dos Extratos Brutos

Extração Soxhlet, ou extração por refluxo, é o método mais largamente utilizado para a extração de compostos fenólicos de plantas e a utilização de etanol:água 60% (v/v) tem se mostrado como melhor solvente de extração nesse método (SU *et al.*, 2019).

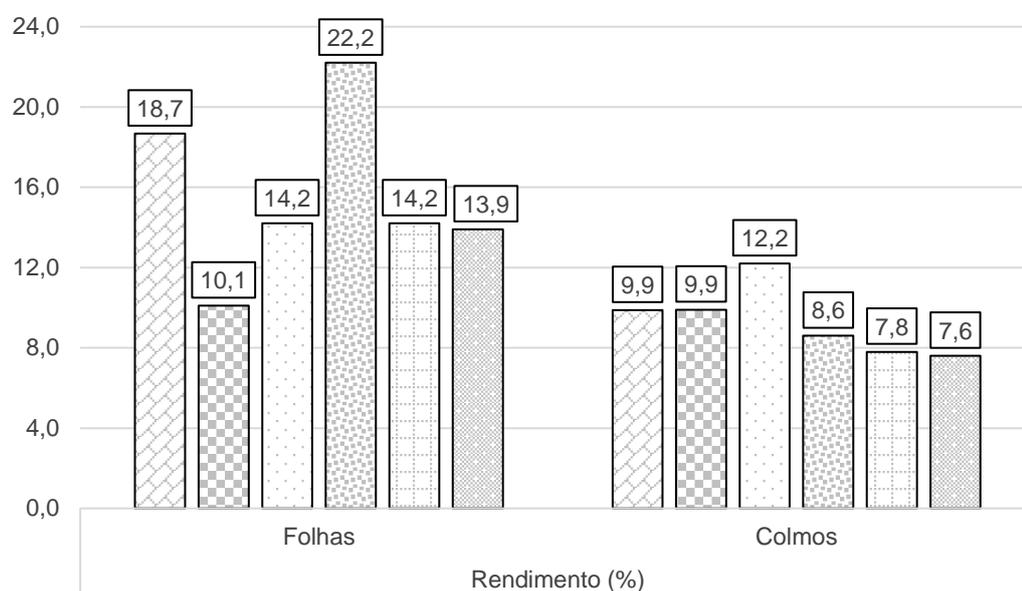
Partiu-se de 449,92 g de pó de folhas e obteve-se 84,10 g de extrato bruto após liofilização, resultando em um rendimento de 18,67%. Em relação aos colmos, partiu-se de 452,29 g de pó e obteve-se 44,71 g de extrato, o que resultou em um rendimento de 9,88 % (Tabela 4).

Tabela 4. Rendimento da obtenção de extrato bruto de folhas e colmos de *Guadua chacoensis*.

Porção vegetal	Massa de material (g)	Massa de extrato bruto (g)	Rendimento (%)
Folhas	449,92	84,10	18,67
Colmos	452,29	44,71	9,88

Comparando-se com outras espécies de bambus americanos (WROBLEWSKA, 2019), percebeu-se que o rendimento da extração de *G. chacoensis* foi muito próximo ou superior à maior parte das espécies reportadas (Figura 8).

Figura 8. Comparativo de rendimento, em porcentagem, da extração de folhas e colmos de espécies de bambus americanos. (WROBLEWSKA, 2019)



Da esquerda para a direita: Folhas – *Guadua chacoensis*, *Aulonemia aristulata*, *Chusquea bambusoides*, *Chusquea capituliflora*, *Chusquea meyeriana*, *Merostachys pluriflora*. Colmos segue a mesma ordem.

Além disso, observou-se que o rendimento da extração das folhas foi maior que a dos colmos para todas as espécies. Isso se deve ao fato de as folhas desempenharem um papel biossintético muito mais ativo, como por exemplo realizando fotossíntese ou produzindo uma gama de metabólitos secundários utilizados nas interações com outros organismos, do que os colmos, cuja principal função é a sustentação da planta.

4.3 Fracionamento dos Extratos Brutos

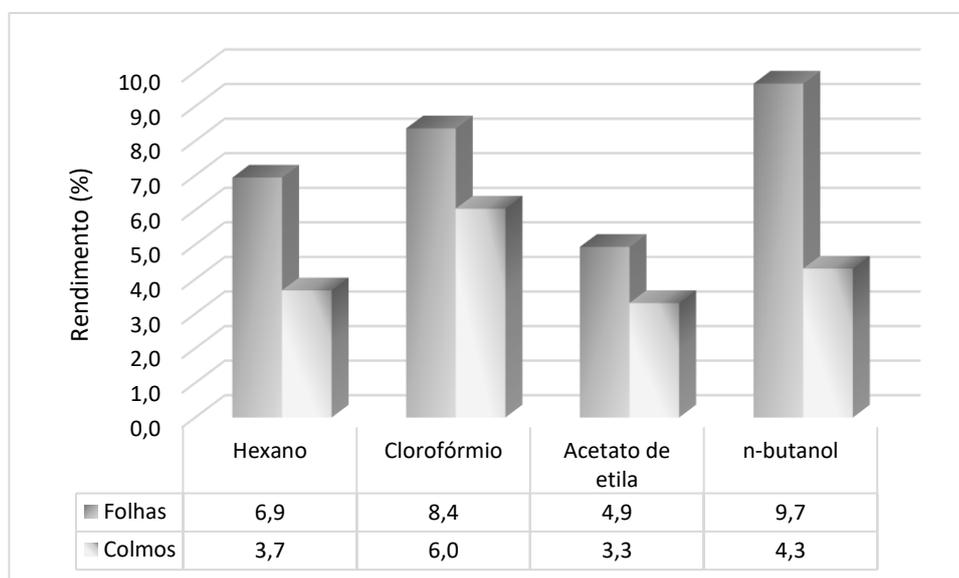
Os extratos brutos de folhas e colmos de *G. chacoensis* foram particionados em quatro solventes aumentando a polaridade na seguinte ordem: hexano, clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol. Após eliminação dos respectivos solventes, pesou-se a massa de cada fração e calculou-se o rendimento de acordo com a

Equação 1. Lembrando-se que foi utilizado apenas uma parte da massa total de cada extrato bruto, 23,92 g para folhas e 19,04 g para colmos, as massas de cada fração obtida encontram-se na Tabela 5 com os respectivos rendimentos expressos na Figura 9.

Tabela 5. Rendimento das frações de folhas e colmos de *Guadua chacoensis*.

Fração	Massa (g)	
	Folhas	Colmos
Hexano	1,66	0,70
Clorofórmio	2,00	1,15
Acetato de etila	1,18	0,63
<i>n</i> -butanol	2,31	0,82

Figura 9. Rendimento, em porcentagem, das frações de folhas e colmos de *Guadua chacoensis*.



Da Figura 9 é possível perceber que novamente as folhas apresentaram maior rendimento que os colmos, indicando uma maior presença de metabólitos secundários que os colmos. Além disso, percebe-se que os extratos de *G. chacoensis* são ricos em compostos de baixa polaridade, como agliconas livres — flavonas polimetoxiladas e flavanonas (frações hexano e clorofórmio) — e de alta polaridade

— compostos fenólicos glicosídicos e flavonoides ligados a açúcares (fração *n*-butanol). A fração que teve menor rendimento foi acetato de etila.

4.4 Quantificação de Compostos Fenólicos Totais

A quantidade de compostos fenólicos totais presentes nos extratos brutos e frações de *G. chacoensis* foi estimada por meio de uma curva de calibração de ácido gálico (Figura 10) e os resultados foram expressos como $\mu\text{g EAG/mg}$, isto é, μg equivalentes de ácido gálico por miligrama de amostra. Estes valores encontram-se na (Figura 11), cujos respectivos erros-padrão não puderam ser representados no gráfico por serem inferiores a 0,03.

Figura 10. Curva de calibração de ácido gálico para a quantificação de compostos fenólicos presentes em extratos brutos e frações de *Guadua chacoensis* pelo método com reagente de Folin-Ciocalteu.

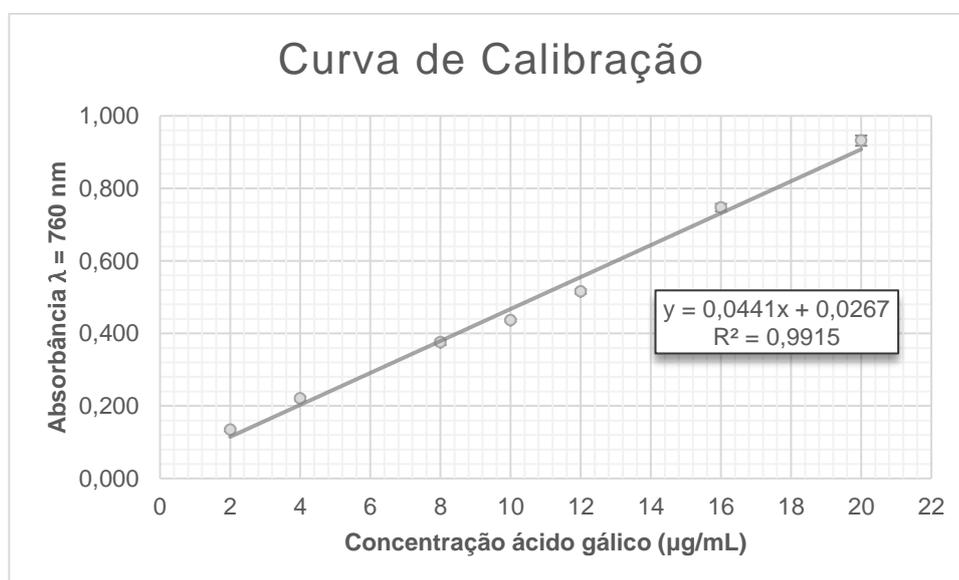
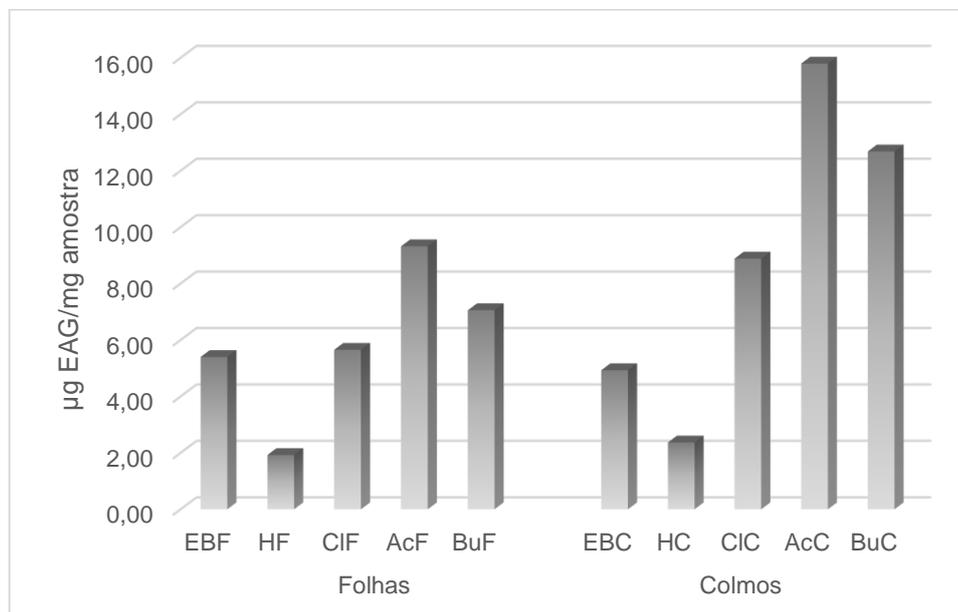


Figura 11. Teor de compostos fenólicos de *Guadua chacoensis* nos extratos brutos de folhas e colmos e nas respectivas frações em hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol pelo método com reagente de Folin-Ciocalteu. Os erros-padrão não puderam ser representados em escala por serem inferiores a 0,03.



Legenda: EAG = µg equivalentes de ácido gálico, EB = extrato bruto, F = folhas, C = colmos, H = fração hexano, Cl = fração clorofórmio, Ac = fração acetato de etila, Bu = fração *n*-butanol.

O tratamento estatístico deu-se fez pela análise de variância (ANOVA) One-Way, onde foram considerados nove graus de liberdade, resultando em um valor-P = 0,000 com intervalo de confiança de 95%, isto é, nível de significância $\alpha = 0,05$, e valor-F = 191,34. Como valor-P < α , as diferenças entre as médias apresentadas como resultado para cada amostra são estatisticamente significativas, isto é, verdadeiras e não-aleatórias, e o valor-F $\gg 1$ indica alto grau de confiabilidade no valor-P obtido. Além disso, utilizando o teste de comparação de Tukey temos que as amostras pertencentes a grupos designados por letras diferentes são significativamente distintas (Tabela 6).

Tabela 6. Teor de compostos fenólicos (em μg EAG/mg) em amostras de *Guadua chacoensis* determinado pelo método com reagente de Folin-Ciocalteu, acompanhado dos respectivos erros padrão. As letras sobrescritas representam os grupos do teste de Tukey. Letras diferentes indicam amostras significativamente distintas.

Folhas		Colmos	
EBF	$5,40 \pm 0,11^e$	EBC	$4,93 \pm 0,01^e$
HF	$1,92 \pm 0,00^f$	HC	$2,37 \pm 0,01^f$
CIF	$5,65 \pm 0,02^{d,e}$	CIC	$8,88 \pm 0,02^a$
AcF	$9,32 \pm 0,00^a$	AcC	$15,80 \pm 0,02^b$
BuF	$7,06 \pm 0,01^c$	BuC	$12,68 \pm 0,03^{c,d}$

Legenda: EAG = μg equivalentes de ácido gálico, EB = extrato bruto, F = folhas, C = colmos, CI = fração clorofórmio, Ac = fração acetato de etila, Bu = fração *n*-butanol.

Com base na comparação esboçada na Figura 11 e na análise estatística é nítido que as frações AcC e BuC apresentaram a maior quantidade de compostos fenólicos $15,80 \pm 0,020$ e $12,68 \pm 0,029$ μg EAG/mg, respectivamente. As amostras de colmos apresentaram, de maneira geral, maior teor que as frações homólogas de folhas, observando-se o mesmo padrão de distribuição entre as frações. Além disso, a maior quantidade de compostos fenólicos nas frações acetato de etila indicam maior afinidade com esse solvente, sendo que a fração AcC, apresentou teor cerca de 50% maior em relação a AcF.

A espécie asiática *Bambusa arundinacea* (Retz.) Wild apresentou $14,6$ μg EAG/mg no extrato metanólico de folhas e $4,26$ μg EAG/mg no extrato butanólico (MACWAN, PATEL e KALIA, 2010). Já *Sasa quelpaertensis* Nakai apresentou quantidade de compostos fenólicos bem inferior a *G. chacoensis*, com as mesmas frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol variando entre $0,001$ e $0,030$ μg EAG/mg (HEWAGE *et al.*, 2018).

4.5 Quantificação de Flavonoides

A determinação do teor de flavonoides presente nas frações e extratos brutos de *G. chacoensis* foi feita usando quercetina como padrão de quantificação através de uma curva de calibração (Figura 12). Os resultados foram expressos como $\mu\text{g EQ/mg}$, isto é, μg equivalentes de quercetina por miligrama de amostra. Estes valores encontram-se na Figura 13.

Figura 12. Curva de calibração de quercetina para a quantificação de flavonoides presentes em extratos brutos e frações de *Guadua chacoensis* determinado pelo método espectrofotométrico com AlCl_3 .

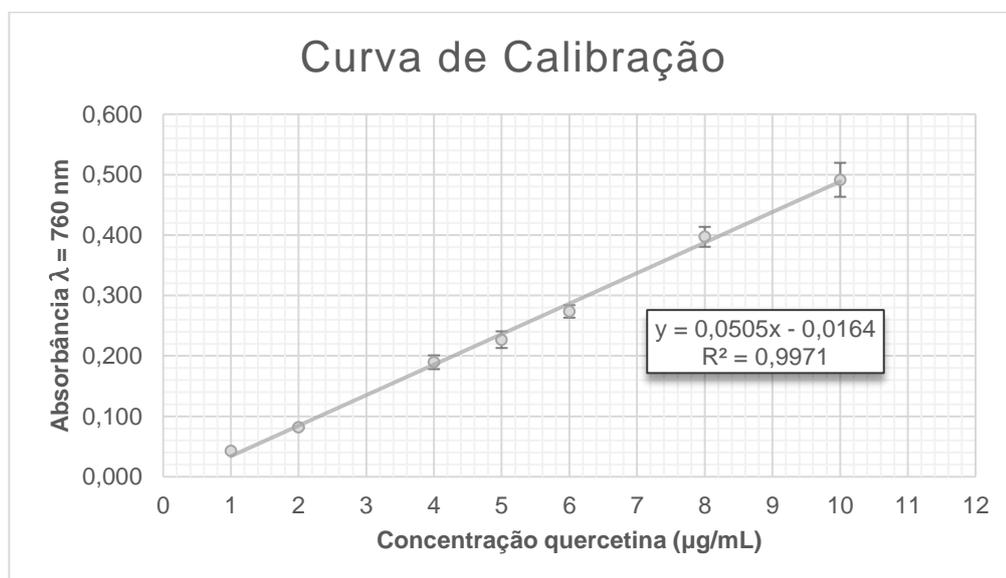
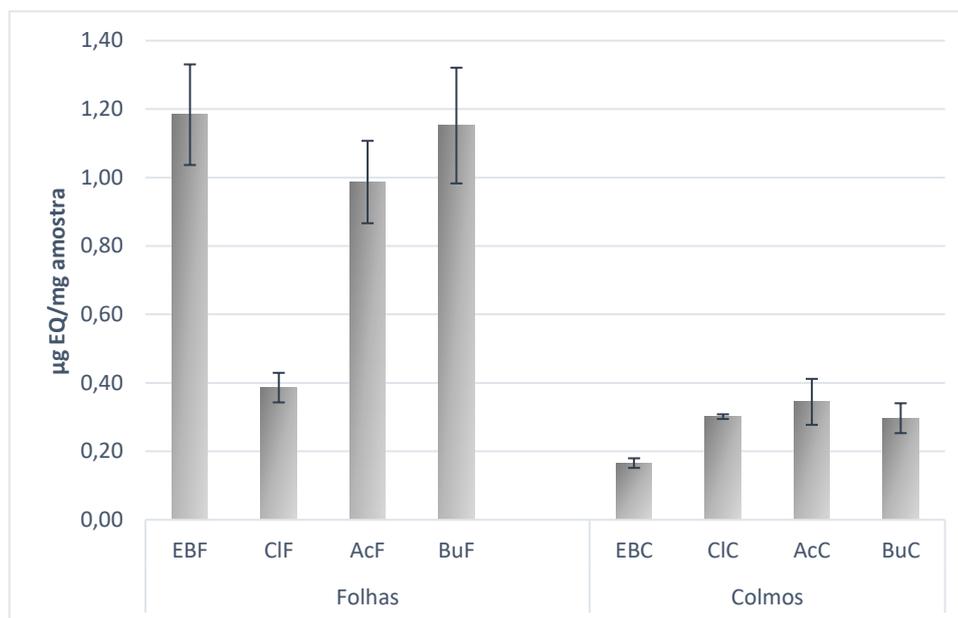


Figura 13. Teor de flavonoides de *Guadua chacoensis* determinado pelo método espectrofotométrico com $AlCl_3$ nos extratos brutos de folhas, colmos, nas respectivas frações em clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol, acompanhados dos erros padrão.



Legenda: EQ = µg equivalentes de quercetina, EB = extrato bruto, F = folhas, C = colmos, Cl = fração clorofórmio, Ac = fração acetato de etila, Bu = fração *n*-butanol.

Na análise de variância (ANOVA) One-Way de flavonoides foram considerados sete graus de liberdade, resultando um valor-P = 0,000 com intervalo de confiança de 95%, isto é, nível de significância $\alpha = 0,05$, e valor-F = 504,51. Conforme abordagem no item 4.4 (Quantificação de fenólicos, p.55), com valor-P < α e valor-F >> 1, há grande nível de significância e variabilidade entre as amostras. Além disso, utilizando o teste de comparação de Tukey temos que as amostras agrupadas abaixo com letras diferentes são significativamente distintas (Tabela 7).

Tabela 7. Teor de flavonoides em amostras de *Guadua chacoensis* (em $\mu\text{g EQ/mg}$) determinado pelo método espectrofotométrico com AlCl_3 , acompanhado dos respectivos erros padrão. As letras sobrescritas representam os grupos do teste de Tukey. Letras diferentes indicam amostras significativamente distintas.

Folhas		Colmos	
EBF	$1,18 \pm 0,15^c$	EBC	$0,17 \pm 0,01^e$
CIF	$0,39 \pm 0,04^c$	CIC	$0,30 \pm 0,01^d$
AcF	$0,99 \pm 0,12^a$	AcC	$0,34 \pm 0,07^d$
BuF	$1,15 \pm 0,17^b$	BuC	$0,30 \pm 0,04^d$

Legenda: EQ = μg equivalentes de quercetina, EB = extrato bruto, F = folhas, C = colmos, Cl = fração clorofórmio, Ac = fração acetato de etila, Bu = fração *n*-butanol.

No item anterior constatou-se que a maior quantidade de compostos fenólicos foi encontrada no extrato bruto de colmos e suas respectivas frações. Apesar disso, percebeu-se que os flavonoides de *G. chacoensis* concentram-se mais nas folhas, especialmente nas frações mais polares AcF ($0,99 \pm 0,01 \mu\text{g EQ/mg}$) e BuF ($1,152 \pm 0,004 \mu\text{g EQ/mg}$). Essas frações apresentaram, inclusive, teor de flavonoides cerca de três vezes maior em relação à fração CIF. No extrato de folhas de *Merostachys pluriflora* Munro ex. C. G. Camus, observou-se também baixo teor de flavonoides nos colmos em relação às folhas e a fração acetato de etila foi a que apresentou maior teor de flavonoides ($8,31 \mu\text{g/mg}$) (GAGLIANO, GROMBONE-GUARATINI e FURLAN, 2018). Com base nisso, é possível concluir que os compostos fenólicos encontrados mais abundantemente em colmos pertençam a outras classes como a dos ácidos hidroxibenzoicos (C6-C1), dos ácidos hidroxicinâmicos (C6-C3) e seus derivados.

4.6 Capacidade Antioxidante

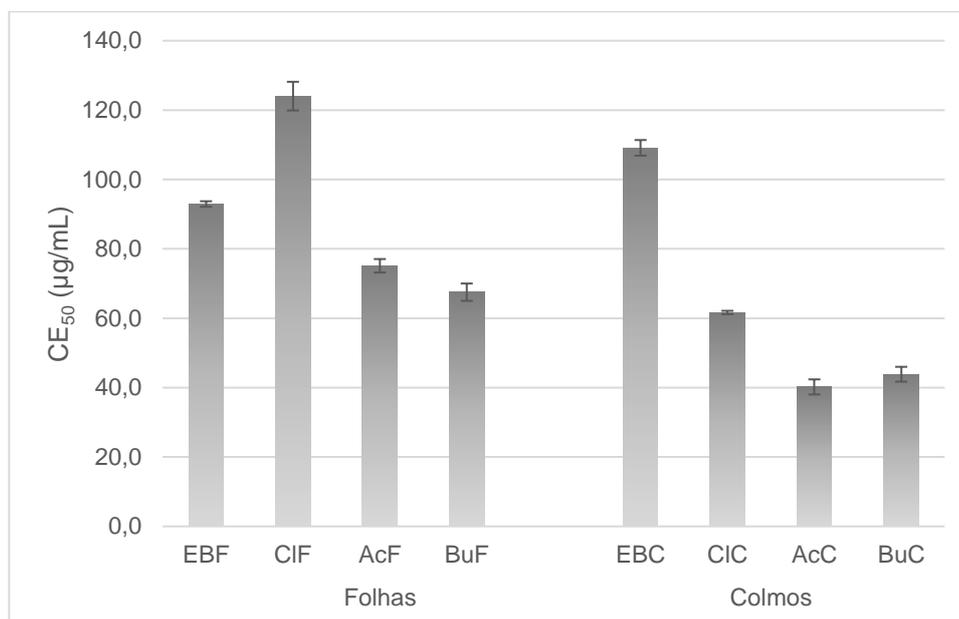
Existem diversos métodos para avaliar a capacidade antioxidante de extratos de plantas. Dentre os métodos *in vitro* mais comuns estão a redução de íons Fe^{3+} (FRAP, do inglês Ferric Reducing Antioxidant Power) e o sequestro de radicais livres, como ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) que utiliza dicloridrato de 2-azobis-(2-amidinopropano), também conhecido como AAPH, ABTS (ácido 6-[2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)] sulfônico) e DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (GAGLIANO, GROMBONE-GUARATINI e FURLAN, 2018). Para investigar a capacidade antioxidante de *G. chacoensis* utilizou-se este último, por ser um teste simples, preciso e reprodutível (ALVES *et al.*, 2010). Feita a triagem preliminar dos resultados, procedeu-se à obtenção das curvas de calibração das amostras em diferentes concentrações para a obtenção da CE_{50} ($\mu g/mL$) que é a concentração efetiva necessária para reduzir a concentração de DPPH em 50%. Os resultados, erros padrão e coeficiente de determinação (R^2) encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8. Potencial antioxidante das amostras de *Guadua chacoensis* determinado pelo método espectrofotométrico de sequestro do radical livre DPPH acompanhado dos respectivos erros padrão e coeficientes de determinação (R^2). As letras sobrescritas representam os grupos do teste de Tukey. Letras diferentes indicam amostras significativamente distintas.

Folhas		R^2	Colmos		R^2
EBF	$92,9 \pm 0,8^b$	0,993	EBC	$109,1 \pm 2,3^a$	0,990
CIF	$124,0 \pm 4,1^a$	0,989	CIC	$61,7 \pm 0,5^c$	0,982
AcF	$75,1 \pm 1,9^c$	0,993	AcC	$40,2 \pm 2,2^d$	0,992
BuF	$67,5 \pm 2,5^c$	0,997	BuC	$43,9 \pm 2,1^d$	0,990

Legenda: EAG = μg equivalentes de ácido gálico, EB = extrato bruto, F = folhas, C = colmos, Cl = fração clorofórmio, Ac = fração acetato de etila, Bu = fração *n*-butanol.

Figura 14. Potencial antioxidante das amostras de *Guadua chacoensis* determinado pelo método espectrofotométrico de sequestro do radical livre DPPH acompanhado dos respectivos erros padrão.



Frente ao radical DPPH, a atividade mais intensa foi observada no extrato bruto e frações de colmos, onde observou-se um aumento da capacidade antioxidante conforme aumentou-se a polaridade das frações (Figura 14), isto é, CE₅₀ fração *n*-butanol > CE₅₀ fração acetato de etila > CE₅₀ fração clorofórmio, e lembrando que quanto menor a CE₅₀, maior a capacidade antioxidante. Do item 4.4 (Quantificação de fenólicos, p.57), constatou que os colmos apresentavam a maior quantidade de compostos fenólicos e deduziu-se que a maior parte se constitui de ácidos fenólicos C6-C3 e C6-C1 e seus derivados.

À insaturação da cadeia lateral dos ácidos hidroxicinâmicos (C6-C3) foi atribuída maior capacidade antioxidante que os ácidos benzoicos (C6-C1) pelo fato de a porção $-C-CH=CH-COOH$ ligada ao anel aromático estabilizar por conjugação e ressonância radicais livres como DPPH ou espécies reativas de oxigênio (ROS) (RAZZAGHI-ASL *et al.*, 2013; HEIM, TAGLIAFERRO e BOBILYA, 2002). Heim *et al.* (2002), também afirmam que os ácidos hidroxicinâmicos são provavelmente o grupo

de ácidos fenólicos mais abundante em bambus. Além disso, pela CLAE descrita no item 4.9 identificou-se a presença do ácido *p*-cumárico, ao qual já foi reportada intensa atividade antioxidante (ZHANG *et al.*, 2007) e reparo de dano oxidativo e regulação positiva (*upregulation*) de enzimas antioxidantes (URSINI *et al.*, 1999).

No extrato bruto de folhas e suas frações, observou-se a mesma tendência em relação à polaridade que as amostras de colmos, sendo a fração *n*-butanol de folhas a mais ativa dentre elas. No entanto, as frações acetato e *n*-butanol apresentaram CE_{50} cerca de 50% menor que as homólogas de colmos, mesmo apresentando quase o triplo do teor de flavonoides. Esta observação vem do fato de que a estrutura do flavonoide e seu arranjo espacial influenciam o poder redutor que ele desempenha. Impedimento estérico e grupos volumosos como açúcares, especialmente nos anéis A e B do flavonoide (os anéis não heterocíclicos), diminuem drasticamente sua ação antioxidante, pois dificultam a doação de elétrons ou átomos de hidrogênio. O grau de hidroxilação no anel B também afeta positiva e significativamente essa capacidade (HEIM, TAGLIAFERRO e BOBILYA, 2002).

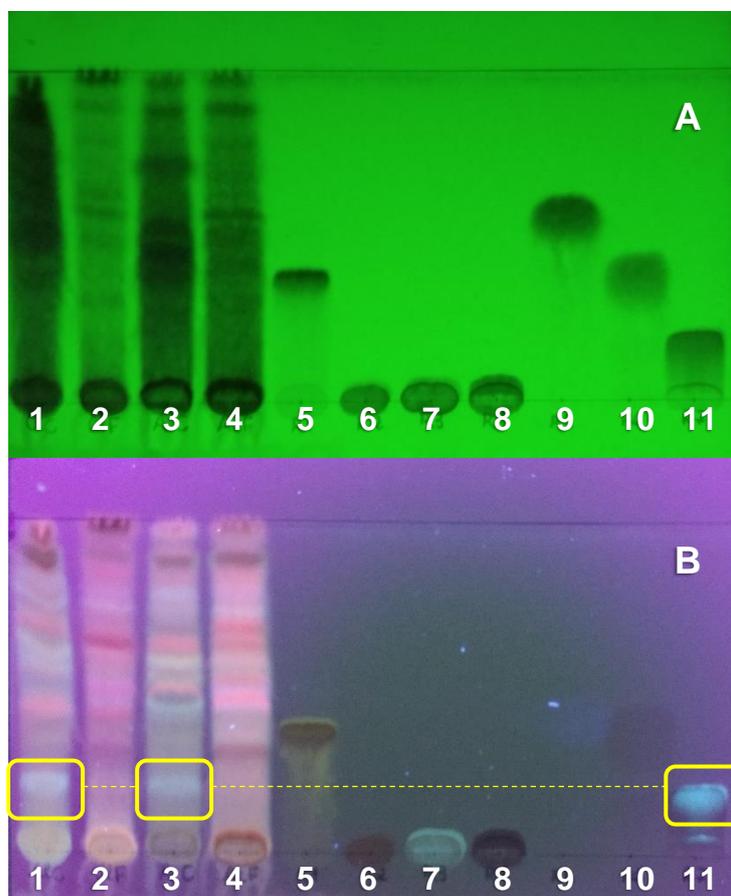
A título de comparação, em outras espécies de bambus também foram reportadas altas capacidades antioxidantes como, por exemplo, no extrato metanólico de folhas de *Oxytenanthera abyssinica* (A. Rich Munro) com $EC_{50} = 56,2 \mu\text{g/mL}$ (BARTHOLOMEW, MAXWELL e BITRUS, 2013) e *Bambusa nutans* Wall. ex Munro com $EC_{50} = 123,5 \mu\text{g/mL}$. (TRIPATHI, JHUMKA e ANJUM, 2015).

4.7 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

A cromatografia de camada delgada é um método simples, rápido e barato para a separação e identificação de componentes em uma amostra (COOPER e NICOLA, 2015).

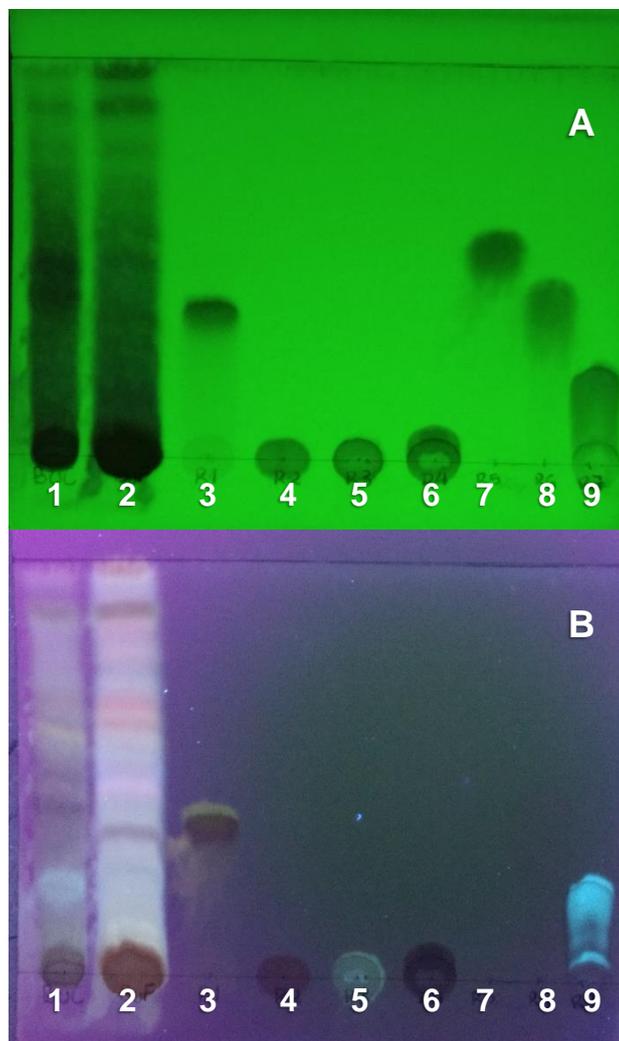
Foram analisados os perfis cromatográficos dos extratos brutos de folhas, colmos e as respectivas frações clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol, com posterior comparação com padrões – flavonoides e ácidos fenólicos comumente encontradas em bambus asiáticos (Figuras 15 a 17). A visualização e registro fotográfico das placas foi feita sob luz UV em 254 nm (A) e 366 nm (B). As cores amarelo ou amarelo esverdeado são características de flavonoides glicosilados, enquanto que a cor azul clara é típica de ácidos fenólicos (WAGNER e BLADT, 1996).

Figura 15. Cromatoplaça das frações clorofórmio e acetato de etila de folhas e colmos de *Guadua chacoensis* dissolvidas em metanol. Sistema de eluição: clorofórmio:metanol (9:1, v/v). Visualização: luz UV 254 nm (A), 366 nm (B), após revelação com reagente NP/PEG.



1 – fração clorofórmio de colmos; 2 – fração clorofórmio de folhas; 3 – fração acetato de colmos; 4 – fração acetato de folhas; 5 – quercetina; 6 – rutina; 7 – ácido clorogênico; 8 – ácido gálico; 9 – ácido cinâmico; 10 – ácido cafeico; 11 – ácido *p*-cumárico. Destaque para a correspondência entre o padrão 11 e as amostras 1 e 3.

Figura 16. Cromatoplaça das frações *n*-butanol de *Guadua chacoensis* dissolvidas em metanol. Sistema de eluição: clorofórmio:metanol (9:1, v/v). Visualização: luz UV 254 nm (A), 366 nm (B), após revelação com reagente NP/PEG.

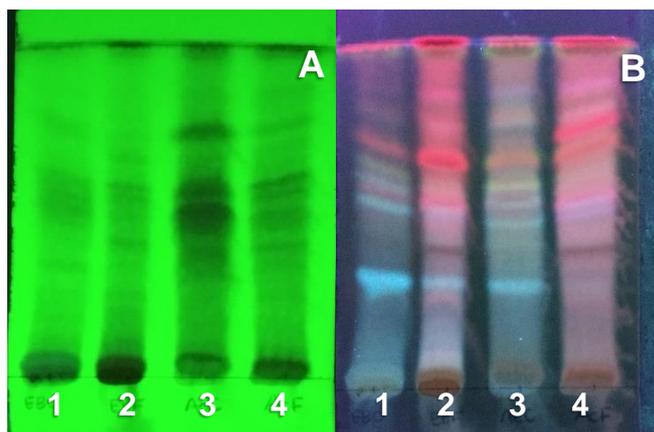


1 – fração *n*-butanol de colmos; **2** – fração *n*-butanol de folhas; **3** – quercetina; **4** – rutina; **5** – orientina; **6** – iso-orientina; **7** – vitexina; **8** – isovitexina; **9** – ácido *p*-cumárico.

Apesar da boa separação de bandas dos extratos e frações apresentadas acima (Figura 16), a comparação com os padrões indicou a presença de um único composto de referência, o ácido *p*-cumárico. Isto pode significar que os outros padrões ou não estejam presentes ou ocorram em pequenas quantidades nos extratos de *G. chacoensis*. As amostras clorofórmio de colmos e acetato de colmos na Figura 15 apresentaram uma faixa azul clara, ambas com $R_f = 0,20$, muito similar em cor e fator

de retenção à do ácido *p*-cumárico, cujo $R_f = 0,19$. Na Figura 16 também foi possível identifica-lo na fração *n*-butanol de colmos, onde ambos $R_f = 0,23$.

Figura 17. Cromatoplaça dos extratos brutos de folhas e colmos e respectivas frações acetato de *Guadua chacoensis* dissolvidas em metanol. Sistema de eluição: clorofórmio:metanol (9:1, v/v). Visualização: luz UV 254 nm (A), 366 nm (B), após revelação com reagente NP/PEG.



1 – extrato bruto de colmos; 2 – extrato bruto de folhas; 3 – fração acetato de colmos; 4 – fração acetato de folhas.

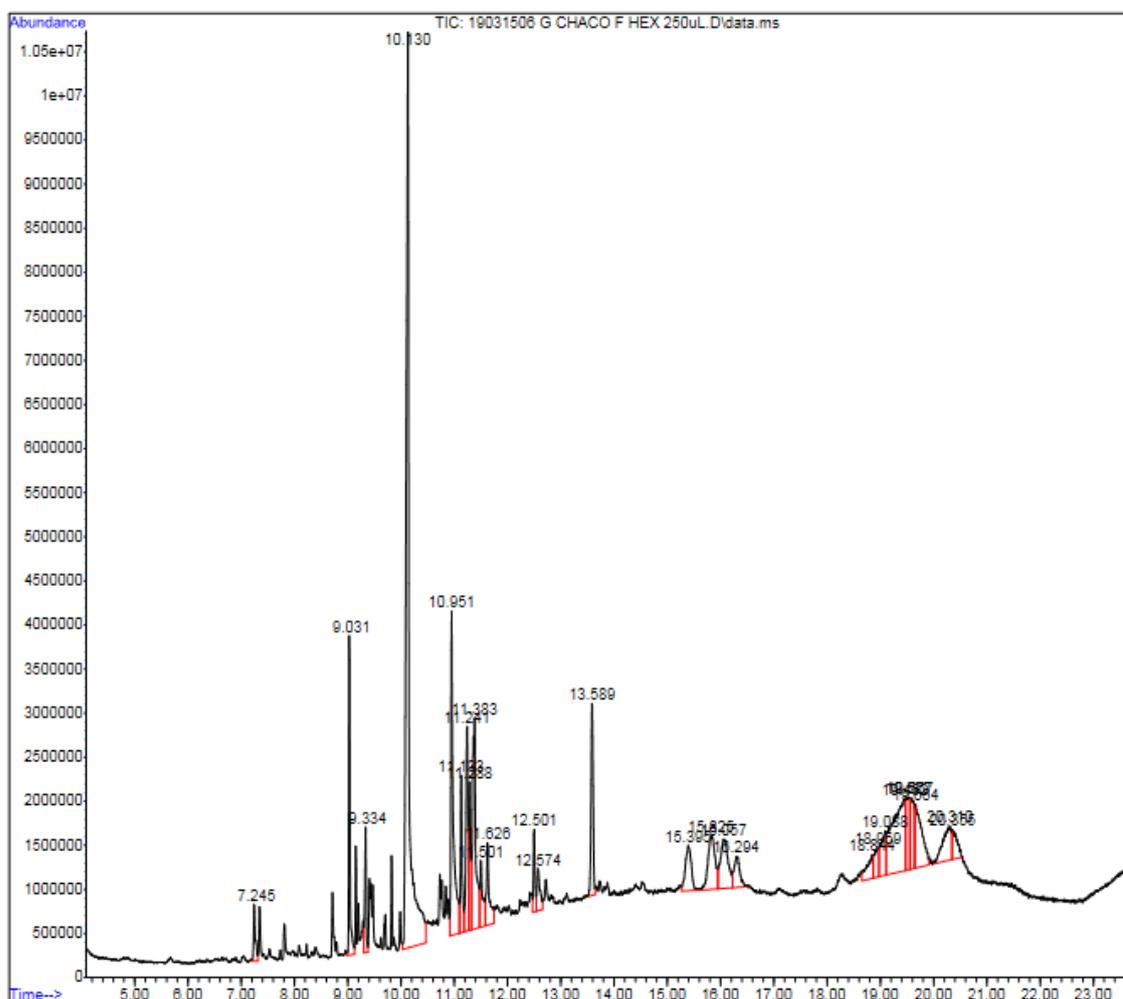
Na figura acima também foi possível perceber uma mancha azul clara nas amostras extrato bruto de colmos (1) e acetato de colmos (3) em comparação com o extrato bruto de folhas (2), cujos R_f foram 0,32, 0,30 e 0,30 respectivamente, e a presença havia sido determinada na Figura 15. Desta forma, é possível concluir que o ácido *p*-cumárico também esteja presente nas folhas de *G. chacoensis*.

4.8 Cromatografia a Gás Acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)

A composição química das frações menos polares de *G. chacoensis* (hexano, clorofórmio e acetato de etila) foi investigada através de CG-EM. Os cromatogramas obtidos estão representados nas Figuras 18 a 23. A identificação dos compostos

detectados foi feita através dos índices de retenção calculados (IA) (Equação 4) e por comparação dos espectros de massas com as bibliotecas do equipamento (Wiley; NIST, 2014; ADAMS, 2017) e com o banco de dados NIST (National Institute of Standards and Technology) (Tabelas 9 a 14).

Figura 18. Cromatograma da fração hexano de folhas de *Guadua chacoensis* obtido por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.



No cromatograma da Figura 18 foi detectada a presença de pelo menos 27 compostos diferentes, no entanto, muitas deles não puderam ser identificados devido a problemas de coeluição ou falta de correspondência com as bases de dados. Em face disso, apenas oito compostos puderam ser identificados

(Tabela 9). O composto majoritário foi o ácido palmítico, um ácido graxo, cuja abundância foi de 25,77%, seguido por (*Z*)-fitol (7,15%) e estearato de etila (6,24%).

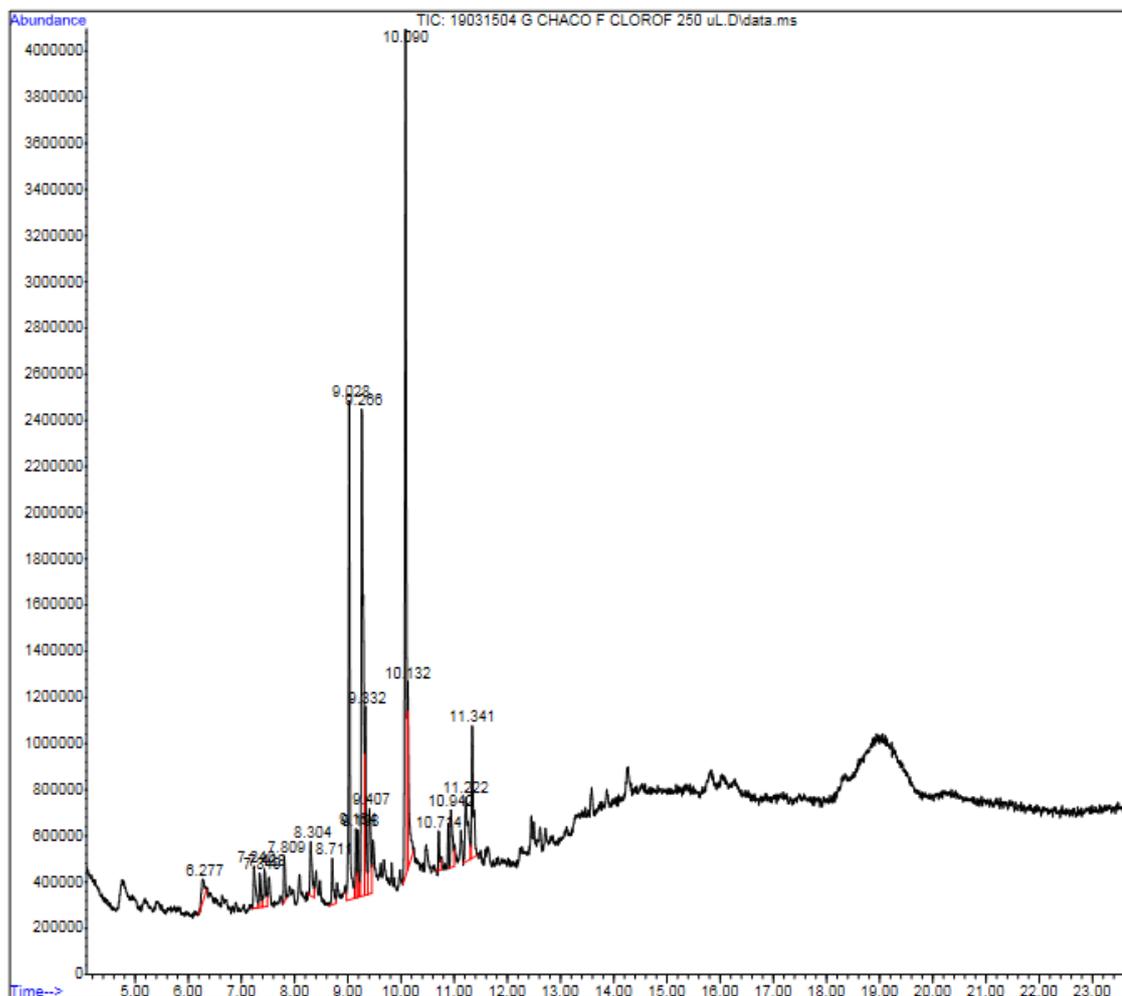
Tabela 9. Composição química da fração hexano de folhas de *Guadua chacoensis* por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.

N	Composto	IA _{calc}	IA _{lit}	%
1	ácido dodecanoico	1504	1558	0,95
2	neofitadieno	1794	1806	3,52
3	ácido palmítico	1990	1958	25,77
4	(<i>Z</i>)-fitol	2091	2086	7,15
5	linolato de etila	2094	2185	2,34
6	estearato de etila	2189	2189	6,24
7	4,8,12,16-tetrametil-heptadecan-4-olídeo	2292	2364	1,22
8	α -tocospiro B	2787	2860	3,54

IA_{calc} = índice de retenção calculado; IA_{lit} = índice de retenção de acordo com literatura (ADAMS, 2007) e bases de dados: NIST e PubChem.

Depois do ácido palmítico, os principais componentes identificados nessa fração foram ésteres de ácidos graxos, o (*Z*)-fitol, que é um diterpênico acíclico e constituinte da clorofila (a estrutura do isômero (*E*) encontra-se na Figura 7, p. 51) e o 4,8,12,16-tetrametil-heptadecan-4-olídeo, que é uma γ -lactona isoprenoídica de cadeia mais longa que o fitol e é produto de degradação do α -tocoferol (vitamina E) (RONTANI, NASSIRY e MOUZDAHIR, 2007). Já o α -tocospiro B é um metabólito que foi identificado em uma espécie de arbusto e ao qual foi atribuído atividade inibidora de glicosidase (atividade antidiabética) (MURUGESU, 2018).

Figura 19. Cromatograma da fração clorofórmio de folhas de *Guadua chacoensis* obtido por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.



O cromatograma da Figura 19 apresenta o perfil da fração clorofórmio de folhas, onde foram detectadas pelo menos 19 substâncias. A

Tabela 10 abaixo mostra os nove que puderam ser identificados. O composto majoritário nesta fração foi ácido palmítico, com a mesma abundância (25,70%) observada para a fração hexano. O segundo composto majoritário, abundância de 20,20%, $IA_{calc} = 1796$ e $TR = 9,267$ min, não pôde ser identificado por problemas de coeluição. A seguir, identificou-se neofitadieno (12,31%), que é um diterpeno desoxigenado, produto da degradação do fitol. Os outros compostos são o próprio fitol, ácidos graxos e seus derivados.

Tabela 10. Composição química da fração clorofórmio de folhas de *Guadua chacoensis* por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.

N	Composto	IA _{calc}	IA _{lit}	%
1	ácido dodecanoico	1504	1558	1,87
2	siringaldeído	1694	1662	2,20
3	neofitadieno	1794	1806	12,31
4	ácido palmítico	1897	1958	25,70
5	palmitato de etila	1990	1992	5,65
6	ácido heptadecanoico	1996	2065	0,99
7	(Z)-fitol	2091	2086	2,51
8	ácido linoleico	2093	2130	4,05
9	ácido esteárico	2095	2166	4,97

IA_{calc} = índice de retenção calculado; IA_{lit} = índice de retenção de acordo com literatura (ADAMS, 2007) e bases de dados: NIST e PubChem.

O cromatograma da fração acetato de etila folhas (Figura 20) abaixo apresentou pelo menos 23 substâncias, das quais 15 puderam ser identificadas (Tabela 11, abaixo). Os compostos majoritários foram 4-vinilfenol (18,58%), que é encontrado em espécies vegetais como arroz selvagem (Poaceae), café (Rubiaceae) e amendoim (Fabaceae), ao qual foi atribuída ação antitumoral (LEUNG *et al.*, 2018), ácido palmítico (13,35 %), ácido esteárico (10,24%) e neofitadieno (6,33%). Apenas um dos componentes majoritários não pôde ser identificado, com abundância de 14,05 %, IA_{calc} = 1796 e TR = 9,274 min.

Figura 20. Cromatograma da fração acetato de folhas de *Guadua chacoensis* obtido por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.

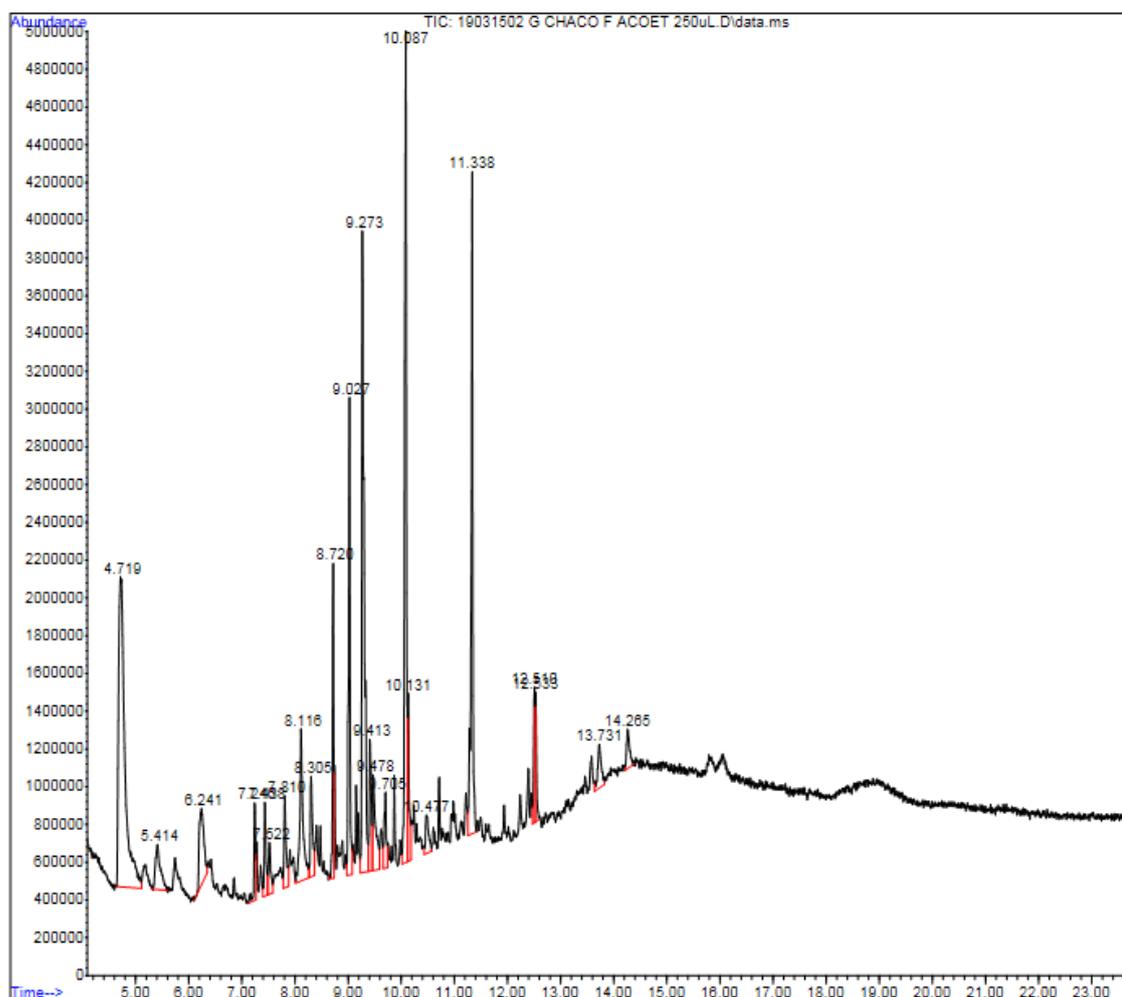


Tabela 11. Composição química da fração acetato de folhas de *Guadua chacoensis* por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.

N	Composto	IA _{calc}	IA _{lit}	%
1	4-vinilfenol	1292	1237	18,58
2	2-metóxi-4-vinilfenol	1305	1309	2,12
3	4-hidroxibenzaldeído	1403	1317	3,31
4	1-hexadeceno	1504	1592	1,36
5	4-vinil-siringol	1594	1573	1,64
6	3-hidróxi- β -damascona	1599	1617	1,77
7	siringaldeído	1695	1662	2,14
8	1-octadeceno	1700	1792	3,10

9	neofitadieno	1794	1806	6,33
10	palmitato de metila	1893	1910	1,52
11	ácido palmítico	1897	1963	13,35
12	palmitato de etila	1990	1992	2,44
13	ácido esteárico	2095	2188	10,24
14	1-docoseno	2292	2190	1,79
15	estearato de butila	2293	2388	1,62

IA_{calc} = índice de retenção calculado; IA_{lit} = índice de retenção de acordo com literatura (ADAMS, 2007) e bases de dados: NIST e PubChem.

Pelo cromatograma da fração hexano de colmos (Figura 21 abaixo), observou-se a presença de pelo menos 19 substâncias. Os três componentes majoritários, com abundâncias 32,45% (IA_{calc} = 2884, TR = 16,553 min), 14,63% (IA_{calc} = 2992, TR = 19,940 min) e 11,95% (IA_{calc} = 2975, TR = 16,582 min), não apresentaram correspondência com nenhuma base de dados e por isso não puderam ser identificados. No entanto, entre os 10 compostos identificados observou-se a predominância de ácidos graxos como ácido palmítico, esteárico e linoleico e seus ésteres (Tabela 12).

Figura 21. Cromatograma da fração hexano de colmos de *Guadua chacoensis* obtido por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.

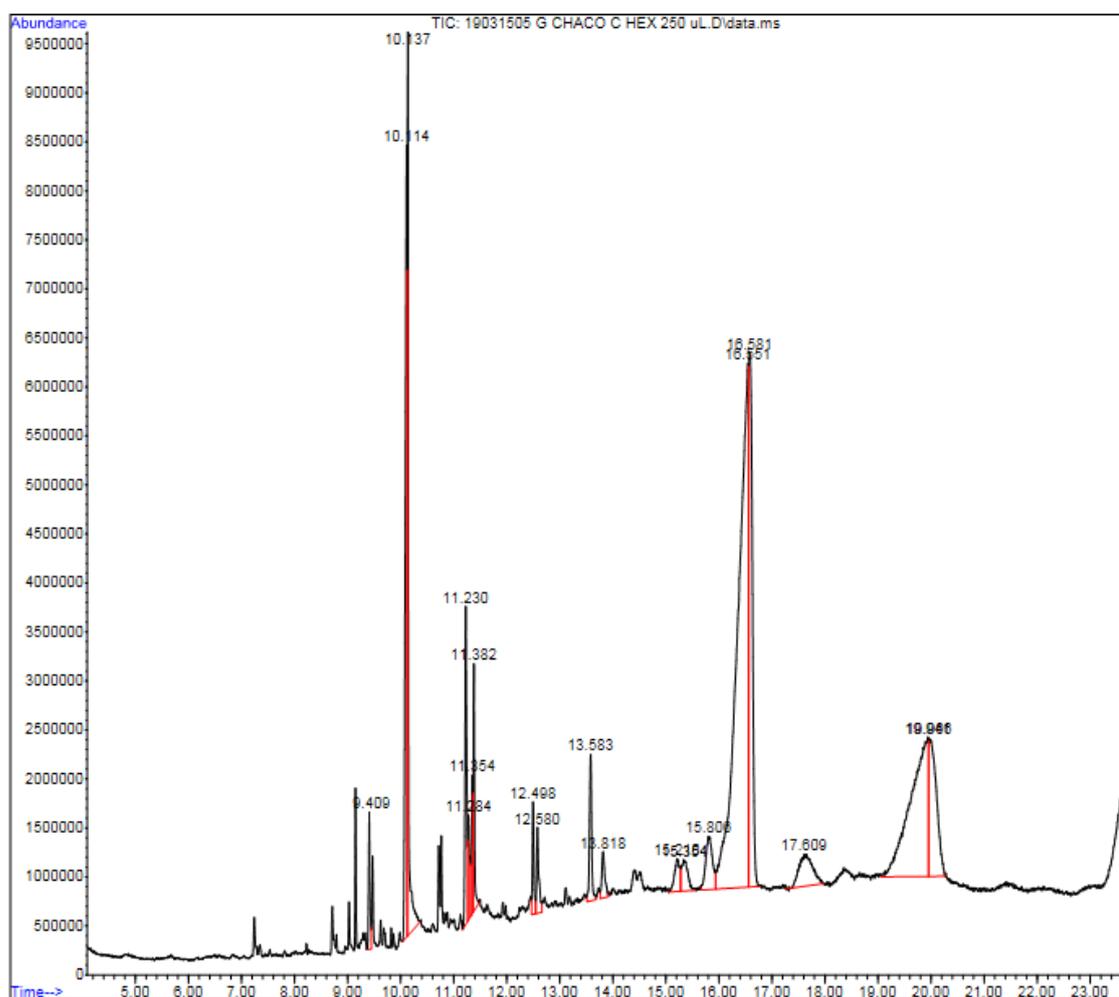


Tabela 12. Composição química da fração hexano de colmos de *Guadua chacoensis* por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.

N	Composto	IA _{calc}	IA _{lit}	%
1	ácido pentadecanoico	1798	1863	1,15
2	ácido palmítico	1990	1958	8,19
3	palmitato de etila	1990	1991	6,30
4	ácido linoleico	2093	2130	3,17
5	linolato de etila	2094	2185	1,20
6	ácido esteárico	2095	2166	0,97
7	estearato de etila	2189	2189	1,83

8	4,8,12,16-tetrametil-heptadecan-4-olídeo	2292	2364	1,05
9	docosanoato de etila	2586	2593	0,85
10	α -tocospiro B	2787	2860	2,15

IA_{calc} = índice de retenção calculado; IA_{lit} = índice de retenção de acordo com literatura (ADAMS, 2007) e bases de dados: NIST e PubChem.

Na fração clorofórmio de colmos, observou-se a presença de pelo menos 24 compostos, dos quais 13 puderam ser identificados (Figura 22 abaixo). O composto majoritário apresentou abundância de 20,67%, IA_{calc} = 2790 e TR = 16,297 min, porém não pôde ser identificado. Os compostos seguintes mais abundantes foram ácido palmítico (12,97%), 4-hidróxi-benzaldeído (10,28%) e álcool coniferílico (7,87%), um dos componentes da lignina produzido pela via biossintética dos fenilpropanoides (DEWICK, 2009) (Tabela 13).

Figura 22. Cromatograma da fração clorofórmio de colmos de *Guadua chacoensis* obtido por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.

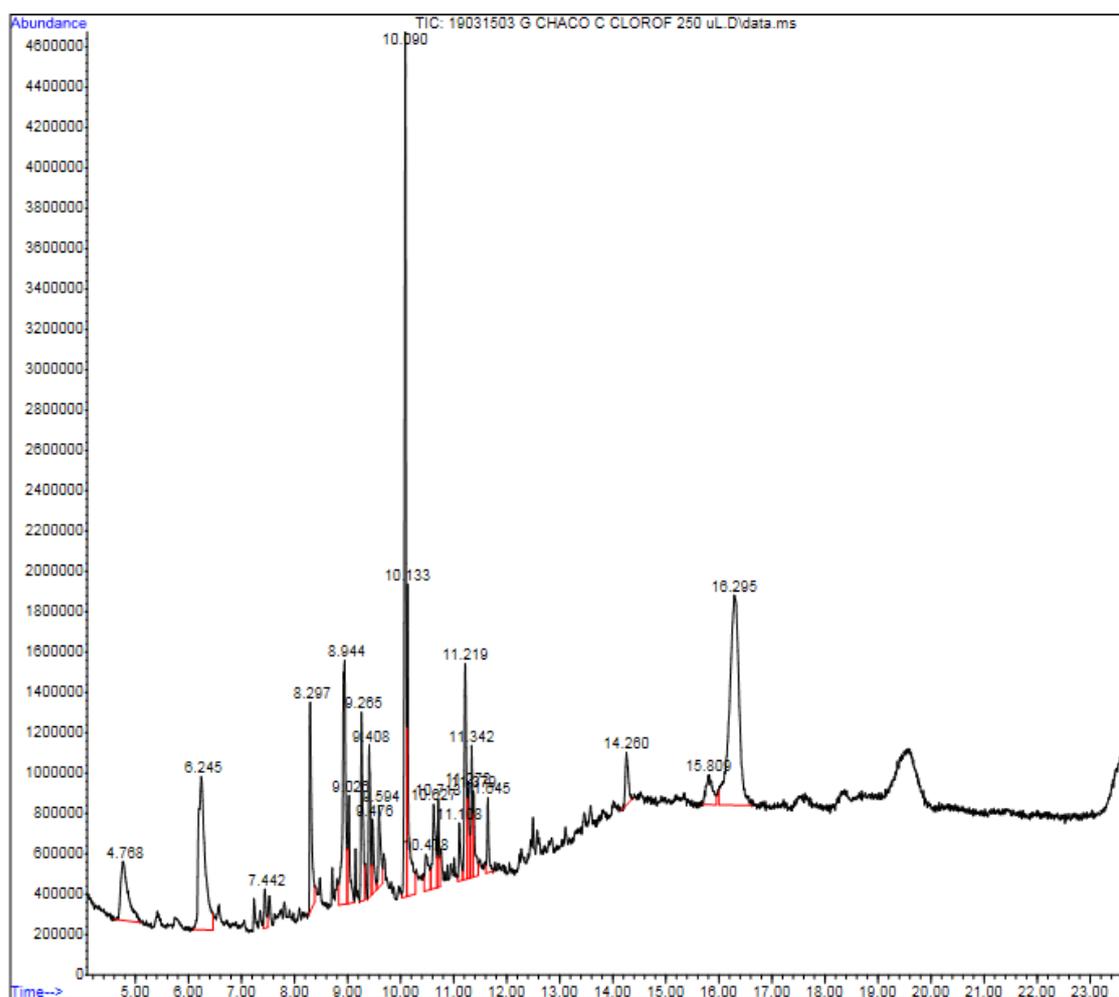


Tabela 13. Composição química da fração clorofórmio de colmos de *Guadua chacoensis* por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.

N	Composto	IA _{calc}	IA _{lit}	%
1	4-vinilfenol	1292	1237	4,51
2	4-hidroxibenzaldeído	1403	1317	10,28
3	4-vinil-siringol	1595	1573	0,76
4	siringaldeído	1695	1670	4,05
5	álcool coniferílico	1793	1727	7,87
6	neofitadieno	1794	1838	2,25
7	ácido pentadecanoico	1798	1863	2,83
8	ácido palmítico	1897	1958	12,97

9	palmitato de etila	1990	1992	5,47
10	ácido heptadecanoico	1996	2065	1,32
11	ácido linoleico	2093	2130	4,48
12	ácido esteárico	2095	2166	2,05
13	estearato de etila	2189	2189	1,63

IA_{calc} = índice de retenção calculado; IA_{lit} = índice de retenção de acordo com literatura (ADAMS, 2007) e bases de dados: NIST e PubChem.

Diferentemente das outras frações, na fração acetato de colmos (Figura 23) foram detectados apenas cinco compostos, cujos dois componentes majoritários não puderam ser identificados devido a problemas de coeluição. O primeiro teve abundância de 45,74%, IA_{calc} = 3090 e TR = 22,084 min e o segundo, abundância de 29,92%, IA_{calc} = 3090 e TR = 22,244 min. Os outros componentes identificados foram 4-vinilfenol (16,43%), 4-hidroxibenzaldeído (4,89%) e ácido palmítico (3,02%) (Tabela 14).

Figura 23. Cromatograma da fração acetato de colmos de *Guadua chacoensis* obtido por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.

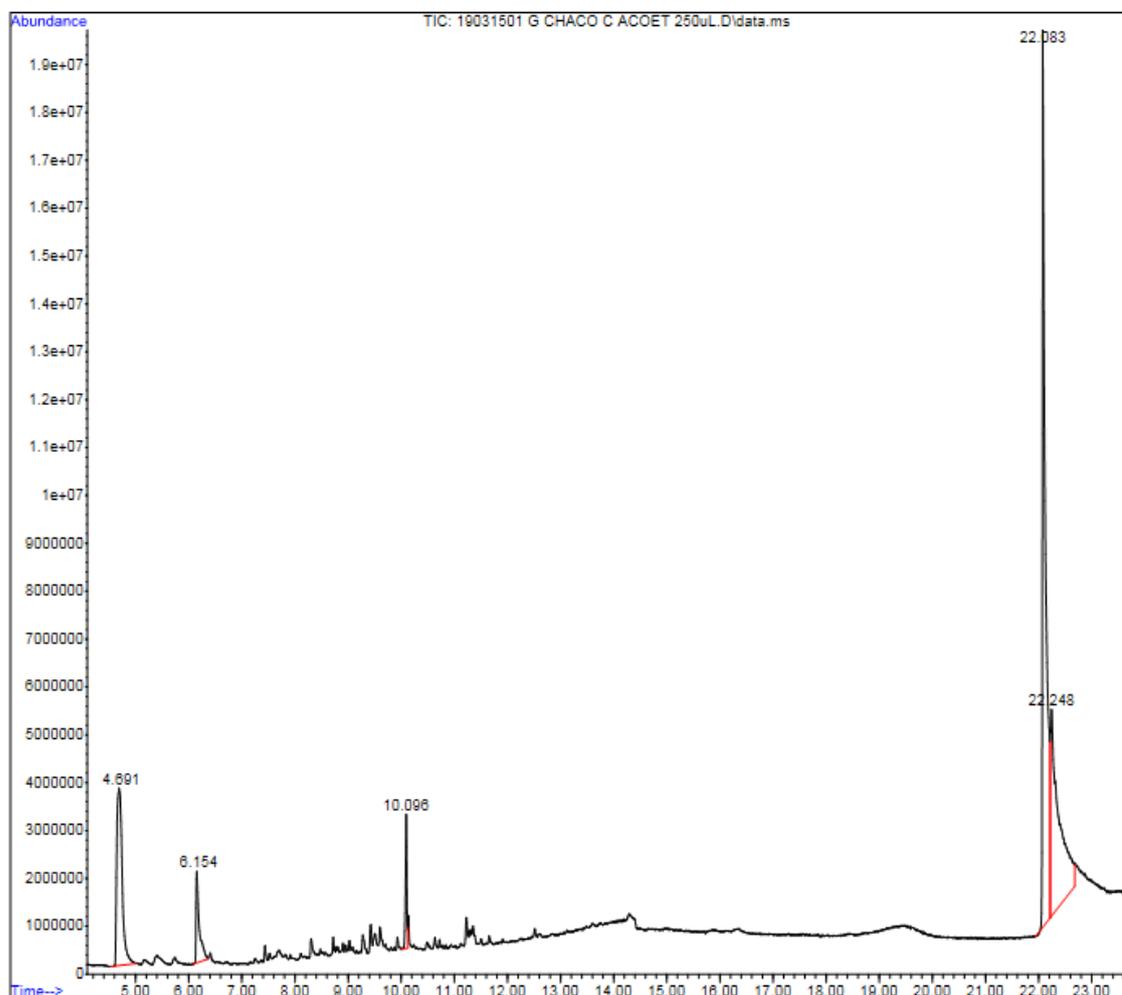


Tabela 14. Composição química da fração acetato de colmos de *Guadua chacoensis* por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.

N	Composto	IA _{calc}	IA _{lit}	%
1	4-vinilfenol	1292	1237	16,43
2	4-hidróxi-benzaldeído	1401	1317	4,89
3	ácido palmítico	1897	1958	3,02

IA_{calc} = índice de retenção calculado; IA_{lit} = índice de retenção de acordo com literatura (ADAMS, 2007) e bases de dados: NIST e PubChem.

Ao todo, foi possível identificar 30 compostos diferentes nas frações. A maior parte deles pertence à classe dos ácidos graxos como ácidos palmítico, esteárico e linoleico e seus ésteres derivados. Em seguida, as classes mais presentes foram a

dos terpenos, fitol e neoftadieno, diterpenos encontrados nas amostras de folhas, e alguns compostos fenólicos como 4-hidroxibenzaldeído, 4-vinilfenol e 4-vinil-siringol. Um dos grandes problemas para a identificação de mais compostos foi a coeluição, a qual poderia ser contornada com outros programas de aquecimento durante a eluição para separar melhor os compostos e poder identifica-los. Além disso, ao comparar os cromatogramas das frações hexano e clorofórmio de folhas e colmos, é possível perceber picos de eluição correspondentes, ou seja, tempos de retenção muito próximos, sendo que a quantidade presente em colmos foi relativamente menor em comparação com as folhas. A exceção foi para as duas frações acetato de etila que apresentaram composição bem diferentes, tendo a amostra de folhas apresentado pelo menos 23 substâncias, enquanto que a amostra de colmos apresentou apenas cinco, ou seja, a amostra de folhas produz uma diversidade de compostos voláteis muito maior que os colmos, possivelmente para dispor de uma maior interação com o meio ambiente.

4.9 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As frações clorofórmio e acetato de etila de colmos e acetato de etila e *n*-butanol de folhas de *G. chacoensis* foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. A identificação dos ácidos fenólicos e flavonoides foi feita por comparação direta dos tempos de retenção e dos espectros de absorção UV das amostras com 55 compostos padrões, normalmente encontrados em bambus. O detector do equipamento era do tipo de arranjo de diodos (DAD, Diode Array Detector em inglês), o qual possibilita avaliar os grupos cromóforos presentes na amostra e separá-las em diferentes classes de compostos de acordo com o formato e $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção.

Os flavonoides, que são subdivididos entre flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, entre outros (DEWICK, 2009), apresentam uma ou até duas bandas de absorção características, dependendo da estrutura de cada subgrupo: a banda I, que absorve na região de 300 – 380 nm, e a banda II, que absorve na região de 240 – 280 nm (MABRY, MARKHAM e THOMAS, 1970).

Com base no tempo de retenção da amostra (10,218 min), da substância de referência (10,428 min) (Figura 26) e nos respectivos formatos de banda do espectro UV (Figuras 25 e 26) abaixo, é possível afirmar que o composto majoritário (pico mais intenso) da fração acetato de etila de colmos é o **ácido *p*-cumárico**.

Figura 24. Cromatogramas obtidos para a fração acetato de etila de colmos de *Guadua chacoensis* através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa C18 em 254, 280 e 325 nm.

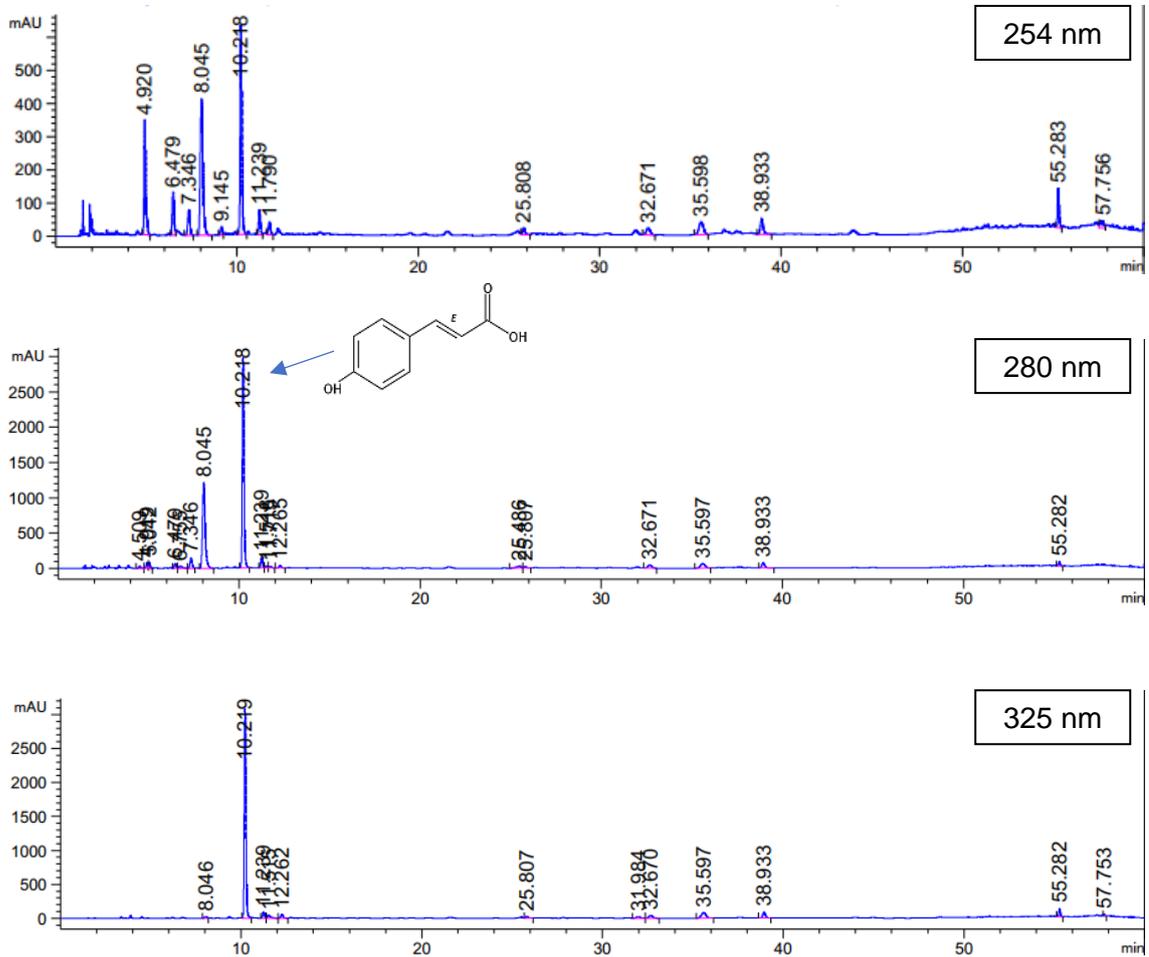


Figura 25. Espectro de absorção na região UV e tempo de retenção do composto majoritário de *Guadua chacoensis* registrado nos cromatogramas em 280 e 325 nm para a fração acetato de etila de colmos através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa C18.

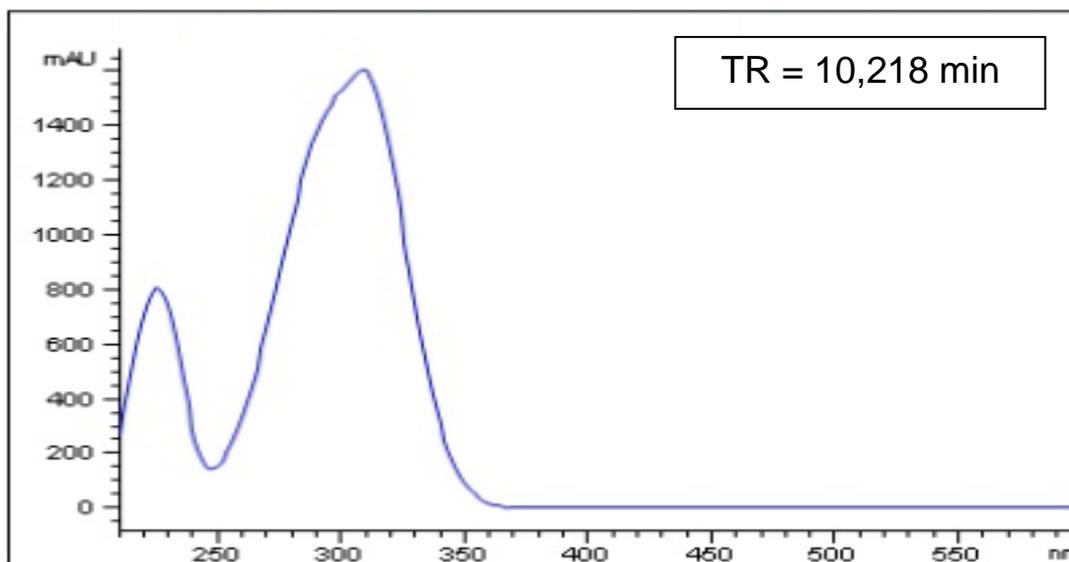
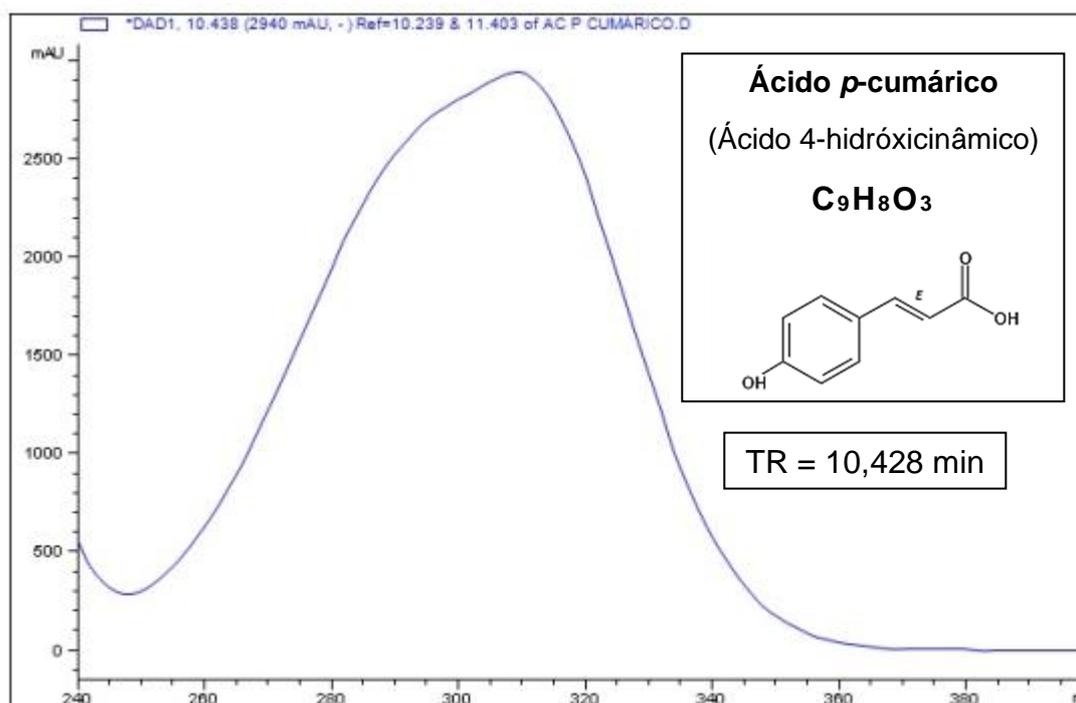


Figura 26. Espectro de absorção na região UV e tempo de retenção do ácido *p*-cumárico.



De acordo com (GAGLIANO, GROMBONE-GUARATINI e FURLAN, 2018), substâncias com uma única banda de absorção no espectro UV entre 250 – 280 nm indicam a presença de derivados de ácido hidroxicinâmico, o que foi observado para

os outros compostos majoritários da fração acetato de etila de colmos. Com base nisso, é possível supor que esses compostos sejam derivados de ácidos fenólicos C6-C3 (ácidos hidroxicinâmicos) como ácido ferúlico, cafeico ou sinápico, ou C6-C1 (ácidos hidroxibenzoicos) como ácido gálico, vanílico ou siríngico (IGNAT, VOLF e POPA, 2011), hipótese em concordância com o teor de fenólicos e flavonoides encontrados nos itens 4.4 (Quantificação de fenólicos, p. 55) e 4.5 (Quantificação de flavonoides, p. 58). E embora não tenha sido possível obter o espectro UV da amostra acetato de etila de folhas, existe um composto majoritário com tempo de retenção muito similar (10,252 min) ao composto encontrado na amostra homóloga de colmos. Com base nisso e na análise por CCD, é muito provável que esse composto também seja o ácido *p*-cumárico.

Pertencendo à classe dos fenilpropanoides, o ácido *p*-cumárico já foi isolado em outras espécies de bambus (HOYWEGHEN *et al.*, 2012; WROBLEWSKA, 2019), apresentando atividade antioxidante significativa e grande biodisponibilidade para absorção intestinal em testes em ratos (ZHANG *et al.*, 2007) e função hepatoprotetora, inibindo a lipogênese no fígado (HEWAGE *et al.*, 2018). Também foi reportado como o composto majoritário em *S. quelpaertensis* e associado à inibição de melanogênese celular por inibir significativamente a enzima tirosinase (AN *et al.*, 2008)

Na fração *n*-butanol de folhas, os cromatogramas para $\lambda = 280$ nm e $\lambda = 325$ nm são apresentados abaixo (Figura 27). O composto com TR = 10,722 min, um pico de absorção em 260 nm, um ombro em 270 nm e outro pico com máximo em 370 nm apresenta tempo de retenção e espectro UV (formato de bandas e λ 's máx) muito similares aos da **quercetagetina-7-O-glicosídeo**, um flavonol glicosilado, com TR = 10,638 min (Figura 29) Portanto, é possível supor que este seja um dos compostos

majoritários da fração *n*-butanol de folhas de *G. chacoensis*, sendo necessária a confirmação por alguma outra técnica espectroscópica. O flavonoide quercetagina-7-*O*-glicosídeo, cuja presença só havia sido reportado para flores, mas para nenhuma espécie de bambu até a presente data, já foi associado à ação anti-inflamatória em ratos (TORDERA, FERRÁNDIZ e ALCARAZ, 1994) e ao efeito antioxidante e antidiabético do chá de crisântemo da neve, ou margaridinha escura, como é chamada no Brasil (*Coreopsis tinctoria* Nutt) (LAM *et al.*, 2016).

Figura 27. Cromatogramas obtidos para a fração *n*-butanol de folhas de *Guadua chacoensis* através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa C18 em 280 e 325 nm.

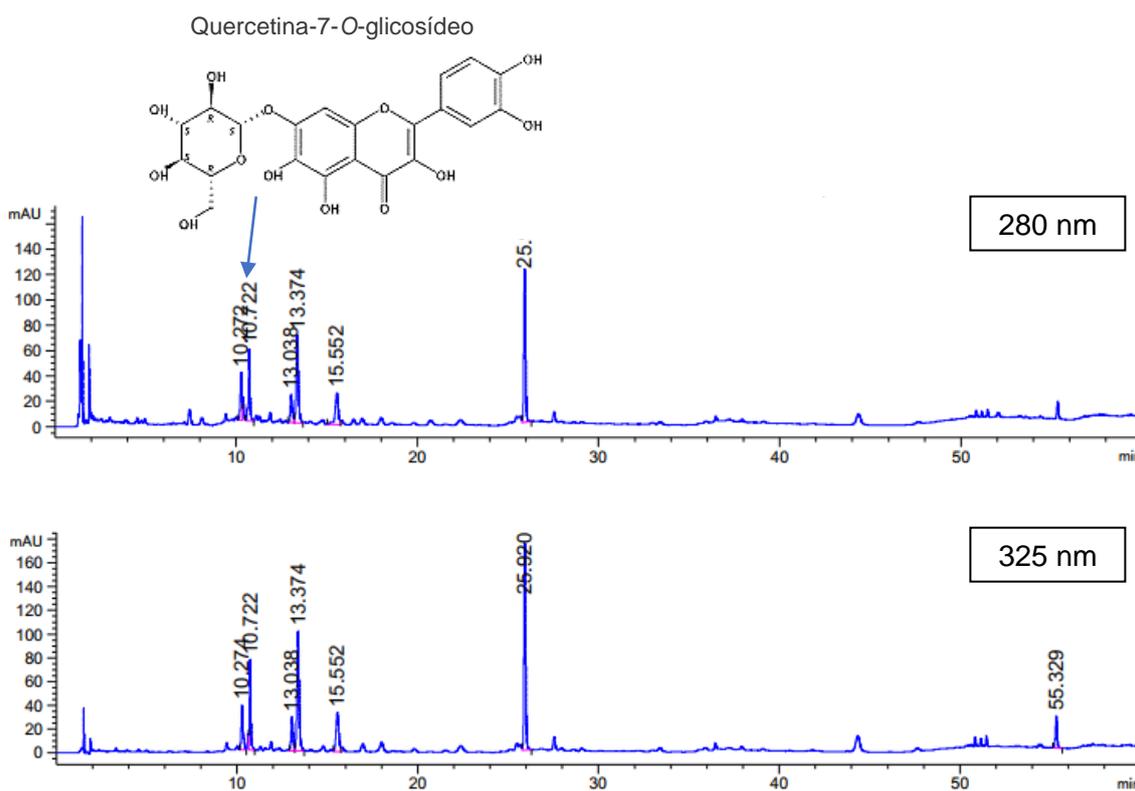


Figura 28. Espectro de absorção na região UV e tempo de retenção de um dos compostos majoritários de *Guadua chacoensis* registrado nos cromatogramas em 280 e 325 nm para a fração *n*-butanol de folhas através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa C18.

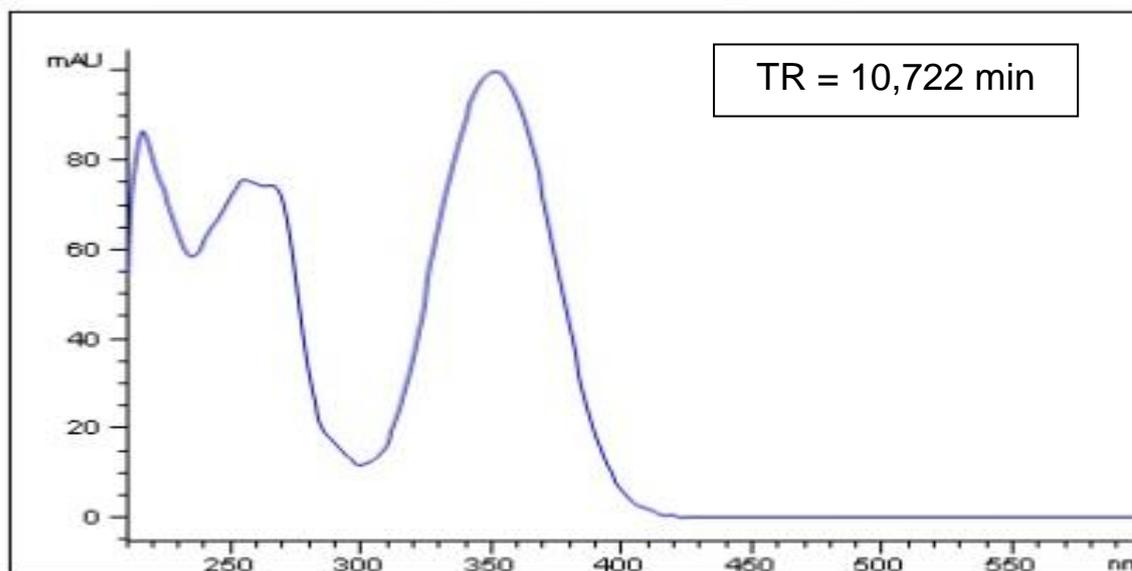
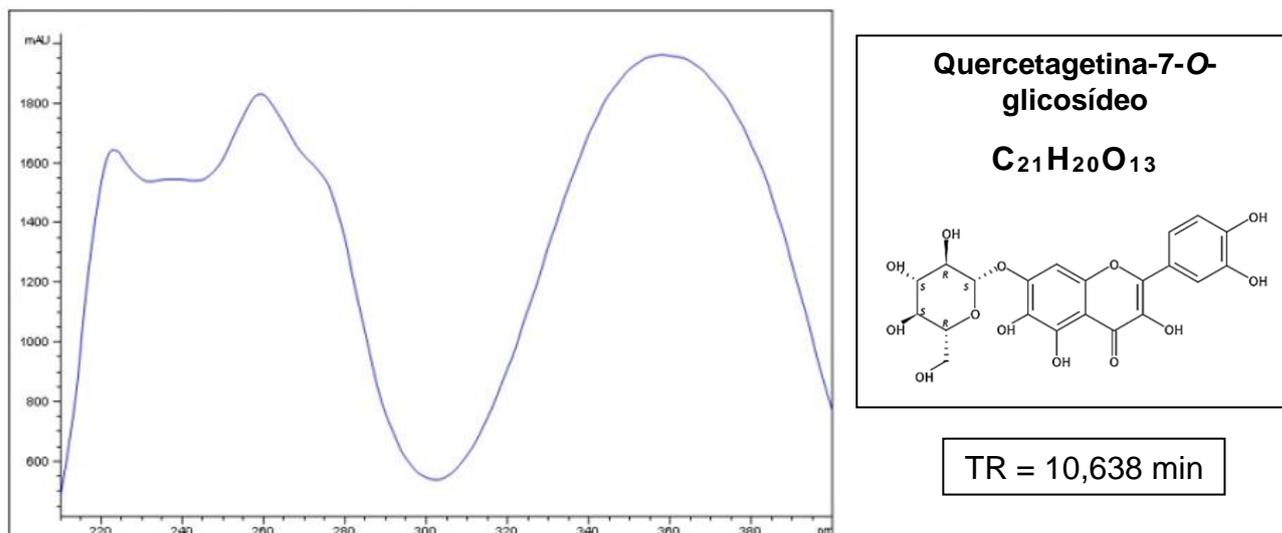


Figura 29. Espectro de absorção na região UV e tempo de retenção da quercetagina-7-O-glicosídeo.

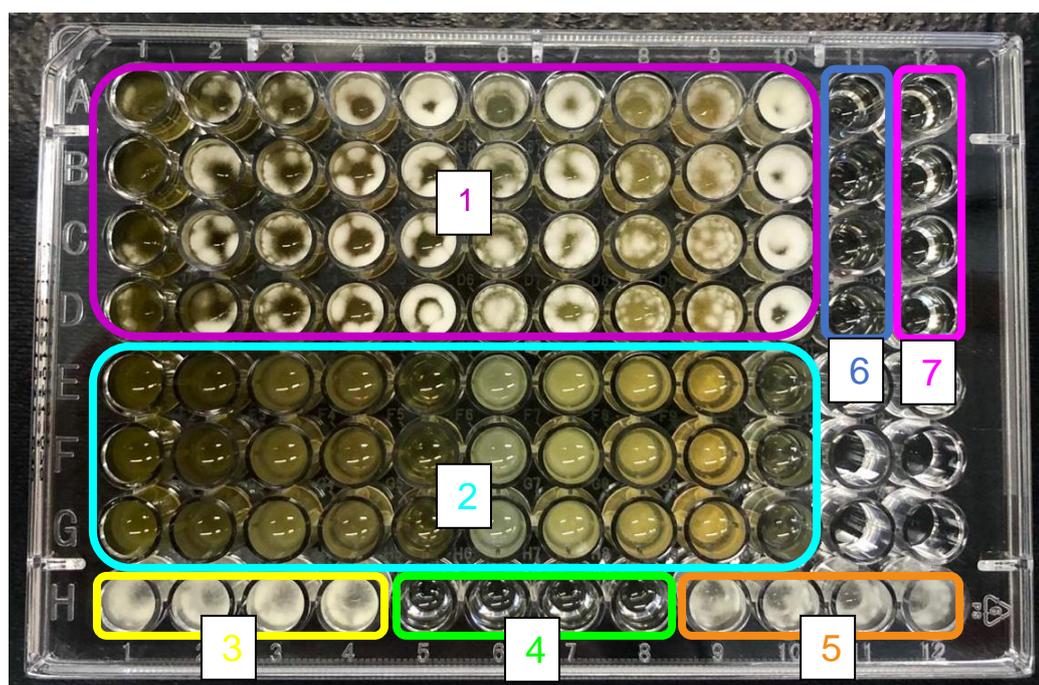


4.10 Atividade Antimicrobiana

Nos últimos anos tem-se observado uma tendência crescente em utilizar extratos de plantas como agentes antimicrobianos e antifúngicos, especialmente nas indústrias farmacêutica e alimentícia (GYAWALI e IBRAHIM, 2014). Os ensaios antimicrobianos realizados com extratos e frações de *G. chacoensis* foram feitos em

microplacas de 96 poços. A Figura 30, feita com o microrganismo *Aspergillus brasiliensis* ilustra a disposição dos componentes de estudo na placa e a aparência do mesmo após o devido tempo de incubação.

Figura 30. Microplaca de crescimento de *A. brasiliensis*.



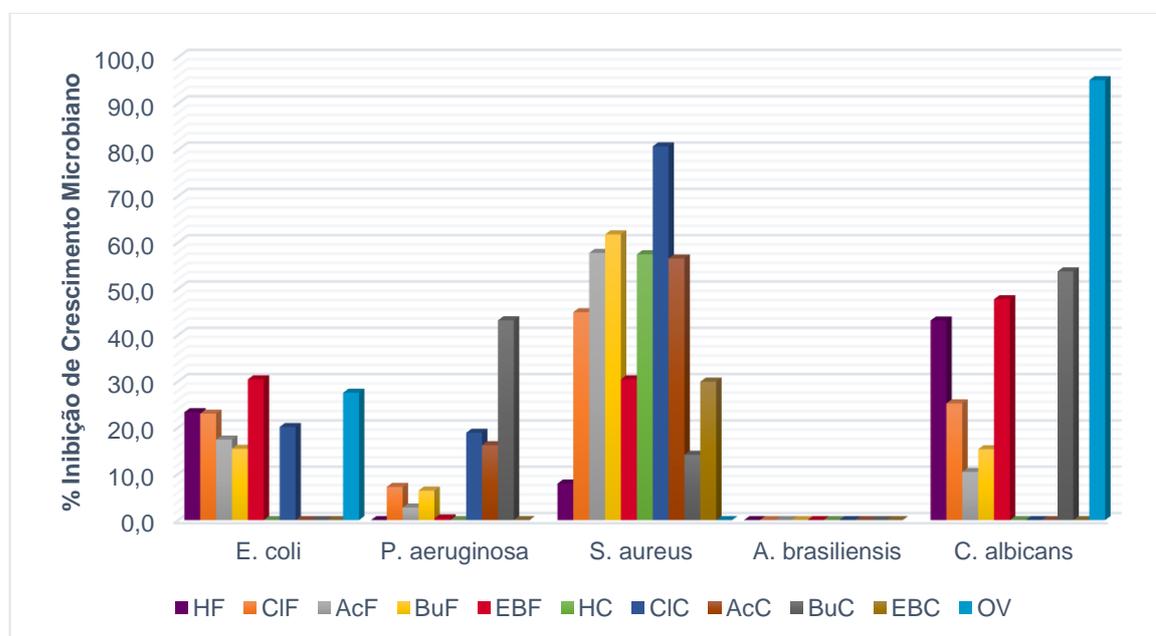
Fonte: próprio autor

Legenda:

- 1 Amostras: 190 μ L inóculo + 10 μ L amostra (inóculo = meio de cultura inoculado)
- 2 Branco de amostra: 190 μ L de meio de cultura não inoculado + 10 μ L amostra
- 3 Controle de crescimento: 200 μ L de inóculo
- 4 Branco de crescimento: 190 μ L de meio não inoculado + 10 μ L solvente
- 5 Controle de solvente: 190 μ L inóculo + 10 μ L solvente
- 6 Controle de esterilidade: 200 μ L meio de cultura não inoculado
- 7 Controle de antibiótico: 190 μ L inóculo + 10 μ L antibiótico (controle positivo)

As porcentagens de inibição de crescimento microbiano das diferentes frações e extratos brutos de *G. chacoensis* encontram-se na Figura 31.

Figura 31. Porcentagem de inibição do crescimento microbiano dos extratos brutos e frações de folhas e colmos de *G. chacoensis* [0,1 mg/mL] frente a cinco microrganismos: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) [$\sim 2 \cdot 10^2$ UFC/mL]. O óleo volátil [0,5 mg/mL] foi testado frente a *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans*. Controles positivos: clorafenicol (*E. coli* e *S. aureus*), amicacina (*P. aeruginosa*) e nistatina (*A. brasiliensis* e *C. albicans*).



Legenda: EB = extrato bruto, F = folhas, C = colmos, H = fração hexano, Cl = fração clorofórmio, Ac = fração acetato de etila, Bu = fração *n*-butanol, OV= óleo volátil.

Contra ***S. aureus*** todas as amostras apresentaram atividade, especialmente ClC (81%), BuF (62%) e AcF, HC e AcC (~56% cada). Para folhas, aumentando a polaridade da fração, aumentou-se a atividade. No entanto, os extratos brutos tiveram atividades próximas e baixas, apesar de atividades bem maiores das suas respectivas frações, o que indica certo grau de antagonismo entre compostos de diferentes polaridades. Na fração ClC foi onde houve a maior inibição. Então o composto mais ativo é de média polaridade e provavelmente tem uma boa interação com o peptidoglicano, um polímero constituído por açúcares e aminoácidos que originam uma espécie de malha formando a parede celular bacteriana e sendo mais espesso nas Gram-positivas (DHAR *et al.*, 2018). Desta forma, os extratos e frações de *G. chacoensis* podem ter potencial contra essa classe de bactérias, abrindo campo para maiores avaliações.

Contra *C. albicans* foi notória a atividade do óleo volátil, que inibiu 95% do crescimento. As amostras de folhas também apresentaram boa atividade, especialmente o extrato bruto (48%) e HF (43%). Entre as amostras de colmos, apenas BuC teve atividade (54%). No extrato bruto e frações de folhas a atividade antimicrobiana decrescia com o aumento da polaridade, então o microrganismo mostrou-se sensível a compostos pouco polares, especialmente os que se encontram na fração hexano. Isso vai de encontro com a atividade apresentada pelo óleo volátil, de natureza mais hidrofóbica. No entanto, pela atividade da fração BuC é possível perceber que existe outro composto, ou conjunto de compostos, bastante polar, ao qual essa levedura também é sensível.

Nenhum dos extratos e frações de colmos e folhas ou o óleo volátil foi capaz de inibir em 100% o crescimento de qualquer dos cinco microrganismos acima discriminados. Além disso, frente *A. brasiliensis* os extratos brutos e frações não apresentaram atividade, uma vez que se observou crescimento do microrganismo em todas as amostras (Figura 30). Também é importante destacar que, a concentração máxima que se pôde atingir com os extratos brutos e frações com os solventes utilizados no ensaio foi de 2 mg/mL, isto é, 100 µg/mL no poço, e ainda assim não houve atividade expressiva. Desta forma, a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), parâmetro que permite comparar a atividade antimicrobiana de diferentes extratos vegetais, não foi investigada, pois a CIM de todas as amostras estaria acima de 100 µg/mL no poço da microplaca, limite máximo aceitável para caracterizar um extrato vegetal como agente antimicrobiano viável (MORENO *et al.*, 2013).

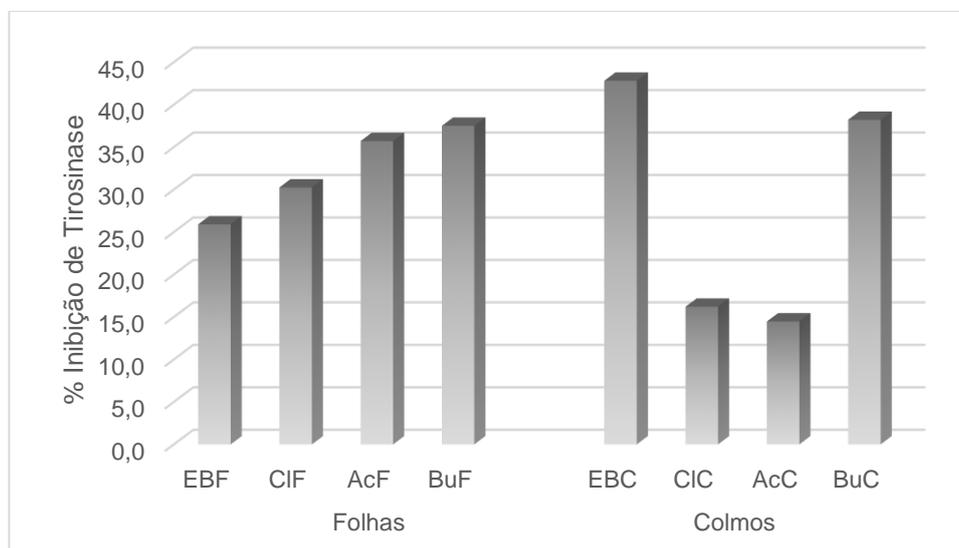
A espécie de bambu nativa do Brasil, *Apoclada simplex* McClure & L.B.Sm (ISSA, 2015), também apresentou atividade antimicrobiana baixa. Contudo, ao avaliar a associação dos extratos da espécie com conservantes sintéticos (metil e propilparabenos), constatou-se sinergia. Desta forma, a investigação desse efeito poderia ser melhor explorada utilizando-se outros conservantes e extratos vegetais. Além disso, fala-se muito sobre a inibição de microrganismos, porém ainda não existem estudos sobre bambus que avaliem a atividade pré-biótica, que poderia ser muito mais benéfica para manter ou aumentar a proteção que bactérias que habitam pele e tecidos de seres humanos nos oferecem contra patógenos (MAGUIRE e MAGUIRE, 2017).

4.11 Atividade Antitirosinase

A avaliação preliminar de compostos com suposta ação inibitória de tirosinase é comumente feita por ensaios *in vitro* utilizando a enzima extraída de cogumelos (LIM, ISHIGURO e KUBO, 1999), a qual correlaciona-se significativamente com a síntese de melanina nos melanócitos, células epidérmicas produtoras desse pigmento.

A porcentagem de inibição de tirosinase dos extratos brutos e frações de *G. chacoensis* acompanhada dos respectivos erros padrão encontram-se na Tabela 15. A representação gráfica encontra-se na Figura 32, cujos respectivos erros padrão não puderam ser representados em escala por serem inferiores a 0,005.

Figura 32. Porcentagem de inibição da tirosinase de cogumelos pelos extratos brutos de folhas, colmos, nas respectivas frações em clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol de *Guadua chacoensis* utilizando *L*-Dopa como substrato. Os erros-padrão não puderam ser representados em escala por serem inferiores a 0,005.



Legenda: EB = extrato bruto, F = folhas, C = colmos, CI = fração clorofórmio, Ac = fração acetato de etila, Bu = fração *n*-butanol.

Na análise de variância (ANOVA) One-Way para a inibição da enzima tirosinase foram considerados sete graus de liberdade, resultando um valor-P = 0,000 com intervalo de confiança de 95%, isto é, nível de significância $\alpha = 0,05$, e valor-F = 2309,41. Conforme abordagem no item 4.4 (Quantificação de fenólicos, p. 55), com valor-P < α e valor-F >> 1, há grande nível de significância e variabilidade entre as amostras. Além disso, utilizando o teste de comparação de Tukey temos que as amostras agrupadas abaixo com letras diferentes são significativamente distintas (Tabela 15).

Tabela 15. Porcentagem de inibição da tirosinase de cogumelos em amostras de *Guadua chacoensis* acompanhadas dos respectivos erros padrão e utilizando *L-Dopa* como substrato. As letras sobrescritas representam os grupos do teste de Tukey. Letras diferentes indicam amostras significativamente distintas.

Folhas		Colmos	
EBF	25,908 ± 0,002 ^e	EBC	42,819 ± 0,001 ^f
CIF	30,255 ± 0,005 ^a	CIC	16,212 ± 0,003 ^c
AcF	35,713 ± 0,005 ^b	AcC	14,471 ± 0,002 ^e
BuF	37,506 ± 0,003 ^e	BuC	38,220 ± 0,001 ^d

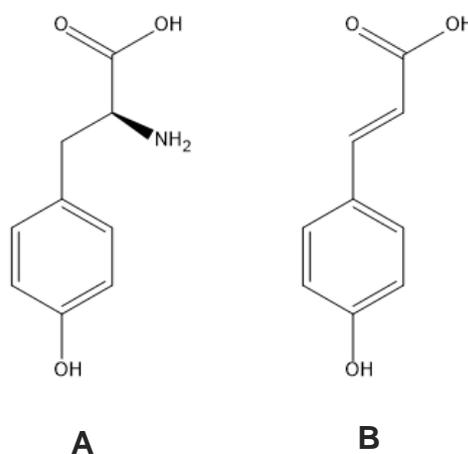
Legenda: EB = extrato bruto, F = folhas, C = colmos, Cl = fração clorofórmio, Ac = fração acetato de etila, Bu = fração *n*-butanol.

Lembrando que todas as amostras estavam a uma concentração final de 1 mg/mL, o extrato bruto de colmos apresentou a maior atividade dentre as amostras, seguido pelas frações *n*-butanol de colmos e de folhas. No extrato bruto de colmos deve haver um efeito sinérgico, pois a porcentagem de inibição da fração *n*-butanol foi muito próxima à do extrato e a atividade das frações clorofórmio e acetato foi bem menor, ao passo que nas frações de folhas percebeu-se que a atividade aumentava com o aumento da polaridade da fração, mesma tendência observada para o teor de flavonoides. Em uma revisão da literatura feita de 2008-2013 (ORHAN e KHAN, 2014), constatou-se que muitos flavonoides glicosilados, os quais estão presentes nas frações mais polares, possuem alto poder inibidor da tirosinase, o que explica a observação feita para as frações de folhas.

Dentre as substâncias mais largamente utilizadas como agentes clareadores, os compostos fenólicos figuram entre os principais, sendo que os ácidos fenólicos já foram associados à citotoxicidade para células de melanoma, suprimindo o crescimento e vascularização de tumores (KANLAYAVATTANAKUL e LOURITH, 2018).

Nos dois primeiros passos da biossíntese de melanina, a tirosinase catalisa a hidroxilação de *L*-tirosina a 3,4-diidroxifenilalanina (*L*-DOPA) e a oxidação de *L*-DOPA a dopaquinona (CHOI *et al.*, 2018). Por ter uma estrutura similar à *L*-tirosina (Figura 33) substrato da tirosinase, o ácido *p*-cumárico pode impedir a ligação ao sítio ativo da enzima por atuar de maneira competitiva com o substrato natural. Além disso, ele que mostrou-se muito mais potente que arbutina ou ácido kójico para inibir tirosinase, não apenas inibiu melanogênese celular, como também preveniu a perda de melanócitos de epiderme humana por exposição à radiação UV (efeito fotoprotetor) (SONG *et al.*, 2011). Nesse mesmo estudo, ácido *p*-cumárico mostrou-se mais efetivo contra tirosinase humana do que contra a de cogumelo.

Figura 33. Estrutura da *L*-tirosina (A) e ácido *p*-cumárico (B).



Portanto, dispor de boa capacidade antioxidante auxilia a evitar o escurecimento da epiderme. Levando isso em consideração e os dados obtidos, os extratos de *G. chacoensis*, e especialmente suas frações mais polares, que apresentaram boa capacidade antioxidante e moderada atividade contra tirosinase de cogumelos, dispõem de potencial promissor para inibir a melanogênese em células humanas e posterior aplicação cosmética em formulações contra hiperpigmentação da pele.

5. CONCLUSÕES

Neste projeto foi investigada a composição química de uma espécie de bambu nativa do Brasil e algumas atividades biológicas para seus extratos brutos e frações. Durante a condução do projeto percebeu-se que, apesar da quantidade crescente de estudos em relação a bambus, padronizar métodos de extração, obtenção dos extratos brutos e frações e indicar as concentrações dos reagentes nos diversos métodos é de suma importância para permitir comparações mais confiáveis das atividades biológicas de plantas.

Através da análise por CG-EM foi possível identificar 45 compostos diferentes no óleo essencial e nas frações e por CLAE-DAD foi possível detectar a presença de mais dois, sendo um deles um flavonol glicosilado (quercentagetina-7-O-glicosídeo) o qual só havia sido reportado para espécies de outras famílias. Além disso, verificou-se por CCD e depois por CLAE-DAD que os flavonoides normalmente encontrados em outras espécies de bambus não estão presentes em *Guadua chacoensis*. Isso muito provavelmente está relacionado ao processo de evolução e adaptação da espécie, levando a uma biossíntese de compostos diferentes e mais adequados ao ambiente onde ela cresce naturalmente. Além disso, é importante destacar a importância da complementaridade das diferentes técnicas utilizadas para identificar composição química dos extratos vegetais.

A atividade antimicrobiana, apesar de baixa para bactérias Gram-negativas, mostrou-se boa contra a espécie *S. aureus*, uma bactéria Gram-positiva. Então novos estudos poderiam ser conduzidos para avaliar a ação dos extratos de *G. chacoensis* frente outras bactérias dessa classe. Além disso, os estudos sobre bambus existentes concentram-se em avaliar a atividade de inibição, mas uma outra abordagem que vem

ganhando força nos últimos anos é avaliar a atividade pré-biótica, que pode ser muito mais benéfica para os seres humanos.

Muitos estudos apontam que o ácido *p*-cumárico, identificado no extrato bruto de colmos de *G. chacoensis*, apresentou atividade inibitória significativa de tirosinase em melanócitos. Considerando, então, a atividade antioxidante e atividade inibitória de tirosinase de cogumelo apresentadas pelas amostras, abre-se caminho para a investigação do efeito dos extratos em células humanas.

Por fim, os resultados obtidos mostraram-se promissores para uma futura utilização de extratos de *G. chacoensis* em formulações cosméticas com ação antioxidante ou que reduzam hiperpigmentação na pele.

6. REFERÊNCIAS

- 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. 4791–4801, 2004.
- ALVES, C. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- AN, S. M. *et al.* p-Coumaric acid, a constituent of *Sasa quepaertensis* Nakai, inhibits cellular melanogenesis stimulated by α -melanocyte stimulating hormone. **British Journal of Dermatology**, v. 159, p. 292–299, 2008.
- APUAMA , 2018. Disponível em: <<http://apuama.org/carbon-de-bambu-en-la-descontaminacion/>>. Acesso em: 05 ago. 2019.
- BARTHOLOMEW, O. I.; MAXWELL, E.; BITRUS, H. J. Phytochemical constituents and in vitro antioxidant capacity of methanol leaf extract of *Oxytenanthera abyssinica* (A. Rich Murno). **European Journal of Medicinal Plants**, v. 3, n. 2, p. 206–217, 2013.
- BERALDO, A. L.; AZZINI, A. **Bambu: características e aplicações**. Guaíba: Agropecuária, 2004.
- BRAZIER-HICKS, M. *et al.* The C-glycosylation of flavonoids in cereals, *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, p. 17926-17934, 2009.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 2. ed. Chichester: American Society of Plant Biologists, 2015.
- CAVALIERE, C. *et al.* Identification and mass spectrometric characterization of glycosylated flavonoids in *Triticum durum* plants by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom**, v. 19, p. 3143–3158, 2005.
- CHEN, *et al.* Bamboo-shaving polysaccharide protects against high-diet induced obesity and modulates the gut microbiota of mice. **Journal of Functional Foods**, v. 49, p. 20-31, 2018.
- CHOI, M.-H. *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, n. 409, p. 1–8, 2018.
- CLARK, L. G.; LONDOÑO, X.; RUIZ-SANCHEZ, E. Bamboo - Taxonomy and Habitat. In: **Bamboo, Tropical Forestry 10**. Tropical Forest Series. ed. [S.l.]: Springer International Publishing , 2015. Cap. 1, p. 1–30.
- COOPER, R.; NICOLA, G. **Natural Products Chemistry**. [S.l.]: CRC Press, 2015. 21 p.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products - A Biosynthetic Approach**. 3ª. ed. [S.l.]: Wiley, 2009.
- DHAR, S. *et al.* Cell-wall recycling and synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* – their role in the development of resistance, Review. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, p. 1–21, 2018.

- DING, Y. Q. *et al.* Chromatographic analysis of polysaccharides extracted from Chinese *Indocalamus tessellatus*. **Biomedical Chromatography**, v. 12, n. 2, p. 86-88, 1998.
- DOOL, H. D.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography, v. 11 , p. 463-471, 1963.
- DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. **Bambus no Brasil: Da biologia à tecnologia**. 1ed. ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2017.
- FERRERES, F. *et al.* Further knowledge on barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves O-glycosyl-C-glycosyl flavones by liquid chromatography- UV diode-array detection-electrospray ionisation mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1182, n. 1, p. 56-64, Fev 2008.
- FILGUEIRAS, T. S.; SANTOS-GONÇALVES, A. P. A checklist of the basal grasses and bamboos in Brazil (Poaceae). **Bamboo Science and Culture**, v. 18, p. 7–18, 2004.
- FLORA do Brasil 2020. **Reflora**, 2016. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB13247>>. Acesso em: 01 mar. 2020.
- FLORA do Brasil 2020. **Reflora**, 2016. Disponível em: <http://servicos.jbrj.gov.br/flora/search/Guadua_chacoensis>. Acesso em: 29 fev. 2020.
- 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. 642–645, 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*. **South African Journal of Botany**, v. 115, p. 24–30, 2018.
- GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery, v. 12, p. 306–317, 2008.
- GUERREIRO, C. Flowering cycles of woody bamboos native to southern South America. **Journal of Plant Research**, v. 127, p. 307–313, 2014.
- GUO, M. *et al.* Evaluating the Environmental Health Effect of Bamboo-Derived Volatile Organic Compounds through Analysis the Metabolic Indices of the Disorder Animal Model. **Biomed Environ Sci.**, v. 28, n. 8, p. 595-605, 2015.
- GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents – Review. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572–584, 2002.
- HEWAGE, K. *et al.* Phenolic acid and flavonoid-rich fraction of *Sasa quelpaertensis* Nakai leaves prevent alcohol induced fatty liver through AMPK activation. **Journal of Ethnopharmacology** , v. 224 , p. 335–348, 2018.
- 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.

HOYWEGHEN, L. V. *et al.* Phenolic Compounds and Anti-oxidant Capacity of Twelve Morphologically Heterogeneous Bamboo species. **Phytochemical. Analysis**, v. 23, p. 433–443, 2012.

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

HUANG, J.-Q. *et al.* Isolation, chemical characterization, and immunomodulatory activity of naturally acetylated hemicelluloses from bamboo shavings. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**, v. 18, n. 2, p. 138-151, 2017.

HUH, M. *et al.* Inhibitory Effects of *Phyllostachys bambusoides* on Melanin Synthesis and Tyrosinase Activity in Cultured Human Melanoma Cells. **Journal of Life Science**, v. 24, n. 3, p. 284-289, 2014.

IDHA, K.; GUNAWAN, I. Natural Antioxidants in Cosmetics. In: ATTA-UR-RAHMAN **Studies in Natural Products Chemistry**. Surabaya: Dharmawangsa Dalam, v. 40, 2013. Cap. 15, p. 485-505.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1821-1835, 2011.

IKAWA, M. *et al.* Utilization of Folin – Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1811-1815, 2003.

ILHAM, A. M. *et al.* Antioxidant and antityrosinase properties of malaysian bamboo leaf extracts. **Journal of Tropical Forest**, v. 20, n. 2, p. 123-131, 2008.

INBAR. **International Network for Bamboo and Rattan**, 2010. Disponível em: <<http://www.inbar.int/>>. Acesso em: 24 fev. 2020.

ISSA, F. I. C. **Avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos de *Apoclada simplex* McClure & Smith (Poaceae: Bambusoideae)**. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2015.

JIN, Y.; 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. 4318-4327, 2011.

JUDZIEWICZ, E. J. *et al.* American bamboos. 392. ed. Washington, DC: Smithsonian Institution Press, 1999.

KANLAYAVATTANAKUL, M.; LOURITH, N. Plants and Natural Products for the Treatment of Skin Hyperpigmentation – A Review. **Planta Medica**, v. 84, p. 988–1006, 2018.

KUROKAWA, T. *et al.* Antioxidant activity of a novel extract from bamboo Grass (AHSS) against ischemia-reperfusion injury in rat small intestine. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 2301-2303, 2006.

LAM, S. *et al.* Chemical characteristics of different parts of *Coreopsis tinctoria* in China using microwave-assisted extraction and high-performance liquid chromatography followed by chemometric analysis. **Journal of Separation Science**, v. 39, n. 15, p. 2885–3092, Ago 2016.

- LEUNG, H. *et al.* The natural agent 4-vinylphenol targets metastasis and stemness features in breast cancer stem-like cells. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 82, p. 185–197, 2018.
- LIM, J.; ISHIGURO, K.; KUBO, I. Tyrosinase Inhibitory p-Coumaric Acid from Ginseng Leaves. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 371–375, 1999.
- LIU, *et al.* Structure characterization and hypoglycemic activity of an arabinogalactan from *Phyllostachys heterocycla* bamboo shoot shell. **Carbohydrate Polymers**, v. 201, p. 189-200, 2018.
- LIZARAZU, M. A.; AGRASAR, Z. E. R. D.; VEGA, A. S. A New Species of *Guadua* (Poaceae, Bambusoideae, Bambuseae) and Synopsis of the Genus in Argentina and Neighboring Regions. **American Society of Plant Taxonomists**, v. 38, n. 4, p. 1062–1075, 2013.
- LOBOVIKOV, *et al.* **World bamboo resources – A thematic study prepared in the framework of the Global Forest Resources Assessment**. FAO-UN. [S.l.]. 2005.
- LONDOÑO, X.; PETERSON, P. M. *Guadua chacoensis* (Poaceae: Bambuseae): Its Taxonomic Identity, Morphology, and Affinities. **Missouri Botanical Garden Press**, v. 2, n. 1, p. 41-47, 1992.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. 1^a. ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 1970. 42 p.
- MACWAN, C.; PATEL, H. V.; KALIA, K. A comparative evaluation of in vitro antioxidant properties of bamboo *Bambusa Arundinacea* leaves extracts. **Journal of Cell and Tissue Research**, v. 10, n. 3, p. 2413-2418, 2010.
- MAGUIRE, M.; MAGUIRE, G. The role of microbiota, and probiotics and prebiotics in skin. **Arch Dermatol Res**, v. 309, p. 411–421, 2017.
- MCCLURE, F. A. . Genera of bamboos native to the New World (Gramineae: Bambusoideae). [S.l.]: [s.n.], v. 9, 1973. p. 1-148.
- MIRANDA, C. *et al.* Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016.
- 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, p. 3040-3078, 2013.
- MURUGESU, E. A. Characterization of α -Glucosidase Inhibitors from *Clinacanthus nutans* Lindau Leaves by Gas Chromatography-Mass Spectrometry-Based Metabolomics and Molecular Docking Simulation. **Molecules** , v. 23, n. 2402, p. 2-21, 2018.
- NICORA, E. G.; RÚGOLO DE AGRASAR, Z. E. Los generos de gramineas de America Austral, 1987.
- NIRMALAA, C. *et al.* Bamboo: A rich source of natural antioxidants and its applications in the. **Trends in Food Science & Technology**, v. 77 , p. 91–99, 2018.
- NISHINA, A.; UCHIBORI, T. Antimicrobial Activity of 2,6-Di-Methoxy-Para-Benzoquinone, Isolated From Thick-Stemmed Bamboo, and Its Analogs. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 2395–2398, 1991.

NOIA, P. **Sustentabilidade Socioambiental: Desenvolvimento de sistemas construtivos em bambu no Vale do Ribeira, SP**. USP. São Paulo. 2012.

ORHAN, I.; KHAN, M. Flavonoid Derivatives As Potent Tyrosinase Inhibitors – A Survey of Recent Findings Between 2008-2013. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1486-1493, 2014.

PANDEY, K. B. . R. S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity** , v. 2, n. 5, p. 270-278, December 2009.

PARK, E.; JHON, D. The antioxidant, angiotensin converting enzyme inhibition activity, and phenolic compounds of bamboo shoot extracts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 655–659, 2010.

PEREA-RIVAS, J. *et al.* **Evaluación y documentación de prácticas sobresalientes sobre el manejo de la cosecha y maduración de la Guadua em el departamento del Huila**. Ministerio de agricultura y desarrollo rural. Huila, Neiva, Colombia. 2003.

PETERSON, G. L. Review of the Folin Phenol Protein Quantification Method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. **Analytical Biochemistry**, v. 100, p. 201-220, 1979.

POZZI, A. C. S. **Desenvolvimento de métodos de análise espectrofotométrica de flavonoides do maracujá**. Universidade de São Paulo. [S.l.], p. 73. 2007.

RAZZAGHI-ASL, N. *et al.* Antioxidant Properties of Hydroxycinnamic Acids: A Review of Structure- Activity Relationships. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 36, 2013.

RONTANI, J.; NASSIRY, M.; MOUZDAHIR, A. Free radical oxidation (autoxidation) of α -tocopherol(vitamin E) - A potential source of 4,8,12,16-tetramethylheptadecan-4-olide in the environment. **Organic Geochemistry**, v. 38 , p. 37–47, 2007.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 136–141, 2012.

SONG, K. *et al.* Comparison of the antimelanogenic effects ofp-coumaric acid and its methyl esterand their skin permeabilities. **Journal of Dermatological Science**, v. 63, p. 7–22 , 2011.

SORENG, *et al.* A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae) II - An update and a comparison of two 2015 classifications. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 55, n. 4, p. 259–290, Jul 2017.

SU, Y. *et al.* Isolation of the Flavonoid from Bamboo Residues and Its Application as Metal Ion Sensor in Vitro. **Polymers**, v. 11, n. 1377, p. 1-16, 2019.

SULAIMAN, O. *et al.* The inhibition of microbial growth by bamboo vinegar. **Journal of Bamboo and Rattan**, v. 4, n. 1, p. 71-80, 2005.

SUPORTE ao Minitab® 19. Disponível em: <<https://support.minitab.com/pt-br/minitab/19/help-and-how-to/statistics/basic-statistics/supporting-topics/tests-of-means/what-are-degrees-of-freedom/>>. Acesso em: 07 mar. 2020.

TAKAHASHI, T.; MIZUI, K.; MIYAZAWA, M. Volatile Compounds with Characteristic Odour in Moso-Bamboo stems (*Phyllostachys pubescens* Mazel ex Houz. De ehaie). **Phytochemical Analysis**, v. 21, p. 489–495, 2010.

TAO, C. *et al.* Antimicrobial activities of bamboo (*Phyllostachys heterocycla* cv. *Pubescens*) leaf essential oil and its major components. **European Food Research Technology**, v. 244, n. 5, p. 881–891, 2018.

TORDERA, M.; FERRÁNDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Influence of Anti-Inflammatory Flavonoids on Degranulation and Arachidonic Acid Release in Rat Neutrophils. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 49c, p. 235-240, 1994.

TRIPATHI, Y. C.; JHUMKA, Z.; ANJUM, N. Evaluation of total polyphenol and antioxidant activity of leaves of *Bambusa nutans* and *Bambusa vulgaris*. **Journal of Pharmacy Research**, v. 9, p. 271–277, 2015.

URSINI, F. *et al.* Optimization of nutrition: polyphenols and vascular protection. **Nutrition Reviews**, v. 57, p. 241–249, 1999.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis — A thin layer chromatography atlas**. 2^a. ed. Munich: Springer, 1996. 212 p.

WEDLER, J. *et al.* In vitro anti-inflammatory and wound healing potential of a *Phyllostachys edulis* leaf extract – Identification of Isoorientin as an active compound. **Planta Medica**, v. 80, p. 1678–1684, 2014.

WROBLEWSKA, K. B. **Atividade antioxidante e fotoprotetora de bambus nativos do Sudeste brasileiro**. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2019.

WYSOCKI, W. P. *et al.* Evolution of the bamboos (Bambusoideae; Poaceae): a full plastome phylogenomic analysis. **BMC Evolutionary Biology**, 15, n. 50, 2015. 1-12.

YANG, F.-C. *et al.* Preparation and characterization of functional fabrics from bamboo charcoal/silver and titanium dioxide/silver composite powders and evaluation of their antibacterial efficacy. **Materials Science and Engineering**, v. 32, n. 5, p. 1062-1067, Jul 2012.

YANG, J. *et al.* Potent Anti-Inflammatory and Antiadipogenic Properties of Bamboo (*Sasa coreana* Nakai) Leaves Extract and Its Major Constituent Flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, p. 6665-6673, 2017.

YOUNG, S. M. **The Taxonomy and Natural History of the *Bambusa guadua* Complex (Poaceae: Bambusoideae)**. University of Florida. Gainesville. 1985.

ZAYNAB, M. *et al.* Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, p. 198-202, 2018.

ZHANG, J. *et al.* The effects of 4-hydroxybenzoic acid identified from bamboo (*Dendrocalamus asper*) shoots on Kv1.4 channel. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 25, n. 1, p. 101–113, 2018.

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

ZHANG, Y. *et al.* Safety evaluation of a triterpenoidrich extract from bamboo shavings. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1867-1875, 2004.

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

ZHANG, Y. *et al.* Anti-fatigue Activity of a Triterpenoid-rich Extract from Chinese Bamboo Shavings (*Caulisbamfusae in taeniam*). **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 872 – 876, 2006.

ZHANG, Y. *et al.* Metabolism of flavone C-glucosides and p-coumaric acid from antioxidant of bamboo leaves (AOB) in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 97, p. 484–494, 2007.

ZHAOA, X. *et al.* Anti-ageing skin effects of Korean bamboo salt on SKH1 hairless mice. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 103 , p. 1–13, 2018.