Janayne Gagliano

**Análise do potencial farmacológico de *Merostachys pluriflora* Munro ex. E. G.
Camus., uma espécie de bambu nativo da Mata Atlântica.**

**Analysis of the pharmacological potential of *Merostachys pluriflora* Munro ex. E.
G. Camus., a specie of native bamboo from Atlantic Forest.**

VERSÃO CORRIGIDA

**São Paulo
2016**

Janayne Gagliano

Análise do potencial farmacológico de *Merostachys pluriflora* Munro ex. E. G.

Camus., uma espécie de bambu nativo da mata atlântica.

Analysis of the pharmacological potential of *Merostachys pluriflora* Munro ex. E.

G. Camus., a specie of native bamboo from Atlantic Forest.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de Título de
Mestre em Botânica, na Área de
Recursos Econômicos Vegetais.

Orientadora: Prof^a Dr.^a Cláudia Maria Furlan

SÃO PAULO

2016

Gagliano, Janayne

Análise do potencial farmacológico de *Merostachys pluriflora* Munro ex. E. G. Camus., uma espécie de bambu nativo da Mata Atlântica.

102 páginas.

Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

Palavra-Chave: bambus, Mata Atlântica, substâncias fenólicas, antioxidantes, antimicrobiano, anti-HIV-1

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Cláudia Maria Furlan
Orientadora

A aquele que foi meu melhor amigo, meu pai.

Agradecimentos

Foram tantas pessoas queridas envolvidas durante esse período, que espero não esquecer ninguém em meus agradecimentos!

À minha querida família, em especial meus pais Eduardo e Neide, pelo apoio de uma vida inteira, por sempre acreditarem em mim e me incentivarem incessantemente a seguir os meus sonhos, pois sem eles eu não teria chego até aqui. Aos meus irmãos, Aline e Renan, por todo apoio, conselhos, amizade, muitíssimo obrigada meus amores!

Ao meu noivo Rogério, por todo seu companheirismo, paciência, apoio, e por acreditar no meu potencial, obrigada amor!

À minha mãe de coração, Maria, por ter me conduzido ao caminho das plantas, por todo o seu amor e conhecimento sobre elas, obrigada minha querida!

À minha querida orientadora Cláudia, por todo aprendizado, por sua dedicação, apoio, paciência; e principalmente por ter me aceito como sua aluna, foi um privilégio ter trabalhado com você durante esses dois anos, muito obrigada Clau!

Aos professores da fitoquímica, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Ao professor Marcelo por toda ajuda com as análises de RMN, a professora Deborah por todas as valiosas contribuições em minha banca de qualificação, aos professores, Maria Luiza e Antonio Salatino, por suas aulas incrivelmente inspiradoras, muito obrigada a todos!

A todos os amigos que fiz no laboratório de fitoquímica, em especial, Cris, Cinthia, Fê Anselmo, Fê Rezende, Wilton, Priscila, Alice, Kátia, Dalila, muito obrigado por todos os almoços, cafés, conversas, risadas, ajudas na bancada, valeu turma!!!

Aos funcionários do laboratório de fitoquímica, Mourisa e Aline, por toda ajuda com as análises das amostras, pelas dicas, paciência; ao Leandro, por todo o suporte na organização dos laboratórios, muito obrigada a todos!

Aos meus queridos amigos da graduação, Ani e Leo, por toda amizade durante esses anos, pelo companheirismo, por todos os momentos que estivemos juntos, obrigada amigos!

À minha querida amiga Aline Lopes, por ter me apresentado ao “mundo dos bambus”, muito obrigada!

Às pesquisadoras do IBt, Maria Tereza Guaratini, por toda ajuda na escolha e coleta da espécie de estudo; à Regina Shirasuna, pela identificação da mesma, muito obrigada!

Ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo por conceder toda a infraestrutura para a realização deste projeto; e a CAPES pela viabilização financeira, através da bolsa concedida.

Índice

Capítulo 1 - Introdução Geral	3
1. Introdução	3
1.1. Bambus: filogenia, distribuição geográfica e ecologia	3
1.2. Bambus: uso na medicina tradicional	6
1.3. Espécie vegetal de estudo	8
1.4. Área de coleta	9
2. Justificativa e Hipóteses	10
3. Objetivos	11
4. Referências Bibliográficas.....	12
Capítulo 2 - Caracterização química de <i>Merostachys pluriflora</i>	15
1. Introdução	17
1.1. Os metabólitos vegetais	17
2. Materiais e Métodos	22
2.1. Preparo das amostras.....	22
2.1.1. Extração e partição	22
2.2. Quantificações de metabólitos primários	23
2.2.1. Amido	23
2.2.2. Carboidratos solúveis.....	24
2.2.3. Lipídeos	25
2.3. Quantificações de substâncias fenólicas.....	26
2.3.1. Doseamento de fenóis totais	26
2.3.2. Doseamento de flavonas/flavonóis	26
2.3.3. Doseamento de proantocianidinas (Taninos condensados).....	26
2.3.4. Doseamento de taninos totais	27
2.3.5. Caracterização e quantificação das substâncias fenólicas via CLAE-DAD	27
2.4. Fracionamento via CLAE-DAD semi-preparativo.....	28
2.5. Identificação via Ressonância Magnética Nuclear (RMN) dos constituintes fenólicos isolados	28
3. Resultados e Discussão.....	29
3.1. Rendimentos dos extratos e fases	29
3.2. Quantificações de metabólitos primários	30
3.2.1. Amido e carboidratos solúveis	30
3.2.2. Lipídeos	31
3.3. Quantificação de substâncias fenólicas.....	34

3.3.1. Fenóis totais e flavonoides.....	34
3.3.2. Taninos totais e proantocianidinas	36
3.3.3. Caracterização e quantificação de substâncias fenólicas via CLAE-DAD	37
3.4. Fracionamento e identificação dos constituintes fenólicos via RMN	46
4. Conclusões.....	51
5. Referências bibliográficas.....	52
Capítulo 3 - Potencial biológico dos extratos, fases e substâncias isoladas de <i>Merostachys pluriflora</i>	55
1. Introdução	57
1.1. Atividades biológicas dos produtos naturais	57
1.1.1. Atividade antioxidante	57
1.1.2. Atividade antimicrobiana	60
1.1.3. Atividade anti-HIV	62
2. Materiais e Métodos	64
2.1. Ensaio de atividade antioxidante <i>in vitro</i>	64
2.1.1. Ensaio do sequestro do radical DPPH	64
2.1.2. Ensaio do sequestro do radical ABTS	65
2.1.3. Ensaio da atividade redutora de ferro III a ferro II (FRAP).....	65
2.1.4. Ensaio da atividade quelante de metais	66
2.1.5. Ensaio antioxidante ORAC (<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>).....	66
2.2. Ensaio de inibição da enzima transcriptase reversa (Anti-HIV1)	67
2.3. Ensaio antimicrobiano.....	68
3. Resultados e Discussão.....	69
3.1. Atividade antioxidante	69
3.2. Ensaio de inibição da enzima transcriptase reversa (Anti-HIV1).....	77
3.3. Ensaio antimicrobiano	78
4. Conclusões.....	83
5. Referências Bibliográficas.....	84
Considerações finais.....	89
Resumo	95
Abstract	97
Anexos	99

Capítulo 1 - Introdução Geral

1. Introdução

1.1. Bambus: filogenia, distribuição geográfica e ecologia

Os bambus pertencem à Poaceae, popularmente conhecida por gramíneas, é uma das famílias de angiospermas mais amplamente distribuída pelos continentes, representando cerca de 40% da cobertura vegetal do mundo (Gibson *et al.*, 2009). Possui 771 gêneros e 12.074 espécies, sendo considerada a quarta maior família em número de espécies do mundo (Soreng *et al.*, 2015). De acordo com Filgueiras *et al.* (2012), no Brasil já foram registradas a ocorrência de 210 gêneros e 1.413 espécies de Poaceae.

Essa família é considerada um grupo monofilético e pertence à Poales (APG III, 2009; APG IV, 2016). São reconhecidas 12 subfamílias em Poaceae (Figura 1.1), sendo elas: Anomochlooideae, Aristidoideae, Arundinoideae, Bambusoideae, Chloridoideae, Danthonioideae, Micraioideae, Oryzoideae, Panicoideae, Pharoideae, Puelioideae e Pooideae (Soreng *et al.*, 2015).

Os bambus pertencem à subfamília Bambusoideae, que compreende 1641 espécies, divididas em 120 gêneros e 3 tribos (Soreng *et al.*, 2015). A tribo Arundinarieae possui 621 espécies, divididas em 31 gêneros, são espécies quase que exclusivas da Eurásia, possuindo apenas 3 representantes que ocorrem na América do Norte; já a tribo Olyreae (bambus herbáceos) possui 127 espécies, divididas em 21 gêneros, as espécies dessa tribo ocorrem principalmente nas florestas tropicais da América do Sul e da América Central; e por fim, a tribo Bambuseae (bambus lenhosos) detém 893 espécies agrupadas em 68 gêneros, já as espécies dessa tribo ocorrem em toda região tropical (Soreng *et al.*, 2015).

Os bambus estão amplamente distribuídos na região tropical e subtropical do globo (Figura 1.2). Contudo, o centro de maior diversidade está no continente asiático, com aproximadamente 937 espécies, seguido da América do Sul com 258 espécies e por último o continente africano com apenas cinco espécies (Das *et al.*, 2008).

Figura 1.1 - Filogenética da família Poaceae. Os triângulos são proporcionais ao tamanho dos táxons, sendo a subfamília Poinae a maior; subfamílias representadas pela sigla BOP: Bamusoideae, Oryzoideae e Pooideae; subfamílias do grupo PACMAD: Panicoideae, Aristidoideae, Chloridoideae, Micrairoideae, Arundinoideae e Danthonioideae. Fonte: Soreng *et al.*, 2015.

Figura 1.2 – Distribuição geográfica de espécies de bambus no globo destacada em vermelho. Fonte: GPWG, 2001.

As gramíneas, no geral, tendem a ocorrer como pioneiras nos mais variados ambientes, e são espécies que normalmente resistem à seca (Chapman, 1996). Os bambus possuem uma grande plasticidade fenotípica, podendo se desenvolver em meio a florestas, disputando lugar em meio a enormes dosséis, mas também possuem facilidade de se desenvolver em meio a clareiras na floresta, podendo vir a se tornar a espécie dominante, apresentando distribuição pantropical. Os bambus possuem flores trímeras e algumas espécies apresentam ciclos de vida que podem durar décadas entre a germinação e a floração (Chapman, 1996).

Segundo Filgueiras e Gonçalves (2004), algumas características morfológicas distinguem os bambus entre herbáceos e lenhosos. Por exemplo, os bambus herbáceos normalmente possuem menos de 2 metros de altura, o tipo de ramificação é simples, os colmos não são fortemente lignificados, podendo ser facilmente quebrados, as flores são unissexuadas, o tipo de floração é contínuo, além do mais, são espécies que não toleram uma exposição direta ao sol. Já os bambus considerados lenhosos podem apresentar tamanhos variados de 1 a 35 metros de altura, o tipo de ramificação é complexo, os colmos são bem lignificados, as flores são bissexuais e o tipo de florescimento é monocárpico, ou seja, sazonal, são espécies que toleram uma incidência solar direta.

Dos países do novo mundo, o Brasil é detentor da maior diversidade de espécies de bambus, com 34 gêneros e 232 espécies nativas (Filgueiras e Gonçalves, 2004). No Brasil existem 18 gêneros de bambus lenhosos, seis desses gêneros são endêmicos, com aproximadamente 155 espécies, sendo 83% delas endêmicas (129 espécies). Já no que se refere aos bambus herbáceos, o país é detentor de 16 gêneros, com aproximadamente 75 espécies, sendo 45 endêmicas (Filgueiras e Gonçalves, 2004).

O bioma brasileiro que concentra a maior diversidade de bambus é a Mata Atlântica com 65% das espécies, seguido da Amazônia com 20% da diversidade e o Cerrado com 9% (Filgueiras e Gonçalves, 2004). As florestas costeiras da Bahia são a área de maior endemismo e diversidade de bambus no Brasil, representando 48% dos gêneros neotropicais (Clark, 1990).

Dos bambus lenhosos que ocorrem no Brasil, o gênero *Merostachys* Spreng é o mais especioso, com 53 espécies, sendo 50 delas endêmicas, seguido dos gêneros *Chusquea* Kunth (40 spp.) e *Guadua* Kunth (16 spp.) (Filgueiras e Gonçalves, 2004).

Como ressalta Shirasuna *et al.* (2013), o Brasil é o centro de diversidade de *Merostachys*, com uma grande quantidade de espécies descritas, mas insuficientemente conhecidas, com muitas espécies endêmicas, carecendo de estudos adequados para as diversas espécies que ocorrem no Brasil, principalmente estudos que abordem os aspectos químicos dessas espécies, deixando este vasto campo aberto a ser explorado.

1.2. Bambus: uso na medicina tradicional

Embora o Brasil possua a maior diversidade de bambus do continente americano, essas espécies são desconhecidas pela população, acreditando-se que todos os bambus encontrados no país sejam exóticos, provindos do continente asiático. Contudo, alguns pesquisadores brasileiros têm se empenhado para desmistificar esse pensamento e divulgar o conhecimento sobre os bambus nativos.

Em contrapartida, no continente asiático, nos países como a China, Índia e Japão os bambus estão fortemente inseridos na cultura desses povos, são mais do que espécies vegetais, o bambu representa um estilo de vida, uma filosofia para esses povos (Recht e Wetterwald, 1992).

O bambu é considerado uma das quatro plantas nobres da China, e junto com a orquídea, ameixa e o crisântemo, inspirou as artes como a caligrafia, pintura e poesia (Recht e Wetterwald, 1992). Com exceção do arroz, nenhuma outra planta desempenhou um papel tão importante na história da China e do Oriente como os bambus, eles estão presentes no dia a dia dessas populações, desde utensílios de uso doméstico, na alimentação, na construção de moradias, na fabricação de papel e muitos outros (Laws, 2013).

Assim como outras plantas, os bambus têm sido utilizados para fins medicinais e nutricionais por séculos pelos povos asiáticos. Os brotos de algumas espécies de bambus são consumidos *in natura* até os dias atuais e são considerados muito nutritivos, fonte de vitaminas e minerais (Mejía *et al.*, 2009), além de fonte de substâncias fenólicas bioativas (Nirmala *et al.*, 2014).

Já as aplicações medicinais dos bambus são descritas em diferentes farmacopeias asiáticas de medicina tradicional (Tripathi, 2011). Por exemplo, na medicina tradicional indiana, conhecida como Ayurvédica, assim como na medicina tradicional chinesa e tibetana, os bambus são utilizados para o tratamento de diversos males, sendo muito utilizados para o tratamento de doenças respiratórias, problemas gastrointestinais, para o tratamento da febre, dentre outros usos (Tripathi, 2011; Laws 2013).

Kumar *et al.* (2012) reportam que as folhas de *Bambusa vulgaris* Linn, uma espécie proveniente da Índia, são muito utilizadas popularmente como adstringente, febrífugas, como soluções oftálmicas, além de serem utilizadas como abortivo, estimulante do apetite, para o tratamento de doenças respiratórias e de gonorreia. Os mesmos autores relatam que no extrato aquoso dessa espécie foram encontrados alcaloides, alguns compostos fenólicos como flavonoides, taninos e antraquinonas, além de tepenoides como as saponinas.

Mediante de um levantamento etnobotânico realizado em um vilarejo na Índia, Sharma e Borthakur (2008) relatam o uso de *Bambusa tulda* Roxb para o tratamento de tétano, *Dendrocalamus giganteus* Wall ex. Munro para a produção de drogas estereoidais, a decocção de

folhas de *Dendrocalamus strictus* (Roxb.) Ness como abortiva e a infusão de folhas de *Schizostachyum capitatum* (Trin.) Rupr, para o tratamento de dores estomacais.

Shukla *et al.* (2012) ressaltam que nos livros de medicina tradicional chinesa, há relatos de que todas as partes do bambu encontram aplicações medicinais, as folhas em especial, são muito utilizadas para tratamento da febre.

Sangeetha *et al.* (2015) em um compilado sobre o potencial medicinal e farmacológico dos bambus ressaltam as diferentes atividades biológicas que têm sido atribuídas para algumas espécies de bambus, como atividade antitumoral, antidiabética, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, dentre outras.

Algumas espécies de *Phyllostachys* Siebold & Zucc são utilizadas como fontes de flavonoides, principalmente de vitexina e orientina (flavonas C-glicosiladas), usadas como antioxidantes naturais (Shukla *et al.*, 2012).

Na China, um produto conhecido como extrato antioxidante de bambus (AOB), é feito a partir da mistura de folhas de algumas espécies de bambus asiáticos. Este produto é usado como aditivo antioxidante de vários alimentos, como pães, cereais, carnes, alimentos fritos, dentre outros, sendo o seu uso regulamentado pelo ministério da saúde chinês (Ministry of Health, 2003). Foi demonstrado que o pré-tratamento de alimentos fritos com AOB, reduzem significativamente a formação de acrilamida, que é um composto tóxico e carcinogênico que se forma durante o processo de fritura dos alimentos (Zhang *et al.*, 2007). Estudos mostram que o AOB é um produto seguro para ser usado como aditivo de alimentos, pois não é tóxico, não causa mutagenicidade nas células (Lu *et al.*, 2005) e é rico em substâncias antioxidantes, como os flavonoides e ácidos fenólicos (Jiao *et al.*, 2007).

Embora existam relatos na literatura do uso de espécies de bambus para fins medicinais, principalmente as espécies asiáticas, esses levantamentos são realizados com base no conhecimento e uso tradicional dessas espécies, mas ainda são escassos estudos com bambus nativos que buscam identificar os compostos responsáveis por tais atividades biológicas.

Contudo, o avanço das técnicas de cromatografia e identificação de produtos naturais, tem ajudado na elucidação de substâncias bioativas presentes em diversas espécies vegetais, inclusive em bambus. Por exemplo, Kim *et al.* (2009) através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada *online* com o bioensaio de sequestro do radical ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico), conseguiram já no momento da separação dos constituintes testar o potencial antioxidante de cada substância e em seguida identificar as mesmas pelo uso de técnicas de identificação, como Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Nesse trabalho, os autores identificaram algumas flavonas, como a orientina, iso-orientina, vitexina e tricina como responsáveis pelo potencial antioxidante dos extratos das folhas de *Phyllostachys nigra* Munro. Dos

flavonoides já descritos para espécies de bambus, há um grande interesse na tricina, por seu potencial como agente químico para prevenção de câncer (Jiao *et al.*, 2007). O que foi reportado em estudo realizado por Hudson *et al.* (2000), onde os pesquisadores observaram que a tricina inibiu o crescimento *in vitro* de células malignas de câncer de mama.

Com o mesmo intuito de caracterizar as substâncias bioativas presentes em bambus, Van Hoyweghen *et al.* (2012) avaliaram o potencial antioxidante de doze espécies distintas de bambus, identificando quais grupos de polifenóis eram responsáveis pela atividade antioxidante desses extratos. Os autores concluíram que as flavonas derivadas de luteolina (orientina e iso-orientina, por exemplo) e os fenilpropanoides foram os constituintes mais ativos nos bioensaios realizados.

Outros estudos, como o realizado por Jun *et al.* (2004), também atribuíram à presença de fenilpropanoides, como o ácido *p*-cumárico, à capacidade antioxidante das frações geradas de duas espécies de bambus (*Phyllostachys pubescens* Mazel ex. J. Houz e *P. bambusoides* Siebold & Zucc).

Kweon *et al.* (2001) isolaram e identificaram três substâncias fenólicas presentes na folhas de *Phyllostachys edulis* (Carrière) J. Houz, todas derivadas de ácido clorogênico. Essas substâncias apresentaram uma capacidade antioxidante de sequestro do radical superóxido superior ao ácido ascórbico e ao tocoferol, que são potentes antioxidantes naturais.

Muito embora a maioria dos estudos fitoquímicos com espécies de bambus destaquem as substâncias fenólicas como os constituintes presentes em maior abundância, existem estudos que destacam a presença de outras classes de metabólitos em bambus, como alcaloides (Bartholomew *et al.*, 2013), glicosídeos cianogênicos (Coffie *et al.*, 2014) e terpenoides (Tongco *et al.*, 2014). Embora esses estudos contribuam para o conhecimento fitoquímico de tais espécies, eles possuem alguns fatores limitantes, pois são trabalhos que utilizaram metodologias de detecção não específicas, sendo necessários maiores estudos, evitando-se falsos positivos e descrevendo quais as substâncias pertencentes a estas classes estão de fato presentes e em quais quantidades.

Contudo, o conhecimento sobre o potencial medicinal de espécies de bambus nativos do Brasil é extremamente subdesenvolvido em comparação ao conhecimento que se tem de espécies asiáticas, promovido devido aos vastos usos tradicionais e fortes demandas industriais para essas espécies vegetais estabelecidas no continente asiático (INBAR, 2013). Porém, os estudos desenvolvidos com espécies asiáticas de bambus se tornam diretrizes e norteiam o início do desenvolvimento das pesquisas com espécies nativas do Brasil.

1.3. Espécie vegetal de estudo

Este trabalho utilizou como modelo *Merostachys pluriflora* Munro ex. E. G. Camus (Figura 1.3) uma espécie de bambu nativo e endêmico da Mata Atlântica (Filgueiras e Gonçalves, 2004). *M.*

pluriflora é considerada uma espécie não ameaçada de extinção segundo os critérios da IUCN (2001) devido a sua ampla distribuição geográfica e presença em Unidades de Conservação brasileiras. Suas características morfológicas são bem peculiares no que se referem ao colmo, eles podem medir de 7-12 metros de altura e são eretos na base, porém, pendentes no ápice; seus colmos são finos, podendo apresentar de 5-9 mm de diâmetro. Uma característica bem marcante nessa espécie é a presença de tricomas branco-prateados muito densos acima e abaixo da linha nodal (Shirasuna, 2012).

No Brasil há registros da ocorrência dessa espécie nas regiões sudeste (SP, RJ) e sul (SC) (Shirasuna, 2012). O ciclo de floração dessa espécie ainda não é conhecido. Dos bambus lenhosos, *Merostachys* é de ampla ocorrência nas Américas Central e do Sul (Sendulsky, 1992), sendo o Brasil o país com maior diversidade de exemplares (Filgueiras e Gonçalves, 2004).

Figura 1.3 - (A) indivíduos de *M. pluriflora*; (B) detalhe do ramo; (C) folhas; (D) detalhe dos colmos. Foto: Claudia Furlan (2014).

1.4. Área de coleta

A coleta do material vegetal foi realizada no mês de Junho de 2014, no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), onde está localizado o Instituto de Botânica do Estado de São Paulo (IBt). Foram coletados folhas e colmos de uma mesma população de *M. pluriflora*, sendo a amostra composta por vários indivíduos. O material vegetal foi coletado com o auxílio da Dra Maria Tereza Grombone Guaratini, pesquisadora do IBt.

O Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI) abrange uma área com um total de 5.263.784 m² ou 526,38 ha, e está situado na região sudeste do município de São Paulo, entre os paralelos 23°38'08"S e 23°40'18"S e os meridianos 46°36'48"W e 46°38'00"W, com altitudes médias entre 770 e 825 m.s.m. O PEFI constitui um dos maiores remanescentes florestais localizados em área urbana e é caracterizado por uma vegetação do bioma Mata Atlântica (Shirasuna, 2012) (Figura 1.4).

Amostras do material vegetal coletado (folhas e colmos) foram devidamente identificados pela Dra Regina Shirasuna, pesquisadora do IBt. O voucher do material coletado (Gagliano 01) foi depositado no herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (SPF).

Figura 1.4 – Localização do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga no estado de São Paulo. Fonte: editado do Google imagens.

2. Justificativa e Hipóteses

Diversas espécies de bambus são utilizadas nos mais variados segmentos, como na construção civil, na fabricação de móveis, no artesanato, na alimentação, dentre outros usos. Além disso, muitas espécies de bambus possuem uma ampla utilização para o tratamento de diversas doenças na medicina tradicional asiática. Portanto, nesse contexto de inúmeras perspectivas e diante da escassez de trabalhos científicos que relatem a utilização de espécies de bambus nativos como fonte de substâncias bioativas, o presente estudo é relevante para o conhecimento de bioativos provenientes de *Merostachys pluriflora* e poderá proporcionar uma nova forma de exploração dos subprodutos dessa espécie vegetal. Aliado a isso, o Brasil é o centro de diversidade de *Merostachys*, com uma grande quantidade de espécies descritas, mas insuficientemente conhecidas, com alto grau de endemismo, carecendo de estudos adequados para as diversas espécies que ocorrem no Brasil.

Considerando que as espécies asiáticas são utilizadas na medicina popular e se têm relatos de várias atividades biológicas atribuídas à presença de flavonoides e outras substâncias fenólicas

de interesse, espécies de bambu do Neotrópico são potenciais fontes de bioativos. Utilizando-se essa premissa, *Merostachys pluriflora*, uma espécie de bambu lenhoso é promissora na bioprospecção, especialmente de substâncias antioxidantes.

3. Objetivos

Este estudo teve como objetivo geral analisar o potencial biológico de extratos provindos de folhas e colmos de *Merostachys pluriflora*, uma espécie de bambu endêmico da Mata Atlântica.

Como objetivos específicos, este estudo pretendeu:

- ✓ Quantificar e descrever a composição de substâncias fenólicas, especialmente flavonoides e fenilpropanoides em extratos de folhas e colmos de *M. pluriflora*;
- ✓ Analisar o potencial biológico através de testes *in vitro* da capacidade antioxidante, anti-HIV1 e antibacteriana dos seus extratos, fases e eventuais substâncias isoladas.

Devido à grande importância e utilização dos bambus asiáticos na indústria alimentícia, esse trabalho também teve como objetivo analisar e quantificar alguns metabólitos primários como lipídeos, amido e carboidratos solúveis presentes nas folhas e colmos de *M. pluriflora*.

Esta dissertação está apresentada em três capítulos: o **Capítulo 1** apresentando a introdução geral sobre espécies de bambus e seus usos; no **Capítulo 2** os dados referentes à caracterização química de *M. pluriflora* são apresentados; e no **Capítulo 3** os dados referentes às atividades biológicas testadas.

4. Referências Bibliográficas

- APG III (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of Linnean Society**, 161: 105-121, 2009.
- APG IV (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 181: 1–20, 2016.
- Bartholomew, O. I.; Maxwell, E.; Bitrus, H. J. Phytochemical Constituents and *in vitro* antioxidant capacity of methanolic leaf extract of *Oxytenanthera abyssinica* (A. Rich Murno). **European Journal of Medicinal Plants**, 3(2): 206-217, 2013.
- Clark, L. G. Diversity and Biogeography of neotropical bamboos (Poaceae: Bambusoideae). **Acta Botanica Brasilica**, 4(1): 125-132, 1990.
- Chapman, G. P. **The Biology of Grasses**. CABI editora, 1ª edição, 288 págs., 1996.
- Coffie, G. Y.; Antwi-boasiako, C.; Darkwa, N. A. Phytochemical constituents of the leaves of three bamboo (Poaceae) species in Ghana. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, 2 (6): 34-38, 2014.
- Filgueiras, T.S. & Gonçalves, A. P. S. A Checklist of the basal grasses and bamboos in Brazil (Poaceae). **The Journal of the American Bamboo Society**, 18: 7-18, 2004.
- Filgueiras, T. S.; Rodrigues, R.S.; Shirasuna, T. S. Braquiárias invasoras no Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo, 2012.
- Gibson, D. J. **Grasses and grassland ecology**. Oxford University Press, New York, 2009.
- GPWG (Grass Phylogeny Working Group). Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, 88: 373-457, 2001.
- Hudson, E. A.; Dinh, P. A.; Kokubun, T.; Simmonds, M. S. J.; Gescher, A. Characterization of potentially chemopreventive phenols in extracts of brown rice that inhibit the growth of human breast and colon cancer cells. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, 9: 1163-1170, 2000.
- INBAR (The International Network for Bamboo and Rattan). INBAR's Bamboo and Rattan Trade Database. Disponível em: <<http://www.inbar.int/>>. 2013.
- IUCN. Red list categories and criteria: version 3.1. IUCN Species Survival Commission, Gland, Switzerland and Cambridge, United Kingdom, 2001.
- Jiao, J.; Zhang, Y.; Liu, C.; Liu, J.; Wu, X.; Zhang, Y. Separation and purification of Tricin from an antioxidant product derived from bamboo leaves. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55 (25): 10086-10092, 2007.
- Jun, M.; Tohru, U.; Jianzhang, L.; Takeshi, F. Identification and evaluation of antioxidant activities of bamboo extracts. **Forestry Studies in China**, 6 (2): 1-5, 2004.
- Kim, C. Y.; Lee, H. J.; Jung, S. H.; Lee, E. H.; Cha, K. H.; Kang, S. W.; Pan, C.; Um, B. Rapid identification of radical scavenging phenolic compounds from black bamboo leaves using high-performance liquid chromatography coupled to an online ABTS⁺-based assay. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, 52(6): 613-619, 2009.
- Kumar, D.; Kumar, A.; Prakash, O. Potencial antifertility agents from plants: A comprehensive review. **Journal of Ethnopharmacology**, 140 (1): 1-32, 2012.

- Kweon, M.; Hwang, H.; Sung, H. Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49 (10): 4646-4655, 2001.
- Laws, B. **50 plantas que mudaram o rumo da história**. Editora Sextante, Rio de Janeiro; 224 pg.; 2013.
- Lu, B.; Wu, X.; Tie, X.; Zhang, Y.; Zhang, Y. Toxicology and safety of anti-oxidant of bamboo leaves. Part 1: Acute and subchronic toxicity studies on anti-oxidant of bamboo leaves. **Food and Chemical Toxicology**, 43: 783-792, 2005.
- Mejía, A. I. G.; Gallardo, C. C.; Vallejo, J. J. O.; Ramírez, G. L.; Carolina Arboleda, C. E., Durango, E. S. A.; Jaramillo, F. A. Y.; Cadavid, E. T. Plantas del género *Bambusa*: importancia y aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. **Vitae, Revista de la Facultad de química farmacéutica**, 16 (3): 396-405, 2009.
- Ministry of Health. Technical Standards for Testing and Assessment of Health Food; Beijing, 2003; pg 203.
- Nirmala, C.; Bisht, M. S.; Laishram, M. Bioactive compounds in bamboo shoots: health benefits and prospects for developing functional foods. **International Journal of Food Science and Technology**, 49: 1425-1431, 2014.
- Recht, C. & Wetterwald, M. F. **Bamboos**. 1ª edição, editora B. T. Batsford Ltd. 127 pg, 1992.
- Sangeetha, R.; Diea, Y. K. T.; Chaitra, C.; Malvi, P. G.; Shinomol, G. K. The amazing bamboo: a review on its medicinal and pharmacological potential. **Indian Journal of Nutrition**, 2(1): 1-7, 2015.
- Sendulsky, T. *Merostachys burmanii* (Poaceae: Bambusoideae: Bambuseae), a new species from Brazil. **Novon**, 2: 111-114, 1992.
- Sharma, T. P. & Borthakur, S. K. Ethnobotanical observations on Bamboos among Adi tribes in Arunachal Pradesh. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, 7(4): 594-597, 2008.
- Shirasuna, R. T. Bambus nativos (Poaceae-Bambusoideae) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brasil. Dissertação (mestrado), Instituto de Botânica do Estado de São Paulo (Orientador: FILGUEIRAS, T. S.). São Paulo, SP: 266p, 2012.
- Shirasuna, R. T.; Filgueiras, T. S.; Barbosa, L. M. Poaceae do Rodoanel Mario Covas, Trecho Sul, São Paulo, SP, Brasil: florística e potencial de uso na restauração de áreas degradadas. **Hoehnea**, 40(3): 521-536, 2013.
- Shukla, R.; Sumit, G.; Sajal, S.; Dwivedi, P. K.; Mishra, A. Medicinal importance of bamboo. **International Journal of Biopharm & Phytochemical Research**, 1(1): 9-15, 2012.
- Soreng, R. J.; Peterson, P. M.; Romaschenko, K.; Davidse, G.; Zuloaga, F. O.; Judziewicz, E. J.; Filgueiras, T. S.; Davis, J. I.; Morrone, O. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). **Journal of Systematics**, 53(2): 117-137, 2015.
- Tripathi, Y. C. **Bamboo on the touchstone of modern phytotherapy**. Productivity Enhancement and Value Addition of Bamboos. Institute of Forest Productivity. First Impression: March, 2011.
- Tongco, J. V. V.; Aguda, R. M.; Razal, R. A. Proximate analysis, phytochemical screening, and total phenolic and flavonoid content of Philippine bamboo *Schizostachyum lumampao*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, 6(1): 709-713, 2014.
- Van Hoyweghen, L.; De Beer, T.; Deforce, D.; Heyerick, A. Phenolic compounds and anti-oxidant capacity of twelve morphologically heterogeneous bamboo species. **Phytochemical Analysis**, 23 (5): 433-443, 2012.
- Zhang, Y.; Chen, J.; Zhang, X.; Wu, X.; Zhang, Y. Addition of antioxidant of bamboo leaves (AOB) effectively reduces acrylamide formation in potato crisps and french fries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 55: 523-528, 2007.

Capítulo 2 -
Caracterização química de
Merostachys pluriflora

1. Introdução

1.1. Os metabólitos vegetais

As plantas possuem a capacidade de converter água e dióxido de carbono presente no ar em energia química utilizando a energia solar, por meio de um processo de transformação conhecido como fotossíntese. A partir desse processo, se inicia uma cascata de reações metabólicas das quais serão sintetizados todos os compostos orgânicos (Taiz e Zeiger, 2009). Alguns desses metabólitos são macromoléculas que estão presentes em todos os organismos vivos, como os carboidratos, ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos, e são substâncias envolvidas na geração de energia e constituição do protoplasto (Buchanan *et al.*, 2000). Porém, existe outro grupo de substâncias sintetizado pelos vegetais que possui distribuição restrita entre os grupos taxonômicos, o grupo dos metabólitos secundários ou especiais, ou ainda, produtos naturais. Essas substâncias estão diretamente envolvidas na comunicação desses organismos com o meio exterior e na proteção e defesa frente a fatores de estresse biótico e abiótico (Croteau *et al.*, 2000).

Embora exista uma grande diversidade estrutural entre os produtos naturais, essas substâncias podem ser classificadas, de forma geral, em três grandes grupos de acordo com as suas semelhanças estruturais e propriedades químicas: substâncias fenólicas, terpenoides e substâncias nitrogenadas (Buchanan *et al.*, 2000; Dewick, 2009).

Os metabólitos secundários são sintetizados através de quatro vias metabólicas distintas, sendo elas, a via do ácido chiquímico e do acetato malonato, que sintetizam as substâncias fenólicas, e as vias do acetato mevalonato e do metileritritol fosfato, que sintetizam os terpenoides. As substâncias nitrogenadas têm como precursores aminoácidos aromáticos, provindos da via do ácido chiquímico, aminoácidos alifáticos, provenientes do metabolismo primário, entre outros precursores nitrogenados (Dewick, 2009) (Figura 2.1).

Figura 2.1 - Esquema das rotas de biossíntese dos metabólitos secundários e suas conexões com o metabolismo primário. Figura: F. M. Rezende e F. A. Moreira.

Todas essas classes de produtos naturais são sintetizadas a partir de produtos e/ou subprodutos do metabolismo primário vegetal. A Acetil-CoA, que é um produto da via glicolítica, desempenha um papel importante para a formação dos terpenoides, substâncias fenólicas e nitrogenadas. Para a síntese dos terpenoides, três moléculas de Acetil-CoA serão precursoras na via do acetato mevalonato (MEV), a qual ocorre no citoplasma das células. Já, a outra via envolvida na síntese dos terpenoides é a via do metileritritol fosfato (MEP), que ocorre nos cloroplastos, sendo restrita aos organismos fotossintetizantes, e tem como precursores as moléculas de piruvato e o gliceraldeído 3-fosfato, substâncias intermediárias da via glicolítica. Contudo, ambas as vias sintetizarão o isopentenil difosfato (IPP) e o seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP), que são as unidades pentacarbonadas ativas na formação dos terpenoides. Essas unidades se condensam formando as diferentes classes de terpenoides, como os monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, diterpenos e tetraterpenos (Dewick, 2009).

Já a principal via para a síntese de substâncias fenólicas, em plantas, é a via do ácido chiquímico, que tem como precursores a molécula de fosfoenolpiruvato, proveniente da via glicolítica, e a eritrose 4-fosfato, provinda do ciclo das pentoses fosfato. Esses intermediários se condensam formando o primeiro intermediário carboxílico, o ácido 3-dehidroquínico, precursor do ácido 3-dehidrochiquímico. A partir da formação deste intermediário é que serão sintetizados o ácido gálico, o ácido protocateico e por sua vez o ácido chiquímico. Do ácido gálico teremos a sua polimerização com açúcares, originando os taninos hidrolisáveis. O ácido chiquímico por sua vez, após uma série de reações, levará à síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano (Figura 2.2). A fenilalanina é um precursor importante para a formação da maior parte das substâncias fenólicas, pois a partir de sua desaminação são sintetizadas varias classes de substâncias fenólicas como os fenilpropanoides, os lignoides, as ligninas e as cumarinas (Croteau *et al.*, 2000; Dewick, 2009).

Como dito anteriormente, as substâncias fenólicas são sintetizadas por duas vias distintas, a outra é a via do acetato malonato, que em plantas é importante quando combinada com outras vias. A síntese de substâncias fenólicas por essa via se dá pela condensação de três moléculas de Acetil-CoA ao 4-cumaroil-CoA, proveniente da via do chiquimato, e essa junção dará origem às chalconas e aos estilbenos, que são substâncias fenólicas de biossíntese mista. Das chalconas serão sintetizadas todas as outras classes de flavonoides, como as flavanonas, flavonas, dihidroflavonóis, flavonóis, catequinas, taninos condensados e antocianinas (Figura 2.3). Vale ressaltar, que a via do acetato malonato também é importante para a síntese de ácidos graxos e outras substâncias graxas que comporão as ceras cuticulares nos vegetais (Croteau *et al.*, 2000; Dewick, 2009)

Figura 2.2 – Esquema resumido da biossíntese de substâncias fenólicas (Parte I). Fonte: adaptado de Dewick, 2009.

Figura 2.3 – Esquema resumido da biossíntese de substâncias fenólicas (Parte II). Fonte: adaptado de Dewick, 2009.

Os aminoácidos aromáticos sintetizados através da via do ácido chiquímico são muito importantes para a síntese de substâncias nitrogenadas, assim como os aminoácidos alifáticos, os quais são produzidos pela via do ácido tricarboxílico. As substâncias nitrogenadas estão divididas em diferentes classes, sendo elas os alcaloides, os glucosinolatos e os glicosídeos cianogênicos. A maior classe de nitrogenados é a de alcaloides e esses são divididos em diferentes grupos de acordo com o seu precursor (Croteau *et al.*, 2000; Dewick, 2009).

Os metabólitos vegetais possuem enorme valor agregado, pois são utilizados em diversos segmentos da indústria: são importantes fontes alimentícias, são utilizados na fabricação de fármacos, também são fontes de matéria prima para geração de energia, para a indústria têxtil, cosmética, dentre outros. Muito embora os metabólitos vegetais possuam uma ampla gama de aplicações, poucos grupos taxonômicos são utilizados em comparação com a grande diversidade de plantas existente no planeta. Por isso, o conhecimento sobre as espécies vegetais, principalmente no que tange a sua composição química, permite ampliar as opções de espécies de uso econômico.

Os estudos com espécies asiáticas de bambus relatam a presença abundante de substâncias fenólicas, e atribuem diversas atividades biológicas à presença dessa classe de metabólitos secundários nessas espécies. Tendo como premissa o grande emprego de espécies asiáticas de bambus na medicina tradicional Chinesa, a hipótese deste estudo foi que espécies brasileiras de bambus são promissoras para uso medicinal, particularmente pela presença de substâncias fenólicas responsáveis pelas atividades biológicas. Dessa forma, o foco deste estudo foi investigar a composição fenólica de uma espécie de bambu endêmico do Brasil, *Merostachys pluriflora*. Além disso, este estudo buscou quantificar o conteúdo de carboidratos solúveis, amido e lipídeos nessa espécie a fim de caracterizá-la em relação a algumas classes de metabólitos primários.

2. Materiais e Métodos

2.1. Preparo das amostras

2.1.1. Extração e partição

Folhas e colmos de *M. pluriflora* foram previamente separados e secos em estufa a 40°C por 2 semanas. O material seco foi pulverizado em moinho de facas e o pó obtido (400 g de cada) foi submetido à maceração em etanol 70% durante sete dias no escuro e a temperatura ambiente, com troca de solvente a cada dois dias. Os extratos brutos etanólicos de folhas (EE-F) e de colmos (EE-C) foram concentrados em evaporador rotativo sob pressão reduzida e em seguida foram liofilizados para obtenção de seus rendimentos. Parte do EE-F (22,5 g) e do EE-C (10,0 g) foi retomada em metanol 50% e submetida a uma partição com solventes de diferentes polaridades, gerando assim duas fases mais apolares, de hexano (FH) e de diclorometano (FD), uma fase de

polaridade intermediária, de acetato de etila (FAE) e uma fase mais polar, hidrometanólica (FHM), para ambas as partes vegetais de estudo (Figura 2.4).

Figura 2.4 – Esquema do preparo das amostras para as análises químicas e para os ensaios de atividades biológicas. (EE) extrato bruto etanólico de folhas (F) e colmos (C); (FH) fase de hexano de folhas (F) e colmos (C); (FD) fase de diclorometano de folhas (F) e colmos (C); (FAE) fase de acetato de etila de folhas (F) e colmos (C); (FHM) fase hidrometanólica de folhas (F) e colmos (C).

2.2. Quantificações de metabólitos primários

Para as quantificações dos metabólitos primários foram utilizadas as folhas e colmos secos em estufa e pulverizados, como descrito no item 2.1.1.

2.2.1. Amido

Para a determinação do conteúdo de amido foi utilizado o método descrito por Rezende *et al.* (2015). Cerca de 10 mg de cada material vegetal seco (folhas e colmos) foram colocados em microtubos de 2 mL. Para a extração de amido foram adicionados 1,5 mL de etanol 80% a esse material, e as amostras foram mantidas em banho-maria à 80°C durante 20 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi recolhido e transferido para tubos de *speed vac*, esse processo foi repetido por mais 4 vezes, totalizando 5

repetições do processo de extração. Após a última extração, foi realizada a reação colorimétrica para verificar se todo o carboidrato solúvel fora retirado. Para tanto, foram separados 0,5 mL de cada amostra (folhas e colmos) da última extração em um tubo de vidro e em seguida foram adicionados 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Essa reação adquire cor alaranjada e se a tonalidade de laranja for bem clara não há necessidade de mais extrações, entretanto, se a coloração for escura são necessárias mais extrações e posteriores testes para verificar se houve a extração dos carboidratos solúveis. Após o término das extrações, os microtubos das amostras contendo o precipitado foram colocados para secar em estufa à 40°C por 24 horas. Posteriormente, foram adicionados ao precipitado seco 0,5 mL de α -amilase (120 U/mL) termoestável de *Bacillus licheniformis* diluída em tampão MOPS 10 mM pH 6,5. Esse material foi mantido em banho-maria à 75°C por 30 minutos. Após a adição, mais uma vez, da enzima α -amilase e nova incubação em banho-maria, as amostras foram resfriadas até 50°C e foram adicionados 0,5 mL de amiloglicosidase (30 U/mL) de *Aspergillus niger* em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,5. Em seguida as amostras foram mantidas em banho-maria à 50°C durante 30 minutos, esses dois últimos procedimentos foram repetidos mais uma vez. Depois, as amostras foram colocadas em água fervente por 10 minutos e em seguida levadas ao congelador. Por último, as amostras foram descongeladas e 50 μ L de cada amostra foram colocados em microplacas de 96 poços, com a adição de 250 μ L do reagente glicose PAP. A placa foi incubada a 37°C por 15 minutos e a leitura da absorbância foi realizada a 490 nm. As análises foram realizadas utilizando triplicatas técnicas e o conteúdo de amido foi expresso em mg equivalentes a glicose por g de extrato (mg/g EG), utilizando a equação baseada na curva de calibração deste padrão (25 a 350 μ g/mL). Os brancos foram feitos utilizando água ultrapura.

2.2.2. Carboidratos solúveis

Para a determinação do conteúdo de carboidratos solúveis foi utilizado o método adaptado por Rezende *et al.* (2015). A extração de carboidratos solúveis foi realizada juntamente com a extração de amido, sendo recolhido o sobrenadante após as extrações com etanol, como descrito no item 2.2.1 acima. O material extraído foi seco em *speed vac*. Posteriormente, as amostras foram retomadas em 1 mL de água ultrapura e o material foi transferido para microtubos de 2 mL e adicionados 0,5 mL de clorofórmio para a remoção de pigmentos lipossolúveis como, por exemplo, a clorofila. Em seguida esse material foi centrifugado a 10.000 rpm por 2 minutos e 0,7 mL da fase superior de cada amostra foram recolhidos e transferidos para novos microtubos de 1,5 mL. Uma alíquota de 30 μ L das amostras foi colocada em microplacas de 96 poços com a adição de 150 μ L de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado e 30 μ L de fenol 5%. A placa foi incubada a 75°C por 5 minutos, em seguida resfriada em banho de gelo por mais 5 minutos. Por último, foi realizada a

leitura da absorbância em 490 nm. As análises foram realizadas utilizando triplicatas técnicas e o conteúdo de carboidratos solúveis foi expresso em mg equivalentes a glicose por g de extrato (mg/g EG), utilizando a equação baseada na curva de calibração deste padrão (100 a 1000 µg/mL). Os brancos foram feitos utilizando água ultrapura.

2.2.3. Lipídeos

Para extração dos lipídeos presente nas folhas e colmos de *M. pluriflora* foi utilizado o protocolo descrito por Ahmad *et al.*, (1981). Para tanto, 1 g do material vegetal pulverizado (folhas e colmos) foi extraído em soxhlet durante 6 horas, utilizando aproximadamente 300 mL de hexano. Posteriormente, o material extraído foi concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida até a secagem completa do solvente. Esse material foi retomado com uma pequena quantidade de hexano e transferido para tubos de vidro previamente pesados, onde o solvente restante foi totalmente evaporado sob corrente de nitrogênio (N₂) com o objetivo de mensurar a quantidade (mg) de lipídeos presentes nas amostras.

Posteriormente, as amostras foram solubilizadas com tolueno até atingir a concentração de 2 mg/mL e submetidas à transmetilação utilizando a metodologia descrita por Clemente (2010). Em um tubo para banho seco foram adicionados 4 mL da solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 5% em metanol, 2 mL de tolueno e 30 µL da amostra. Depois de homogeneizadas em vórtex, as misturas foram mantidas em banho seco a 80°C durante o período de 4 horas. Posteriormente, o material foi transferido para tubos de centrifuga e adicionados 4 mL de cloreto de sódio (NaCl) 0,5 M e 1 mL de diclorometano, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 5.000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente foi removida a fase orgânica (inferior) de todas as amostras e transferidas para novos tubos, esse procedimento para separação da fase orgânica foi realizado por 3 vezes. Todas as fases orgânicas foram reunidas em um mesmo tubo e lavadas com 4 mL de água ultrapura, em seguida as amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 5 minutos. Após essa centrifugação, a fase orgânica das amostras foi novamente removida e transferida para novos tubos. Em seguida foi adicionado a cada amostra sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e todas elas foram mantidas em repouso por 1 hora em ambiente escuro. Posteriormente as amostras foram filtradas e o solvente foi evaporado sob corrente de N₂.

Por fim, as amostras foram analisadas por Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM 6850/5975C Agilent) para a identificação e quantificação das porcentagens relativas dos ácidos graxos. Para tanto, os lipídeos extraídos de folhas e colmos de *M. pluriflora* foram retomados em 500 µL de hexano e 1 µL das amostras foi injetado em uma coluna capilar de sílica HP-INNOWax (30 m x 0,32 mm x 0,5 µm), utilizando hélio como gás de arraste a 1,7 mL/min constante, com a programação de temperatura: 150°C (5 min), aumentando 15°C/min até 225°C e então aumentando 5°C/min até 260°C, mantendo a 260°C durante 7 minutos. As

temperaturas do injetor, da fonte iônica e do quadruplo foram 220°C, 280°C e 180°C, respectivamente.

Para a identificação dos ácidos graxos presentes nas amostras, os espectros obtidos no espectrômetro de massas foram comparados aos da biblioteca NIST e com a biblioteca digital AOCS Lipid Library disponível em <http://lipidlibrary.aocs.org/>; além disso, os tempos de retenção dos ácidos graxos das amostras foram comparados com os de amostras autênticas. As análises foram realizadas utilizando triplicatas técnicas e os resultados foram expressos em porcentagem relativa entre os ácidos graxos integrados nos cromatogramas; e o teor de lipídeos foi expresso em mg por grama de massa seca do material vegetal.

2.3. Quantificações de substâncias fenólicas

2.3.1. Doseamento de fenóis totais

Os extratos brutos e fases de folha e colmo foram analisados com relação à quantidade de substâncias fenólicas totais utilizando o método de Folin-Ciocalteu, segundo Furlan *et al.* (2015). Para a realização deste procedimento todas as amostras foram retomadas em DMSO 10%. Em microplacas de 96 poços, uma alíquota de 50 µL de cada amostra foi misturada a 190 µL de água ultrapura e 10 µL do reagente Folin-Ciocalteu, em seguida foram adicionados 50 µL de carbonato de sódio 10%. A placa foi incubada a 40°C com agitação por 30 minutos. Posteriormente, a absorbância foi analisada em 760 nm. O conteúdo de fenóis totais foi expresso em mg equivalentes a ácido gálico por g de extrato (mg/g EAG), utilizando a equação baseada na curva de calibração da solução metanólica de ácido gálico (5 a 80 µg/mL). Os brancos foram feitos utilizando DMSO 10% e metanol.

2.3.2. Doseamento de flavonas/flavonóis

Para a quantificação de flavonas/flavonóis foi utilizado o método adaptado por Santos (2014). Os extratos brutos e fases de folhas e colmos foram retomados em DMSO 10%. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 100 µL de cada amostra e 100 µL de cloreto de alumínio 5%. Após homogeneizar, as absorbâncias foram lidas a 405 nm. O conteúdo de flavonoides foi expresso em mg equivalentes a quercetina por g de extrato (mg/g EQ), utilizando a equação baseada na curva de calibração de tal padrão (3,6 a 84 µg/mL). Os brancos foram feitos utilizando metanol e DMSO 10%.

2.3.3. Doseamento de proantocianidinas (Taninos condensados)

Os extratos e fases foram analisados com relação à quantidade de taninos condensados utilizando o método adaptado por Moreira (2015). Em microtubos de 0,5 mL foi colocada uma alíquota de 40 µL de cada amostra, em seguida foram adicionados 200 µL da solução de butanol/HCl (18 mg de sulfato ferroso heptahidratado, 1,25 mL de ácido clorídrico concentrado,

completando o volume até 25 mL com butanol). Em seguida as amostras foram homogeneizadas e incubadas a 95°C por 30 minutos, posteriormente, as amostras foram transferidas para microplacas de 96 poços e a leitura da absorbância foi realizada a 550 nm. O conteúdo de taninos condensados foi expresso em mg equivalentes a tanino de quebracho por g de extrato (mg/g ETQ), utilizando a equação baseada na curva de calibração desse padrão (0,6 a 3,6 mg/mL). Os brancos foram feitos utilizando metanol e DMSO 10 %, além da solução de reagente branco de butanol (sem ácido clorídrico).

2.3.4. Doseamento de taninos totais

Os extratos e fases foram analisados com relação à quantidade de taninos totais utilizando o método adaptado por Moreira (2015). Em microtubos de 0,5 mL foram acrescentados 175 µL da solução de BSA (albumina de soro bovino 1 mg/mL, em tampão acetato 0,2 M, pH 5,0) juntamente com 50 µL de cada amostra, após 10 minutos todas as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos, em seguida foi descartado o sobrenadante de cada amostra e acrescentados 200 µL de solução SDS 1% (dodecilsulfato de sódio). Após a completa solubilização do precipitado, utilizando vórtex, foram adicionados 75 µL da solução de cloreto férrico 0,01M. Em seguida as amostras foram homogeneizadas e transferidas para microplacas de 96 poços e a leitura foi realizada após 15 minutos a 520 nm. O conteúdo de taninos totais foi expresso em mg equivalentes a ácido tânico por g de extrato (mg/g EAT), utilizando a equação baseada na curva de calibração deste padrão (0,2 a 2,4 mg/mL). Os brancos foram feitos utilizando metanol e DMSO 10 %.

2.3.5. Caracterização e quantificação das substâncias fenólicas via CLAE-DAD

Para a análise das substâncias fenólicas via cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de arranjo de diodos (CLAE-DAD) (LC1260 - Agilent Technologies), todas as amostras liofilizadas de folhas e colmos foram retomadas em DMSO até atingir a concentração de 2 mg/mL. Foi utilizado o protocolo descrito por Rezende (2013), com modificações. Para tanto, foi utilizada uma coluna Zorbax C-18 (150 X 4.6 mm, 3,5 µm) com célula de fluxo de 50 mm a 40°C. O gradiente de solventes utilizado foi 0,1% ácido acético (AcOH; Synth®) e acetonitrila (CH₃CN; J. T. Backer®) começando com 10% de CH₃CN (0-6 min), aumentando de 10% para 15% (6-7 min), isocrático por 15 min em 15% (7-22 min), aumentando de 15% a 50% (22-32 min), indo de 50% a 100% (21-42 min), isocrático por 8 min em 100% (42-50 min). O fluxo dos solventes foi de 1,0 mL/min; volume de injeção 3 µL, com detecção a 352 nm (para evidenciar os flavonoides) e 280 nm (para evidenciar outras substâncias fenólicas).

Foram utilizadas amostras autênticas de ácidos cinâmicos, flavonas e flavonóis *O* e *C*-glicosilados para a identificação preliminar dos constituintes por seus espectros de absorção UV-Vis e tempos de retenção. Para a quantificação dos constituintes individualmente foram utilizadas as

áreas dos picos no cromatograma (CLAE-DAD) comparadas a curvas de calibração obtidas com ácido clorogênico (0,75 a 150,0 µg/mL), ácido *p*-cumárico (0,75 a 150,0 µg/mL) e luteolina (0,75 a 150,0 µg/mL). Os resultados foram expressos em mg equivalentes aos padrões por g de extrato (mg/g EAC, EAP, EL, respectivamente).

2.4. Fracionamento via CLAE-DAD semi-preparativo

Uma parte (2 g) de cada uma das fases de acetato de etila (FAE-F), diclorometano (FD-F) e hidrometanólica (FHM-F) de folhas foram submetidas ao fracionamento via cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa (CLAE semi-prep) (LC1200 - Agilent Technologies) para isolamento dos constituintes fenólicos. Para todas as fases foi utilizada uma coluna Zorbax eclipse XDB-C18 (9.4 X 250 mm X 5,0 µm) com célula de fluxo de 50 mm a 40° C. Para todas as amostras os picos foram coletados por tempo de retenção.

A amostra FAE-F foi retomada em metanol 50% até atingir a concentração de 80 mg/mL. O gradiente de solventes foi 0,1% ácido acético (AcOH; Synth®) e metanol (MeOH; J. T. Backer®) começando com 20% de MeOH (0-5 min), aumentando de 20% para 30% (5-15 min), aumentando de 30% a 40% (15-35 min), indo de 40% a 100% (35-45 min). O fluxo dos solventes foi de 4.176 mL/min; volume de injeção 900 µL, com detecção somente a 352 nm.

Já a FD-F foi retomada em metanol até atingir uma concentração de 50 mg/mL. O gradiente de solventes utilizado foi 0,1% ácido acético (AcOH; Synth®) e acetonitrila (CH₃CN; J. T. Backer®) começando com 50% de CH₃CN (0-10 min), indo de 50% para 84% (10-11 min), aumentando de 84% a 100% (11-22 min). O fluxo dos solventes foi de 4.127 mL/min; volume de injeção 900 µL, com detecção a 352 nm e 280 nm.

A FHM-F foi retomada em metanol 50% até atingir a concentração de 33,33 mg/mL. O gradiente de solventes utilizado foi 0,1% ácido acético (AcOH; Synth®) e acetonitrila (CH₃CN; J. T. Backer®) começando com 12% de CH₃CN e aumentando para 33% (0-20 min). O fluxo dos solventes foi de 3.338 mL/min; o volume de injeção foi 450 µL, com detecção a 280 nm e 352 nm.

Todas as frações obtidas foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida e posteriormente liofilizadas para a obtenção dos seus rendimentos.

2.5. Identificação via Ressonância Magnética Nuclear (RMN) dos constituintes fenólicos isolados

Para a identificação dos constituintes fenólicos isolados de *M. pluriflora* foi utilizada a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN). Os espectros de RMN de hidrogênio (RMN ¹H) foram obtidos no equipamento Bruker AIII 300 MHz. O solvente utilizado na dissolução das amostras para obtenção dos espectros foi o DMSO-d₆ (Tédia Brazil®). Os deslocamentos químicos foram dados em δ (ppm). Os espectros obtidos foram realizados no Instituto de Química da

Universidade de São Paulo (IQ-USP) e o processamento dos mesmos foi feito utilizando-se o programa MestReNova. A identificação dos constituintes foi realizada com a colaboração do Dr. Marcelo J. Pena Ferreira, docente do departamento de Botânica, IB-USP.

3. Resultados e Discussão

3.1. Rendimentos dos extratos e fases

O extrato bruto etanólico de folhas (EE-F) rendeu 7,68% (30,72 g). Desse rendimento, foram utilizadas 22,49 g para a partição. Das fases geradas do particionamento deste extrato, a fase hidrometanólica (FHM-F) foi a que obteve o maior rendimento 43,63% (9,81 g), seguida da fase de diclorometano (FD-F) com 20,39% (4,58 g), fase de acetato de etila (FAE-F) 19,98% (4,49 g), e da fase de hexano (FH-F) com 1,54% (0,35 g) (Figura 2.5).

O extrato bruto etanólico de colmos (EE-C) teve rendimento de 3,22% (12,89 g). Com relação às fases geradas por partição a partir de 10,0 g deste extrato, novamente o rendimento da fase hidrometanólica (FHM-C) foi superior às demais com 47,09% (4,71 g). A fase de acetato de etila (FAE-C) obteve um rendimento de 15,36% (1,54 g), enquanto as fases de diclorometano (FD-C) e hexano (FH-C) foram as que menos renderam 7,91% (0,79 g) e 0,52% (0,05 g), respectivamente (Figura 2.5).

Figura 2.5 – Rendimento dos extratos brutos e fases de partição de folhas e colmos de *M. pluriflora*. (EE) extrato bruto etanólico; (FH) fase de hexano; (FD) fase de diclorometano; (FAE) fase de acetato de etila; (FHM) fase hidrometanólica.

Vale ressaltar que a maceração de ambas as partes vegetais foi realizada partindo-se de mesma quantidade de massa vegetal seca (400,0 g). Com isso, é possível observar que o rendimento do extrato bruto etanólico provindo de folhas de *M. pluriflora* obteve o dobro do rendimento em comparação ao extrato bruto etanólico de colmos. Este último órgão apresenta uma grande quantidade de fibras e, provavelmente isso refletiu no menor rendimento do extrato bruto.

Analizando o rendimento das fases, para ambas as partes vegetais estudadas, podemos concluir que o rendimento da FHM foi superior ao das demais, enquanto que a FH obteve o menor rendimento. Esses resultados indicam uma maior presença de substâncias com caráter polar em relação às apolares, nas amostras de *M. pluriflora* da população estudada.

Van Hoyweghen *et al.* (2012) estudaram doze espécies de bambus e o rendimento de extratos metanólicos variou de 16% a 24%. O menor rendimento foi encontrado em *Arundinaria gigantea* (Walter) Muhl e *Phyllostachys humilis*, ambos com 16%; e o maior rendimento foi encontrado para *Phyllostachys nigra* (Lodd. ex Lindl.) Munro (24%). Estes autores utilizaram metanol 50% como solvente de extração. O uso de um solvente com uma maior proporção de água parece incrementar o rendimento dos extratos provindos de bambus, o que sugere maior presença de substâncias com caráter mais polar, podendo explicar o maior rendimento dos extratos das espécies de bambu estudadas por esses autores em comparação com a espécie utilizada neste estudo.

3.2. Quantificações de metabólitos primários

3.2.1. Amido e carboidratos solúveis

Com relação ao doseamento de amido e carboidratos solúveis, a população de *M. pluriflora* estudada apresentou, em média, nas suas folhas 15,65 mg/g de amido e 50,39 mg/g de carboidratos solúveis por grama de material seco, o que corresponde, respectivamente, a 1,56 % e 5,04% dos seus constituintes. O colmo apresentou uma quantidade de amido superior à da folha, com 29,06 mg/g, mas a quantidade de carboidratos solúveis encontrada foi de 15,92 mg/g. Esses valores correspondem, respectivamente, a 2,91% e 1,59% dos constituintes do colmo (ver curvas em Anexo 1).

Na grande maioria dos estudos de quantificações de metabólitos primários em bambus, esses dados estão relacionados com os brotos, por serem muito apreciados na culinária. Conforme o compilado realizado por Choudhury *et al.* (2010) os brotos de algumas espécies asiáticas de bambus apresentam de 3,8% a 4,8% de carboidratos como seus constituintes, com exceção de uma única espécie apontada no estudo, *Dendrocalamus strictus* com 9,9%. Podemos notar que os valores de carboidratos encontrados nas folhas (5,04%) de *M. pluriflora* é muito próximo ao encontrado nos brotos de algumas espécies asiáticas.

Além do aproveitamento pela indústria alimentícia, os bambus têm sido vistos como muito promissores no setor energético como combustíveis de segunda geração, pois são potenciais fontes de carboidratos para obtenção de biocombustíveis, além de fonte de biomassa para a geração de energia (He *et al.*, 2014).

3.2.2. Lipídeos

A população de *M. pluriflora* estudada apresentou, em média, 67,07 mg/g de lipídeos em relação a massa seca de folhas. Já a quantidade de lipídeos presente por grama de material seco de colmo foi de 59,97 mg/g. É possível notar que a proporção de lipídeos presentes em folhas e colmos de *M. pluriflora* da população estudada é semelhante entre os dois órgãos dessa espécie.

Pelo uso de CG-EM, tanto as folhas quanto os colmos apresentaram a mesma composição de ácidos graxos em proporções semelhantes entre os órgãos. Em folhas, o ácido palmítico (C16:0) está presente em maior abundância relativa (63,98%), seguido do ácido esteárico (C18:0 - 22,90%) e do ácido oleico (C18:1 - 13,11%). No colmo o ácido palmítico também se apresentou como o constituinte mais abundante (64,60%), seguido do ácido esteárico (25,66%) e do ácido oleico (11,31%), conforme observado na figura 2.6.

Figura 2.6 - Porcentagem relativa de ácidos graxos presentes em folhas e colmos da população estudada de *Merostachys pluriflora*.

Na natureza, os ácidos graxos podem ocorrer como substâncias na forma livre ou esterificada. A maior parte deles encontra-se esterificada com o glicerol, formando os triglicerídeos ou triacilgliceróis, constituintes dos óleos fixos ou gorduras vegetais, são os lipídeos mais comumente encontrados na natureza (Vianni e Braz-Filho, 1996). Estudos sobre a composição de

lipídeos em bambus são, em sua maioria, realizados com os brotos, pois os mesmos apresentam um grande valor nutricional e são muito consumidos *in natura*, principalmente por populações asiáticas. Os brotos de bambus são descritos como ricos em proteínas, carboidratos, minerais, lipídeos, fibras e em aminoácidos essenciais à dieta humana. Em estudos descritos por Chongtham *et al.* (2011), os autores relatam a quantidade de lipídeos encontrados em brotos de bambus de espécies dos gêneros *Bambusa* Schreb, *Dendrocalamus* Nees e *Gigantochloa* Kurz ex Munro, esses valores variaram de 2 a 5 mg/g de massa fresca.

Já no que diz respeito às folhas de bambus, essas são descritas com propriedades emolientes e hidratantes (Mejía *et al.*, 2009), fato atribuído a presença de muitos ácidos graxos saturados, como observado em *M. pluriflora*, onde mais de 80% da constituição lipídica de folhas (e também de colmos) é de ácidos graxos saturados, como o ácido palmítico e o esteárico.

A presença de ácidos graxos saturados é desejável para a indústria cosmética. Uma das plantas mais utilizadas para a fabricação de produtos de higiene e limpeza é o babaçu (*Orbignya martiana* Barb. Rodr.), palmeira de onde é extraído um óleo que apresenta em sua composição química mais de 70% de ácidos graxos saturados, como o láurico, mirístico, palmítico e esteárico (Machado *et al.*, 2006). Outra planta muito utilizada para a fabricação de cosméticos é o pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess.), que também apresenta em sua composição os ácidos graxos saturados palmítico, mirístico e esteárico; além de ácidos graxos insaturados como o oléico, linoléico e linolênico (Pianovski *et al.*, 2008). Com relação ao uso de bambu na cosmetologia, é bastante popular a utilização de brotos de *B. vulgaris* como hidratante, emoliente, restaurador, remineralizante e condicionador, sendo descritos como ricos em aminoácidos, polímeros celulósicos (fibras), ácidos orgânicos, sais minerais (Ca, P, e Fe), vitaminas (A, B, C), carboidratos e mucilagens. Existem diversas linhas de cosméticos (shampoos, condicionadores, emolientes, cremes, perfumes) além de produtos de limpeza elaborados a partir dos brotos de *B. vulgaris*, reconhecida popularmente como fonte de fragrâncias refrescantes (Mejía *et al.*, 2009).

O rendimento de lipídeos em *M. pluriflora* foi baixo (6%) quando comparado a essas espécies que já são utilizadas pela indústria cosmética, como o babaçu, por exemplo, que de suas amêndoas são extraídos 60% de lipídeos (Machado *et al.*, 2006). Contudo, vale lembrar que os bambus são plantas fibrosas, e devido a essa característica, os colmos de várias espécies asiáticas possuem aplicação na construção civil, na indústria de papel e celulose, dentre outras aplicações. Com isso, as folhas poderiam ser aproveitadas como subprodutos da indústria de construção civil e de papel e celulose para uso por outras indústrias, como a cosmética, por exemplo. Levando isso em consideração, a espécie de bambu estudada possui potencial de exploração por esse nicho econômico.

Por fim, foi possível observar que tanto para folhas quanto para o colmo, os lipídeos estão presentes em maiores quantidades (6,7% e 6,0%, respectivamente). As folhas possuem mais carboidratos solúveis (5,04%) e em menor quantidade amido (1,56%). Inversamente às folhas, os colmos apresentam uma maior quantidade de amido (2,91%) do que carboidratos solúveis (1,59%), como podemos observar na figura 2.7.

A distribuição de compostos entre as diferentes partes de uma planta é o resultado final de um conjunto de processos metabólicos e de transporte que orientam o fluxo de fotossintatos através de um sistema conhecido como fonte-dreno. Os órgãos fontes, como as folhas, são responsáveis pela produção desses assimilados através da fotossíntese. Já os compostos produzidos por esses órgãos fonte podem ser usados para geração de energia para os processos vitais da planta, ou podem ser transportados e armazenados temporariamente pelos órgãos de reserva, ou nos órgãos drenos, que são representados pelas raízes, caules e frutos (Duarte e Peil, 2010). Nesse contexto, era esperado que as folhas de *M. pluriflora* possuísem uma maior quantidade de carboidratos solúveis quando comparadas aos colmos, e o inverso, maior quantidade de amido nos colmos do que em folhas.

Figura 2.7 – Porcentagem dos respectivos metabólitos primários em folhas e colmos de *Merostachys pluriflora*.

3.3. Quantificação de substâncias fenólicas

3.3.1. Fenóis totais e flavonoides

No doseamento de substâncias fenólicas realizado em microplacas, por método colorimétrico, o EE-F apresentou, em média, 49,82 mg/g EAG e o EE-C apresentou 73,73 mg/g EAG, uma quantidade superior à encontrada em folhas. Das fases geradas desses extratos brutos, tanto para folhas, quanto para o colmo, a FAE foi a que reteve a maior parte desses constituintes, sendo a FAE-F com 66,68 mg/g EAG e a FAE-C com 102,25 mg/g EAG, seguidas da FD-F com 46,42 mg/g EAG e da FD-C com 55,15 mg/g EAG, da FHM-C com 41,24 mg/g EAG e da FHM-F com 34,84 mg/g EAG. A FH de folhas não apresentou substâncias fenólicas detectáveis por colorimetria e a FH de colmo apresentou 24,57 mg/g EAG de substâncias fenólicas (Tabela 2.1).

Com relação ao doseamento de flavonoides, o EE-F apresentou 7,01 mg/g EQ e o EE-C 2,86 mg/g EQ. Das fases providas dos colmos, apenas a FD-C apresentou flavonoides (7,04 mg/g EQ). Das fases dos EE-F, a FD-F foi a que apresentou uma maior abundância de flavonoides (13,89 mg/g EQ), seguida da FAE-F (10,69 mg/g EQ), já na FHM-F e FH-F não foram detectados flavonoides pelo método utilizado (Tabela 2.1) (ver curvas em Anexo 1).

Tabela 2.1 – Quantidade de substâncias fenólicas totais equivalente a ácido gálico (mg/g EAG)*; flavonas/flavonóis equivalentes a quercetina (mg/g EQ)** nas folhas e colmos de *M. pluriflora*. (EE) extrato bruto etanólico (F) de folhas e (C) de colmos; (FH) fase de hexano (F) de folhas e (C) de colmos; (FD) fase de diclorometano (F) de folhas e (C) de colmos; (FAE) fase de acetato de etila (F) de folhas e (C) de colmos; (FHM) fase hidrometanólica (F) de folhas e (C) de colmos. Resultados apresentados em média $\pm$ desvio padrão. - : amostras que apresentaram valores abaixo aos detectados pelo método utilizado.

Amostras	Fenóis Totais (mg/g EAG)*	Flavonoides (mg/g EQ)**
EE-F	49,82 $\pm$ 3,15	7,01 $\pm$ 1,17
FH-F	-	-
FD-F	46,42 $\pm$ 2,95	13,89 $\pm$ 5,07
FAE-F	66,68 $\pm$ 5,15	10,69 $\pm$ 1,58
FHM-F	34,84 $\pm$ 2,63	-
EE-C	73,73 $\pm$ 6,15	2,86 $\pm$ 0,42
FH-C	24,57 $\pm$ 4,82	-
FD-C	55,15 $\pm$ 3,30	7,04 $\pm$ 1,58
FAE-C	102,25 $\pm$ 5,68	-
FHM-C	41,24 $\pm$ 3,54	-

Em estudos de doseamento de substâncias fenólicas presentes nas folhas de *Schizostachyum lumampao* (Blanco) Merr., o extrato etanólico apresentou 0,76 mg/g EAG de substâncias fenólicas totais, já o extrato aquoso apresentou uma quantidade ainda menor de fenólicos como constituintes, apenas 0,13 mg/g EAG (Tongco *et al.*, 2014). É possível observar que em *M. pluriflora* esses

valores foram bem superiores, tanto para as folhas quanto para os colmos, o que pode refletir a influência do método de extração utilizado.

Essa distribuição dos constituintes fenólicos entre as diferentes amostras está relacionada com a diferente polaridade dos solventes usados. As substâncias fenólicas, no geral, possuem um caráter mais polar, portanto, possuem maior afinidade a solventes mais polares, como é o caso do acetato de etila, do etanol e da água, quando comparados aos outros dois solventes utilizados, hexano e diclorometano. Por exemplo, em *Dendrocalamus strictus* os autores observaram uma maior quantidade de fenóis totais no extrato aquoso e metanólico e menor quantidade desses constituintes no extrato de acetona (Goyal *et al.*, 2011). Assim como para *M. pluriflora*, a quantidade de fenóis totais em folhas e colmos é superior nos extratos brutos etanólicos e nas fases de acetato de etila.

Em *Dendrocalamus strictus* a quantidade de flavonoides foi superior no extrato metanólico, seguido do extrato aquoso, e por fim o extrato de acetona (Goyal *et al.*, 2011). Recentemente Echavarría *et al.* (2012), encontraram em *Guadua angustifolia* Kunth alta concentração de compostos fenólicos no vinagre produzido pelo processo de pirólise, também apresentando alta atividade antioxidante, com potencial para aplicação como conservante natural na indústria alimentícia, algo que vem sendo explorado pelos chineses.

Já a espécie asiática de bambu *Schizostachyum lumampao*, apresentou 0,70 mg/g EQ de flavonoides no extrato etanólico e 0,17 mg/g EQ no extrato aquoso de suas folhas (Tongco *et al.*, 2014). Para *M. pluriflora* tanto as fases mais aquosas, a hidrometanólica (FHM), quanto as mais apolares, de hexano (FH), para ambos os órgãos estudados, não foram detectados flavonoides pela metodologia utilizada.

É possível observar que a quantidade de flavonoides foi superior nas fases de diclorometano e de acetato de etila, tanto para folhas, quanto para os colmos de *M. pluriflora*. Flavonoides, em geral, possuem um caráter mais polar, pois são substâncias com grande número de hidroxilas e são geralmente encontrados na forma glicosilada, isso torna essas moléculas mais polares, sendo mais solúveis em solventes como etanol, metanol, acetona, DMSO e água (Markham, 1982). Já os flavonoides em sua forma aglicona, assim como os flavonoides metoxilados ou prenilados, tendem a ser solúveis em solventes como éter, clorofórmio e diclorometano (Markham, 1982). Com isso podemos inferir que os flavonoides presentes em *M. pluriflora*, e que foram arrastados para a fase de diclorometano, devam ser metoxilados ou prenilados, mais solúveis nesse solvente.

Ao analisarmos as porcentagens de fenóis totais e flavonoides presentes em *M. pluriflora* (figura 2.8), podemos notar que a população estudada desta espécie, apresenta muitos constituintes fenólicos não pertencentes à classe dos flavonoides, principalmente nos colmos.

Figura 2.8 – Porcentagem das substâncias fenólicas presentes nos extratos brutos etanólicos (EE) e nas fases geradas da partição desses extratos: (FH) fase de hexano; (FD) fase de diclorometano; (FAE) fase de acetato de etila; (FHM) fase hidrometanólica.

3.3.2. Taninos totais e proantocianidinas

Com relação ao doseamento de taninos totais e proantocianidinas, tanto as amostras de folhas quanto as de colmos da população de *M. pluriflora* estudada não apresentaram proantocianidinas como seus constituintes. Na quantificação de taninos totais apenas o EE-F apresentou tanino como constituinte, 8,82 mg/g EAT, esse valor corresponde a 0,9 % de taninos em folhas. Já nas quantificações de colmos, as amostras analisadas não responderam à metodologia utilizada (ver curvas em Anexo 1).

Coffie *et al.* (2014), ao estudarem duas variedades da espécie *Bambusa vulgaris*; *Bambusa vulgaris vittata* e *Bambusa vulgaris vulgaris*, também não encontraram taninos na composição de suas folhas. Já as espécies *Bambusa ventricosa* McClure e *Oxytenanthera abyssinica* (A. Rich.) Munro apresentaram taninos como seus constituintes. Silva *et al.* (2012) também não observaram taninos em *Bambusa textilis* McClure, embora os pesquisadores tenham feito apenas uma detecção de tais metabólitos e não uma quantificação como foi o caso deste trabalho.

A função ecológica atribuída aos taninos para as plantas é a proteção e defesa desses vegetais contra a herbivoria (Dewick, 2009) e a presença ou ausência de muitos desses compostos pode estar diretamente relacionada ao ambiente em que eles se encontram e ao tipo de estresse biótico e abiótico ao qual estão submetidos. A ausência desses compostos em *M. pluriflora* pode indicar que essa estratégia de defesa não foi selecionada por essa espécie ao longo de seu histórico evolutivo. Por outro lado, é interessante comentar que, tanto a folha quanto o colmo, são altamente fibrosos nessa espécie, o que pode servir como uma barreira e proteção contra herbívoros e patógenos. Além disso, se considerarmos as descrições apresentadas para Poaceae pelo APG (Angiosperm Phylogeny Group <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>) com relação à caracterização química, essa família pode ser caracterizada pela presença de 3-desoxiantocianinas, flavonas 5- e C-glicosiladas, tricina, flavonoides sulfatados, glicosídeos cianogênicos e a ausência de taninos. Dessa forma, a ausência de taninos na espécie estudada também se justifica pelo seu histórico evolutivo.

3.3.3. Caracterização e quantificação de substâncias fenólicas via CLAE-DAD

Analizando os cromatogramas do EE-F e EE-C é possível notar que quando detectamos substâncias a 280 nm podemos observar uma quantidade maior de bandas nos cromatogramas (Figura 2.9 e 2.10) com relação a 352 nm, o que corrobora os resultados do doseamento, em que flavonoides são a classe de substâncias fenólicas de menor abundância nas folhas e colmos de *M. pluriflora*. Substâncias com apenas uma banda de absorção máxima no espectro de UV-Visível entre 250 e 280 nm são majoritárias nos extratos estudados, indicando a presença de outros fenólicos que não flavonoides (Markham, 1982).

Com relação a flavonoides, essas substâncias são melhor evidenciadas na detecção a 352 nm, pois o espectro UV-Visível de flavonoides caracteriza-se pela presença de duas bandas máximas de absorção, banda I entre 300-550 nm e a banda II entre 240-285 nm. A posição precisa e a intensidade das máximas fornecem informações sobre a natureza do flavonoide e seus graus de oxigenação (Markham, 1982).

Comparando o cromatograma obtido para o EE-F e o obtido para o EE-C no comprimento de detecção de 352 nm, podemos observar uma maior quantidade de constituintes no EE-F, o que nos sugere que as folhas de *M. pluriflora* apresentam maior abundância de constituintes flavonoídicos do que os colmos. Novamente, os resultados dos doseamentos corroboram os resultados encontrados utilizando-se CLAE-DAD, onde as amostras de folhas apresentaram maiores conteúdos de flavonoides quando comparadas às dos colmos (Figura 2.8).

Vale ressaltar que o EE-F e o EE-C foram injetados na mesma concentração (2 mg/mL), o que nos permite fazer comparações entre as abundâncias dos constituintes presentes em ambas as

amostras. Portanto, em uma análise preliminar do cromatograma de EE-C, podemos notar que dois constituintes se destacam dos demais em abundância, sendo eles os picos **23** e **27**. Ao observarmos as abundâncias dos cromatogramas de folhas e colmos podemos perceber, ainda, que os constituintes detectados em 280 nm estão em maiores quantidades nos colmos quando comparados aos presentes nas folhas.

Figura 2.9 – Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD do extrato bruto etanólico de folhas (EE-F) detectados a 352nm (A) e 280nm(B). Destacado em vermelho os constituintes encontrados em ambos os órgãos estudados.

Figura 2.10 – Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD do extrato bruto etanólico de colmos (EE-C) detectados a 352nm (A) e 280nm (B). Destacado em vermelho os constituintes encontrados em ambos os órgãos estudados.

Observando os espectros UV-Visível do EE-F e do EE-C (Figura 2.11) notamos uma maior abundância de espectros correspondentes a ácidos fenólicos e/ou fenilpropanóides. No total, foram integrados 33 picos considerando-se os cromatogramas para folhas e colmos, mas apenas sete picos apresentaram espectros UV-Vis correspondentes a flavonoides (**8, 11, 16, 18, 19, 20 e 24**). Ainda, se compararmos os cromatogramas dos EE, podemos notar que apenas três picos são coincidentes (**23, 24 e 27**), o que evidencia composições diferentes de derivados fenólicos entre os dois órgãos analisados.

Analisando os espectros UV-visível e os tempos de retenção dos constituintes detectados no EE-F e comparando-os com os de padrões de ácidos fenólicos, fenilpropanoides, derivados de ácido clorogênico e flavonoides injetados na mesma metodologia, pudemos identificar o pico **7** como ácido cafeíco, o pico **17** como ácido ferúlico e o pico **19** como o flavonoide vitexina.

Essa análise preliminar indica que as folhas de *M. pluriflora* possuem outras substâncias fenólicas (como fenilpropanoides e ácidos fenólicos) que não flavonoides como seus constituintes majoritários. Com base nos espectros UV-visível dos constituintes do EE-F, podemos inferir, ainda, que os flavonoides que ocorrem em *M. pluriflora* são da classe das flavonas, particularmente derivados de apigenina e, no caso da vitexina (**19**), C-glicosilados.

Os dados de substâncias fenólicas observadas em *M. pluriflora* corroboram os estudos realizados por Van Hoyweghen *et al.* (2012), no qual os autores relatam que as substâncias fenólicas mais abundantes encontradas em folhas de doze espécies asiáticas de bambus estudadas pelos autores, foram os ácidos fenólicos e as flavonas, nessas espécies, principalmente as derivadas de luteolina.

Como dito, todos os tempos de retenção dos cromatogramas obtidos do EE-F e do EE-C foram comparados com os tempos de retenção de amostras autênticas que foram injetadas na mesma metodologia. Alguns dos constituintes fenólicos observados em *M. pluriflora* foram quantificados usando uma curva de calibração de ácido clorogênico, pois em ambos os extratos brutos foi possível observar alguns espectros de absorção UV-visível semelhantes ao apresentado por essa classe de substâncias, outros foram quantificados utilizando uma curva de calibração construída com ácido *p*-cumárico; e todos os constituintes flavonoídicos foram quantificados utilizando uma curva construída com a flavona luteolina (ver curvas em Anexo 1).

Portanto, nas quantificações realizadas por CLAE-DAD, o EE-F apresentou 6,79 mg/g de fenilpropanoides equivalentes ao ácido *p*-cumárico (mg/g EAP); 1,41 mg/g de substâncias equivalentes ao ácido clorogênico (mg/g EAC) e 0,32 mg/g de flavonoides equivalentes à luteolina (mg/g EL). Já o EE-C apresentou 8,09 mg/g de fenilpropanoides equivalentes ao ácido *p*-cumárico (mg/g EAP); 5,27 mg/g de substâncias equivalentes ao ácido clorogênico (mg/g EAC) e 0,11 mg/g de flavonoides equivalentes à luteolina (mg/g EL) assim como podemos observar na tabela 2.2.

Figura 2.11 – Espectros de absorção UV-Visível dos picos dos cromatogramas CLAE-DAD do extrato bruto etanólico de folhas e colmos detectados a 352 nm e 280 nm. Destacado em vermelho os constituintes encontrados em ambos os órgãos estudados.

Figura 2.11 – continuação.

Tabela 2.2 – Componentes majoritários obtidos por CLAE-DAD (352 e 280 nm) presentes nos extratos brutos de fases de folhas e colmos de *M. pluriflora*. (EE) extrato bruto etanólico (F) de folhas e (C) de colmos; (FH) fase de hexano (F) de folhas e (C) de colmos; (FD) fase de diclorometano (F) de folhas e (C) de colmos; (FAE) fase de acetato de etila (F) de folhas e (C) de colmos; (FHM) fase hidrometanólica (F) de folhas e (C) de colmos. Destacado em **negrito** os constituintes presentes em folhas e colmos de *M. pluriflora*.

Pico	TR	UV-visível (nm)	Substância/Classe	Amostras (mg/g) ^{a,b,c}									
				EE-F	FHM-F	FAE-F	FD-F	FH-F	EE-C	FHM-C	FAE-C	FD-C	FH-C
1	3,088	310	fenilpropanoide	0,47									
2	3,195	310	fenilpropanoide	0,67									
3	3,595	310	fenilpropanoide	0,53	0,52	0,47							
4	3,726	310	fenilpropanoide	0,56									
5	4,741	310	fenilpropanoide	0,39	0,39	0,61							
6	4,941	290	fenilpropanoide	0,40									
7	6,110	290, 320	ácido cafeico	0,63									
8	6,931	260, 300	Flavanona						*				
9	8,517	280	fenilpropanoide				0,97		0,57		0,50	2,02	
10	9,573	280	fenilpropanoide	0,61							0,42		
11	10,004	270, 335	derivado de apigenina	*	*	*				*			
12	10,131	280	fenilpropanoide						0,42		0,51		
13	10,382	290, 320	derivado de ác. clorogênico	0,18									
14	10,744	310	fenilpropanoide						1,40		3,28	2,20	0,59
15	11,446	290, 320	derivado de ác. clorogênico	1,22			0,77						
16	11,605	270, 340	derivado de apigenina	*	*	*							
17	12,769	280	ácido ferúlico	0,39									
18	13,041	270, 340	Isovitexina	0,12		0,30							
19	13,438	270, 300 (om), 335	Vitexina	0,20	*	0,51							
20	14,609	270, 340	derivado de apigenina	*		0,11							
21	27,921	290, 320	derivado de ác. clorogênico						0,12		0,11	0,79	
22	28,951	290, 320	derivado de ác. clorogênico						0,54		1,15	0,61	1,00
23	29,358	290, 320	cafeato de metila	0,41		0,50	1,35		2,16		1,00	9,28	2,83
24	29,631	270, 340	derivado de apigenina	*		*			0,11	0,07	0,21		
25	29,885	290, 320	derivado de ác. clorogênico			0,06			*			0,69	0,43

Tabela 2.2 – continuação.

Pico	TR	UV-visível (nm)	Substância/Classe	Amostras (mg/g) ^{a,b,c}									
				EE-F	FHM-F	FAE-F	FD-F	FH-F	EE-C	FHM-C	FAE-C	FD-C	FH-C
26	30,067	310	Fenilpropanoide						0,34			0,95	
27	30,164	290, 320	derivado de ác. Clorogênico	0,01			1,55		3,01		0,41	18,11	4,03
28	32,425	290, 320	derivado de ác. Clorogênico	*			1,61					0,90	
29	35,642	310	Fenilpropanoide	0,35								0,71	
30	39,489	275	Fenilpropanoide	0,45			1,60					0,60	
31	39,781	275	Fenilpropanoide	0,39			0,52	2,55				0,71	
32	40,398	275	Fenilpropanoide	0,53	0,41	0,40	0,44	0,51					1,22
33	40,839	280	Fenilpropanoide					0,41	0,53	0,43	0,44		0,81
Fenilpropanoides (mg/g EAP) ^a				6,79	1,32	1,98	4,88	3,47	8,09	0,43	6,15	16,47	5,45
Derivados de ácido clorogênico (mg/g EAC) ^b				1,41	-	0,06	3,93	-	5,27	-	1,67	21,10	5,46
Flavonoides (mg/g EL) ^c				0,32	-	0,92	-	-	0,11	0,07	0,21	-	-

^a – quantificados em mg equivalente ao ácido *p*-cumárico por g de amostra (mg/g EAP);

^b – quantificados em mg equivalente ao ácido clorogênico por g de amostra (mg/g EAC);

^c – quantificados em mg equivalente a luteolina por g de amostra (mg/g EL).

* valores não quantificáveis.

-: amostras que não apresentaram constituintes equivalentes aos padrões.

Os dados obtidos da caracterização e quantificação de substâncias fenólicas via CLAE-DAD corroboram os dados de doseamentos em microplacas, onde foi possível observar uma quantidade maior de substâncias fenólicas totais do que flavonoides, em ambos os órgãos estudados, principalmente no colmo, onde foi observado apenas um espectro de flavonoide na análise em CLAE-DAD.

Na revisão feita por Shukla *et al.* (2012) sobre a importância medicinal dos bambus, os autores ressaltam que a maioria das substâncias fenólicas encontradas em bambus é da classe das flavonas glicosiladas, em especial C-glicosídeos, como a vitexina, orientina, homo-orientina, e isovitexina. Relatam, ainda, que os fenilpropanoides comumente encontrados são os derivados do ácido cinâmico, como é o caso do ácido cafeico e ferúlico, além de derivados do ácido clorogênico. Kim *et al.* (2009) identificaram nas folhas de *Phyllostachys nigra* a presença dos flavonoides, orientina, isorientina, vittariflavona, tricina e luteolina 6-C-(6''-O-trans-cafeoil glucosídeo). Alguns desses compostos citados por Shukla *et al.* (2012) também foram detectados em *M. pluriflora* da população estudada.

Com relação aos flavonoides, o colmo apresentou uma menor quantidade dessas substâncias quando comparado às folhas. Esse perfil de constituintes fenólicos no colmo também foi observado por Keski-Saari *et al.* (2008), que ao estudarem os colmos de cinco espécies asiáticas de bambus, que servem de alimento para o panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*), verificaram que os constituintes fenólicos presentes nessas espécies são principalmente derivados do ácido clorogênico e flavonoides em pequenas quantidades, principalmente da classe das flavonas.

Nas quantificações via CLAE-DAD (Tabela 2.2) das fases obtidas da partição dos extratos brutos, podemos notar que a FD-C se destacou das demais fases por apresentar as maiores quantidades de fenilpropanoides equivalentes ao ácido *p*-cumárico e de substâncias derivadas do ácido clorogênico, com 16,47 mg/g EAP e 21,10 mg/g EAC, respectivamente. Já a FAE-F se destacou por apresentar a maior quantidade de flavonoides equivalentes a luteolina, com 0,92 mg/g EL.

Observando a tabela 2.2 a FAE-F e a FAE-C foram as fases que apresentaram flavonoides em maior abundância. Contudo, nos doseamentos por colorimetria, as fases FD-F e FD-C foram as que apresentaram as maiores quantidades de flavonoides. Essa diferença pode ter sido causada devido à integração dos picos utilizada, que priorizou os constituintes majoritários, pois os picos correspondentes a flavonoides presentes nessas fases estavam em menor abundância e muito provavelmente foram excluídos na integração, não sendo quantificados. Além disso, o doseamento pode ter superestimado a quantidade desses constituintes, principalmente nas fases mais apolares onde facilmente se detecta turbidez na solução de análise após a adição do cloreto de alumínio.

3.4. Fracionamento e identificação dos constituintes fenólicos via RMN

Das fases de folhas submetidas ao fracionamento via CLAE semi-preparativo, a FD-F não obteve um sucesso na separação dos constituintes, gerando frações com muitas misturas de constituintes, com baixo rendimento e, portanto, não sendo possível o envio para as análises por RMN. Já o fracionamento da FHM-F embora não resultou em massa suficiente dos isolados para a identificação via RMN, foi muito eficiente, gerando frações com constituintes isolados. É necessário submeter essa fase a novos fracionamentos utilizando maior quantidade de massa seca desta fase para se obter maior rendimento dos isolados, o que não houve tempo hábil durante a execução deste projeto. Nenhuma análise por RMN foi realizada com as frações obtidas dessas duas fases.

Da FAE-F foram obtidas 16 frações, contudo, apenas seis delas apresentaram substâncias isoladas e foram submetidas RMN ^1H para a identificação do constituinte fenólico.

Nas quantificações via CLAE-DAD das frações obtidas da FAE-F, a FAE-F2 apresentou a maior quantidade de substâncias equivalentes ao ácido *p*-cumárico (26,84 mg/g EAP); a FAE-F15 a maior quantidade de substâncias equivalentes a derivados dos ácido clorogênico (24,41 mg/g EAC) e a FAE-F16 a maior quantidade de substâncias equivalentes a luteolina (76,62 mg/g EL). No geral, podemos notar que quase todas as frações apresentaram flavonoides, com exceção da FAE-F15 (Tabela 2.3).

Das frações obtidas através do isolamento via CLAE semi-preparativo da FAE-F, foi possível identificar os constituintes de apenas duas das frações analisadas. Portanto, dois constituintes fenólicos presentes em folhas de *M. pluriflora* da população estudada foram identificados através de RMN de ^1H , sendo eles: o constituinte **18** correspondente a isovitexina e o **23** ao cafeato de metila, ambos os dados estão apresentados nas tabelas 2.4 e 2.5, respectivamente. Já as estruturas químicas desses compostos estão ilustradas na figura 2.12.

Tabela 2.3 – Componentes majoritários obtidos por CLAE-DAD (352 e 280 nm) presentes nas frações obtidas do fracionamento via CLAE semi-preparativo da FAE-F. Destacado em negrito os constituintes encontrados em folhas e colmos de *M. pluriflora*.

[illegible]

Tabela 2.3 – continuação.

Pico	Substância/Classe	Amostras (mg/g) ^{a,b,c}															
		FAE-F1	FAE-F2	FAE-F3	FAE-F4	FAE-F5	FAE-F6	FAE-F7	FAE-F8	FAE-F9	FAE-F10	FAE-F11	FAE-F12	FAE-F13	FAE-F14	FAE-F15	FAE-F16
27	derivado de ác. Clorogênico																
28	derivado de ác. Clorogênico															24,41	
29	Fenilpropanoide																
30	Fenilpropanoide																
31	Fenilpropanoide																
32	Fenilpropanoide																
33	Fenilpropanoide																
Fenilpropanoides (mg/g EAP)^a		5,74	26,84	24,27	23,97	-	-	-	-	-	4,51	-	-	-	-	-	-
Derivados de ácido clorogênico (mg/g EAC)^b		1,22	-	-	-	-	-	-	-	0,86	2,11	-	-	-	-	24,41	-
Flavonoides (mg/g EL)^c		4,26	15,53	22,47	9,35	45,33	28,39	10,69	10,69	0,51	0,03	4,33	12,39	2,51	4,32	-	76,62

^a – quantificados em mg equivalente ao ácido *p*-cumárico por g de amostra (mg/g EAP);

^b – quantificados em mg equivalente ao ácido clorogênico por g de amostra (mg/g EAC);

^c – quantificados em mg equivalente a luteolina por g de amostra (mg/g EL).

* valores não quantificáveis.

-: amostras que não apresentaram constituintes equivalentes aos padrões.

#: amostras identificadas por RMN.

Tabela 2.4 - Dados de RMN de ^1H para o constituinte **18**, isovitexina, isolado de *M. pluriflora* (DMSO- d_6 , 400 MHz.).

H	Constituinte 18 (DMSO- d_6) (Isovitexina)	*Literatura (DMSO- d_6) (Isovitexina)
3	δ 6,76 s	δ 6,77 s
8	δ 6,47 s	δ 6,51 s
2', 6'	δ 7,91 d ($J=8,7$ Hz)	δ 7,92 d ($J=8,7$ Hz)
3', 5'	δ 6,92 d ($J=8,7$ Hz)	δ 6,93 d ($J=8,7$ Hz)
OH- C_5	δ 13,15 s	δ 13,53 s
1"	δ 4,64 d ($J=10,5$ Hz)	δ 4,59 d ($J=9,8$ Hz)
2"	δ 4,11 d ($J=7,8$ Hz)	δ 4,04 t ($J=9,1$ Hz)
3"	δ 3,2 - 3,6	δ 3,21 t ($J=8,4$ Hz)
4"		δ 3,13 t ($J=9,2$ Hz)
5"		δ 3,16 m
6"		δ 3,40; 3,61 bnd ($J=10,9$ Hz)

*Jayasinghe, U.L.B.; Balasooniya, B.A.I.S.; Bandara, A.G.D.; Fujimoto, Y. Nat. Prod. Res. 2004, 18(6): 499-502. δ - deslocamento químico (ppm); J – constante de acoplamento (Hz).

Tabela 2.5 - Dados de RMN de ^1H para o constituinte **23**, cafeato de metila, isolado de *M. pluriflora* (DMSO- d_6 , 400 MHz.).

H	Constituinte 23 (DMSO- d_6) (Cafeato de metila)	*Literatura (DMSO- d_6) (Cafeato de metila)
2	δ 7,10 d ($J=2,2$ Hz)	δ 7,05 d ($J=2,1$ Hz)
5	δ 6,77 d ($J=8,2$ Hz)	δ 6,76 d ($J=8,2$ Hz)
6	δ 6,96 dd ($J=2,2$ e $8,2$ Hz)	δ 7,00 dd ($J=2,1$ e $8,2$ Hz)
7	δ 7,29 d ($J=15,7$ Hz)	δ 7,48 d ($J=15,9$ Hz)
8	δ 6,42 d ($J=15,7$ Hz)	δ 6,27 d ($J=15,9$ Hz)
ome	δ 3,78 s	δ 3,68 s

*Silva, F. A. M.; Bonges, F.; Guimarães, C.; Lima, J. L. F. C.; Matos, C.; Reis, S. Agric. Food Chem. 2000, 48: 2122 – 2126. δ - deslocamento químico (ppm); J – constante de acoplamento (Hz).

Figura 2.12 – Estrutura química dos constituintes identificados em folhas e colmos de *M. pluriflora*. (7) ácido cafeíco; (17) ácido ferúlico; (18) isovitexina; (19) vitexina; (23) cafeato de metila.

Em bambus, os compostos fenólicos são de grande interesse e diversas pesquisas destacam a presença de flavonoides C-glicosilados e fenilpropanoides como as substâncias de maior abundância em suas folhas (Zhang *et al.*, 2008; Coffie *et al.*, 2014). Como visto anteriormente na tabela 2.2, além dos dois constituintes que foram identificados via RMN (isovitexina e cafeato de metila), outros três constituintes presentes em folhas de *M. pluriflora* foram identificados com base nos tempos de retenção dos padrões utilizados, sendo eles a vitexina, o ácido ferúlico e o ácido cafeico (Figura 2.1). Todos esses constituintes já foram reportados em outras espécies de bambus, a vitexina por exemplo, em *Phyllostachys nigra* (Kim *et al.*, 2009) e em *Sasa argenteastriatus* (Ni *et al.*, 2012); já o ácido cafeico foi reportado em *Phyllostachys humilis* (Van Hoyweghen *et al.*, 2012) e em *Sasa argenteastriatus*, nessa última, o ácido ferúlico também foi reportado (Ni *et al.*, 2012). Portanto, já era de se esperar que *M. pluriflora* também pudesse apresentar esses constituintes.

Por fim, analisando os dados obtidos pela quantificação do EE de folhas e colmos podemos concluir que as amostras de *M. pluriflora* deste estudo apresentaram maior quantidade de substâncias fenólicas nos colmos e maior quantidade de flavonoides nas folhas, padrão condizente em ambas as metodologias de quantificação aplicadas. Portanto, podemos inferir que a composição fenólica de *M. pluriflora* da população estudada é composta majoritariamente por ácidos fenólicos, fenilpropanoides e derivados de ácido clorogênico, para ambos os órgãos estudados, e que os poucos flavonoides detectados são derivados da flavona apigenina.

4. Conclusões

Dos metabólitos primários quantificados em *M. pluriflora*, os lipídeos se destacaram em maiores quantidades para ambos os órgãos estudados. Com relação as substâncias fenólicas, foi possível observar que o extrato bruto dos colmos de *M. pluriflora*, apresentou uma maior abundância de ácidos fenólicos, fenilpropanoides e derivados do ácido clorogênico em relação às folhas. Já o extrato bruto das folhas apresentou uma maior abundância de flavonoides, quando comparada aos colmos, todos derivados de apigenina. Das fases geradas desses extratos brutos, podemos notar que as fases de acetato de etila e de diclorometano, para ambos os órgãos, foram as que reteram a maior parte dos constituintes fenólicos, sendo as fases de acetato de etila mais ricas em flavonoides e as de diclorometano em ácidos fenólicos, fenilpropanoides e derivados do ácido clorogênico.

Já era de se esperar a presença de flavonoides *C*-glicosilados, como o caso da isovitexina e vitexina identificadas nas folhas de *M. pluriflora*, visto que essas substâncias são comumente encontradas em bambus, e em monocotiledôneas no geral.

Com isso podemos inferir que os bambus nativos podem ser fontes de metabólitos de interesse econômico, como os lipídeos e as substâncias fenólicas, que possuem potencial para exploração por diversos segmentos da indústria, entretanto, o rendimento dessas classes de substâncias não foi compatível com o apresentando pelas espécies já em uso comercial.

5. Referências bibliográficas

- Ahmad, M. U.; Husain, S. K.; Osman, S. M. Ricinoleic acid in *Phyllanthus niruri* seed oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 58 (6): 673-674, 1981.
- Buchanan, B. B.; gruissem, W.; Jones, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367p.
- Coffie, G. Y.; Antwi-boasiako, C.; Darkwa, N. A. Phytochemical constituents of the leaves of three bamboo (Poaceae) species in Ghana. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, 2 (6): 34-38, 2014.
- Choudhury, D.; Sahu, J. K.; Sharma, G. D. Biochemistry of bitterness in bamboo shoots. **Assam University Journal of Science & Technology: Physical Sciences and Technology**, 6(2): 105-111, 2010.
- Chongtham, N., Bisht, M. S., Haorongbam, S. Nutritional properties of bamboo shoots: potential and prospects for utilization as a health food. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, 10 (3): 153-168, 2011.
- Clemente, M. S. Análise da variação genética de populações de *Vochysia pyramidalis* e *V. tucanorum* por AFLP e da composição de ácidos graxos de sementes. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Orientadora: Salatino, M. L. F.), para a obtenção do título de Mestre em Botânica, 2010.
- Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). Chapter 24 in **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones, Eds., 2000.
- Dewick, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. New York: John Wiley & Sons, 2009.
- Duarte, T. S. & Peil R. M. N. Relações fonte: dreno e crescimento vegetativo do meloeiro. **Horticultura Brasileira**, 28 (3): 271-276, 2010.
- Echavarría, C. C. A.; Yepes, F. J.; Torres, H. P. Determinación del potencial antioxidante en extractos de vinagre *Guadua angustifolia* Kunth para aplicaciones alimenticias. **Revista Cubana de Plantas Medicinales** 17(4): 330-342, 2012.
- Furlan, C. M.; Santos, K. P.; Sedano-Partida, M. D.; Motta, L. B.; Santos, D. Y. A. C.; Salatino, M. L. F.; Negri, G.; Berry, P. E.; Van ee, B. W.; Salatino, A. Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of *Croton* (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Botany**, 2015. DOI 10.1007/s40415-014-0115-9.
- Goyal, A. K.; Middha, S. K.; Sen, A. In vitro antioxidative profiling of different fractions of *Dendrocalamus strictus* (roxb.) Nees leaf extracts. **Free Radicals and Antioxidants**, 1 (2): 42-48, 2011.
- He, m.; Wang, J.; Qin, H.; Shui, Z.; Zhu, Q.; Wu, B.; Tan, F.; Pan, K.; Hu, Q.; Dai, L.; Wang, W.; Tang, X.; Hu, G. Q. Bamboo: A new source of carbohydrate for biorefinery. **Carbohydrate Polymers**, 111: 645-654, 2014.
- Kim, C. Y.; Lee, H. J.; Jung, S. H.; Lee, E. H.; Cha, K. H.; Kang, S. W.; Pan, C.; Um, B. Rapid identification of radical scavenging phenolic compounds from black bamboo leaves using high-performance liquid chromatography coupled to an online ABTS⁺-based assay. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, 52(6): 613-619, 2009.

- Keski-saari, S.; Vladimir Ossipov, V.; Julkunen-tiittoc, R.; Jia, J., Danell, K.; Veteli, T.; Guiquanf, Z.; Yaowug, X.; Niemela, P. Phenolics from the culms of five bamboo species in the Tangjiahe and Wolong Giant Panda Reserves, Sichuan, China. **Biochemical Systematics and Ecology**, 36: 758-765, 2008.
- Machado, G. C.; Chaves, J. B. P.; Antoniassi, R. Composição em ácidos graxos e caracterização física e química de óleos hidrogenados de coco babaçu. **Revista Ceres**, 53 (308): 463-470, 2006.
- Markham, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. London; New York: Academic Press, 1982.
- Mejía, A. I. G.; Gallardo, C. C.; Vallejo, J. J. O.; Ramírez, G. L.; Arboleda, C. E.; Durango, E. S. A.; Jaramillo, F. A. Y.; Cadavid, E. T. Plantas del género *Bambusa*: importancia y aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria. **Vitae, Revista de la Facultad de química farmacéutica**, 16 (3): 396-405, 2009.
- Moreira, F. A. Perfil da alteração na produção de substâncias fenólicas e açúcares livres na interação entre *Tapirira guianensis* Aubl. (Anacardiaceae) parasitada por *Phoradendron crassifolium* (Pohl ex DC.) Eichler (Santalaceae). Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Botânica, 2015.
- Ni, Q.; Xu, G.; Wang, Z.; Gao, Q.; Wang, S.; Zhang, Y. Seasonal variations of the antioxidant composition in ground bamboo *Sasa argenteostriatus* leaves. **International Journal of Molecular Sciences**, 13(2): 2249-2262; 2012.
- Pianovski, A. R.; Vilela, A. F. G.; Silva, S. A. S.; Lima, C. G.; Silva, K. K.; Carvalho, V. F. M.; De musis, C. R.; Machado, S. R. P.; Ferrari, M. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 44 (2): 249-259, 2008.
- Rezende, F. M. Efeito da atmosfera enriquecida com CO₂ em mudas de *Psidium guajava* L. cv. Pedro Sato. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Botânica, 2013.
- Rezende, F. M.; Souza, A. P.; Buckeridge, M. S.; Furlan, C. M. Is guava phenolic metabolism influenced by elevated atmospheric CO₂? **Environmental Pollution**, 196: 483-488, 2015.
- Santos, K. P. *Croton sphaerogynus* Baill.: substâncias fenólicas e atividades biológicas. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Botânica, 2014.
- Silva, M. A.; Roder, M. A.; Pereira, M. A. R.; Neves, F. T. A.; Constantino, D. Avaliação farmacognóstica qualitativa das folhas do vegetal *Bambusa textilis*. **Salusvita**, 31(3): 237-246, 2012.
- Shukla, R.; Sumit, G.; Sajal, S.; Dwivedi, P. K.; Mishra, A. Medicinal importance of bamboo. **International Journal of Biopharm & Phytochemical Research**, 1(1): 9-15, 2012.
- Taiz, L. & Zeiger, E. **Fisiologia Vegetal**. São Paulo: Artmed, 2009.
- Tongco, J. V. V.; Aguda, R. M.; Razal, R. A. Proximate analysis, phytochemical screening, and total phenolic and flavonoid content of Philippine bamboo *Schizostachyum lumampao*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, 6(1): 709-713, 2014.
- Van Hoyweghen, L.; De Beer, T.; Deforce, D.; Heyerick, A. Phenolic compounds and anti-oxidant capacity of twelve morphologically heterogeneous bamboo species. **Phytochemical Analysis**, 23: 433-443, 2012.
- Vianni, R. & Braz-filho, R. Ácidos graxos naturais: importância e ocorrência em alimentos. **Química Nova**, 19 (4): 400-407, 1996.

Zhang, Y.; Jiao, J.; Liu, C.; Wu, X.; Zhang, Y. Isolation and purification of four flavone C-glycosides from antioxidant of bamboo leaves by macroporous resin column chromatography and preparative high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, 107: 1326-1336, 2008.

Capítulo 3 -
Potencial biológico
dos extratos, fases e
substâncias isoladas de
Merostachys pluriflora

1. Introdução

1.1. Atividades biológicas dos produtos naturais

Desde tempos imemoriais as sociedades fazem uso de produtos naturais para alívio e cura de diversas doenças. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, principalmente no uso de plantas medicinais (David *et al.*, 2014).

Os produtos naturais, até os dias atuais, representam uma fonte de descobrimento de novas drogas. Segundo um levantamento realizado por Newman e Cragg (2016), nos últimos 34 anos foram aprovados 1.562 novos fármacos, sendo que 26% deles provêm de produtos naturais e/ou derivados. Esses dados mostram a importância e potencial dos produtos naturais para o tratamento de diversas doenças.

As propriedades medicinais de algumas plantas são conferidas, na grande maioria das vezes, pelos metabólitos secundários presentes nesses vegetais. Como visto, existe uma diversidade muito grande de metabólitos secundários agrupados e divididos em três grandes grupos de acordo com suas semelhanças estruturais e propriedades químicas, sendo então classificados em substâncias nitrogenadas, fenólicas e terpenoídicas (Dewick, 2009). Esses metabólitos conferem uma série de atividades biológicas aos vegetais, tais como atividade antitumoral, antifúngica, antiparasitária, anticolinesterásica, dentre tantas outras (Petersen e Amstutz, 2008).

Conforme visto no **Capítulo 1**, os bambus possuem uma diversidade de metabólitos secundários de importância medicinal, sobretudo substâncias fenólicas. A esse grupo de substâncias são atribuídas diversas atividades biológicas, como atividade antioxidante (Ghasemzadeh e Ghasemzadeh, 2011), antimicrobiana (Cushnie e Lamb, 2005) e antiviral (Andrae-Marobela *et al.*, 2013).

1.1.1. Atividade antioxidante

Oxidação é a conversão de uma substância química em um derivado com menor número de elétrons, portanto, é a perda de um ou mais elétrons para outra substância e o procedimento inverso é considerado como redução (Alves *et al.*, 2010). A transferência de elétrons é um dos processos químicos fundamentais para a sobrevivência das células. Contudo, esse mecanismo gera a produção de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem, quando em excesso, resultar em dano oxidativo (Cotinguiba *et al.*, 2013).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são átomos ou moléculas produzidos continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, como as envolvidas nos processos de fotossíntese e respiração, por exemplo. São moléculas quimicamente instáveis e são

altamente reativas, algumas delas apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, e participam das reações de oxirredução (Vasconcelos *et al.*, 2014). Para atingir a estabilidade, essas espécies reativas tendem a se associar rapidamente a outras moléculas de carga positiva, e com isso podem danificar células saudáveis do organismo (Augusto, 2006).

As principais fontes de espécies reativas são as organelas citoplasmáticas que metabolizam oxigênio, nitrogênio e cloro, gerando grande quantidade de metabólitos (Alves *et al.*, 2010), sendo a mitocôndria a principal geradora de espécies reativas por meio da cadeia transportadora de elétrons (Barbosa *et al.*, 2010). Contudo, sabe-se que vários fatores externos podem causar estresse oxidativo, tais como a poluição, o tabagismo, a dieta inadequada, os exercícios físicos realizados de forma extrema, dentre outros (Cotinguiba *et al.*, 2013; Vasconcelos *et al.*, 2014).

Como visto, as espécies reativas são produzidas naturalmente pelos organismos vivos, desempenham funções extremamente importantes ao metabolismo, pois possibilitam a geração de energia por intermédio da cadeia transportadora de elétrons, propiciam a fertilização do óvulo, além de participarem também na ativação de genes e mecanismos de defesa durante os processos infecciosos (Barbosa *et al.*, 2010). Porém, a produção excessiva dessas moléculas pode conduzir a danos oxidativos, tais como danos ao DNA, proteínas, organelas celulares (como mitocôndrias) e membranas, provocando alterações na estrutura e funções celulares e, dessa forma, se encontra envolvida em diversas patologias (Cotinguiba *et al.*, 2013).

Para manter o balanço de espécies reativas, os organismos vivos produzem substâncias que são capazes de regenerar ou prevenir os danos oxidativos, exercendo seu papel como antioxidante (Barbosa *et al.*, 2010; Alves *et al.*, 2010). O termo antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, presente em menores concentrações que as do substrato oxidável, seja capaz de atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz. Tais substâncias podem agir diretamente, neutralizando a ação dessas espécies reativas, ou indiretamente, participando dos sistemas enzimáticos com tal capacidade (Barbosa *et al.*, 2010).

Esse sistema antioxidante é usualmente dividido em dois: o enzimático, que inclui as enzimas superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e glutatona peroxidase, e o não enzimático, que é constituído por grande variedade de substâncias antioxidantes, que, nos animais, podem ter origem endógena, ou provir de fonte dietética como as vitaminas, minerais e as substâncias fenólicas (Barbosa *et al.*, 2010; Alves *et al.*, 2010; Vasconcelos *et al.*, 2014).

Quando os sistemas antioxidantes endógenos são insuficientes para combater as espécies reativas produzidas pelo organismo, este sofre estresse oxidativo. Esse processo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante (Ferreira e Matsubara, 1997).

Algumas características são necessárias para uma substância ser considerada um bom antioxidante, por exemplo, ter a presença de substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio, potencial de redução, capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura, capacidade de quelar metais de transição implicados no processo oxidativo, e acesso ao local de ação, dependente de sua hidrofília ou lipofília e de seu coeficiente de partição (Sucupira *et al.*, 2012). Devido a essa diversidade de características, atualmente existem diversos métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias biologicamente ativas. Devido aos diferentes tipos de espécies reativas e as suas diferentes formas de atuação nos organismos vivos, dificilmente existirá um método simples e universal pelo qual a atividade antioxidante possa ser medida precisa e quantitativamente (Sucupira *et al.*, 2012; Cotinguiba *et al.*, 2013).

Um método amplamente utilizado é o ensaio do DPPH (2,2'-difeníl-1-picril-hidrazila), que é considerado um método rápido, prático e com boa estabilidade. Este teste avalia a capacidade antioxidante de um composto em sequestrar radicais livres (Sucupira *et al.*, 2012). A molécula de DPPH é um radical livre sintético estável que possui coloração violeta, caracterizada por uma banda de absorção em cerca de 520 nm. Este ensaio mede a capacidade antioxidante de uma determinada substância em sequestrar o radical DPPH reduzindo-o a hidrazina. Quando uma determinada substância que age como doador de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução de DPPH, a hidrazina é obtida com mudança simultânea na coloração de violeta a amarelo pálido (Molyneux, 2004).

Outra metodologia bastante aplicada para avaliar a capacidade de substância em sequestrar radicais, é o teste do radical ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico). O ABTS^{•+} apresenta excelente estabilidade, sendo um dos testes mais rápidos de atividade antioxidante e que oferece resultados reprodutíveis, permitindo análises de compostos tanto de natureza lipofílica como hidrofílica. O método do radical ABTS está baseado na habilidade dos antioxidantes em capturar o cátion ABTS^{•+}, um cromóforo azul-verde com o máximo de absorção a 734 nm. Esta captura provoca um decréscimo na absorbância (Shahidi e Zhong, 2015).

Como dito anteriormente, existem vários parâmetros a serem analisados para se considerar um composto como um bom antioxidante, dentre eles a capacidade dessas substâncias em reduzir e/ou quelar metais também deve ser avaliada. O ensaio FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) é um método típico que mede a redução do íon férrico (Fe³⁺) a um complexo ferroso intensamente colorido de cor azul (Fe²⁺) através da ação de substâncias antioxidantes em meio ácido. A atividade antioxidante é determinada com o aumento de absorbância a 593 nm (Antolovich *et al.*, 2002). Já a atividade quelante de metais é determinada pela capacidade de substâncias antioxidantes em se complexar com íons ferrosos. As fontes mais comumente usadas de íon ferroso são o sulfato ferroso e a ferrozina. Este método baseia-se na formação de um complexo de metal-antioxidante, e essa

capacidade de quelar metais pode ser detectada com a perda de absorbância a 485 nm (para sulfato ferroso) ou 562 nm (para ferrozina) após a adição de antioxidantes (Shahidi e Zhong, 2015).

Outra metodologia que tem sido muito utilizada atualmente é o método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*). Este método se baseia na propriedade fluorescente das proteínas B-ficoeritrina e R-ficoeritrina. Estas proteínas são usadas como indicador fluorescente e foram primeiramente isoladas de uma espécie de alga vermelha. Neste ensaio o radical peroxila, que é um oxidante comumente encontrado em substratos biológicos, é gerado através da reação do AAPH (2,2' Azobis (2-amininopropane) dihydrochloride) com oxigênio atmosférico. Este radical formado reage com o indicador fluorescente para formar um produto não fluorescente, que pode ser medido por espectrofotometria com máxima emissão de fluorescência em 575 nm e 578 nm (Karadag *et al.*, 2009; Shahidi e Zhong, 2015).

Atualmente as substâncias antioxidantes têm sido muito estudadas, pois são comumente encontradas em diversos tipos de vegetais, muitos deles utilizados na alimentação. São substâncias que têm sido associadas a vários benefícios à saúde humana, como agentes preventivos de diversas doenças. As principais substâncias antioxidantes são as vitaminas, como a vitamina C (ácido ascórbico) e E (tocoferol), os carotenoides (carotenos e xantofilas) e os polifenóis, como os flavonoides, taninos, lignanas, estilbenos e fenilpropanoides (Oroian e Escriche, 2015).

Como visto, dentre as substâncias fenólicas existem várias classes de compostos com ação antioxidante. Os flavonoides, por exemplo, têm ganhado cada vez mais destaque como antioxidantes naturais, por apresentarem diferentes mecanismos de ação antioxidante, como agentes antiradicalares, quelantes de metais e inibidores da peroxidação lipídica (Harborne e Williams, 2000).

1.1.2. Atividade antimicrobiana

Desde a descoberta da penicilina em 1928, os produtos naturais têm sido alvo de inúmeras pesquisas para avaliar sua aplicação frente a diversos microrganismos patogênicos (Petersen e Amstutz, 2008). Contudo, a popularidade dos antibióticos levou rapidamente ao uso excessivo desses medicamentos pelas populações e, com isso, os antibióticos estão perdendo a sua eficácia conforme os microrganismos patogênicos se adaptam, tornando esses patógenos cada vez mais resistentes aos antibióticos disponíveis atualmente no mercado (Saleem *et al.*, 2010).

Existem diferentes mecanismos descritos envolvidos na resistência dos microrganismos aos antibióticos. Um dos mais importantes é a destruição do antibiótico, onde enzimas bacterianas catalisam a degradação do antibiótico ou modificam grupos funcionais farmacologicamente importantes presentes em sua estrutura, criando funções inativas para o reconhecimento molecular. Outro mecanismo é o efluxo contínuo do antibiótico, onde genes mutantes superexpressam proteínas transportadoras de membrana responsáveis pela entrada e saída de substâncias no meio

citoplasmático, fazendo com que a retirada do antibiótico para o meio extracelular seja mais rápida que a sua difusão pela membrana bacteriana, mantendo uma concentração insuficiente para atuar como bloqueador de funções celulares. Há, ainda, a reprogramação e modificação da estrutura-alvo, onde os alvos macromoleculares do antibiótico, como ribossomos, proteínas e constituintes da parede celular, são estruturalmente modificados a partir de genes que os expressam, afetando o reconhecimento do fármaco pelo alvo e diminuindo sua potência (Silveira *et al.*, 2006).

Essa resistência dos microrganismos aos antibióticos tem elevado o interesse na pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Nesse sentido, os produtos naturais são considerados uma fonte fundamental de nova diversidade química e são componentes importantes para a indústria farmacêutica atual (Saleem *et al.*, 2010). Nos últimos 34 anos, cerca de 140 novos fármacos com ação antibacteriana foram aprovados para uso medicinal, sendo 82 deles provenientes de produtos naturais (Newman e Cragg, 2016).

Dentre os produtos naturais, as substâncias fenólicas possuem uma diversidade de substâncias já descritas como potenciais antimicrobianos. Daglia (2012) fez um compilado de estudos reportados na literatura que investigaram a ação antimicrobiana de alguns compostos fenólicos. A autora destaca algumas classes de fenólicos que possuem substâncias com potencial antimicrobiano, dentre elas, os flavonoides como as flavanas-3-óis e os flavonóis; os taninos hidrolisáveis e condensados, além de ácidos fenólicos e neolignanais. Já na revisão feita por Cushnie e Lamb (2005), outras classes de flavonoides são reportadas com ação antimicrobiana, como as flavonas e os isoflavonoides. Para outros grupos de fenólicos, como os estilbenos (Gyawali e Ibrahim, 2014) e as cumarinas (Cowan, 1999; Saleem *et al.*, 2010) também existem relatos na literatura de ação antimicrobiana.

No processo de triagem de novos agentes antimicrobianos, vários ensaios biológicos *in vitro* são aplicados, utilizando diferentes metodologias. Dentre elas, podemos citar o método do disco de difusão em ágar, e os métodos de diluição em ágar ou em caldo, que são metodologias amplamente utilizadas (Balouiri *et al.*, 2016).

Um dos métodos mais apropriados para a determinação de valores de MIC (concentração mínima inibitória) são os métodos de diluição, uma vez que oferecem a possibilidade de estimar a concentração do agente antimicrobiano testado no ágar (diluição em ágar) ou meio de caldo (macro diluição ou micro diluição). Qualquer método de diluição pode ser usado para medir quantitativamente a atividade antimicrobiana *in vitro* contra bactérias e fungos (Balouiri *et al.*, 2016). Os métodos *in vitro* possibilitam a triagem de substâncias com potencial antimicrobiano de uma maneira mais rápida e eficiente, fornecendo indicativos para posteriores estudos *in vivo*.

Atualmente, a maioria dos antibióticos age inibindo a síntese de proteínas ou inibindo a síntese da parede celular bacteriana. Contudo, há alguns que atuam inibindo diretamente a síntese de DNA ou de metabólitos envolvidos na sua síntese (Singh e Barrett, 2006).

Os antibióticos de origem natural e seus derivados semissintéticos compreendem a maioria dos antibióticos em uso clínico, são classificados em diferentes grupos, em β -lactâmicos, tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos, estreptograminas, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas etc). Já os antibióticos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (Guimarães *et al.*, 2010).

Os diferentes grupos de antibióticos possuem mecanismos de ação distintos. Por exemplo, os do tipo β -lactâmicos, são os mais empregados pela indústria farmacêutica, pois possuem amplo espectro de atividade antimicrobiana. Alguns dos antibióticos desse grupo, como as penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, monobactamas, possuem a capacidade de inibir a ação da enzima transpeptidase, impedindo a formação correta da parede celular bacteriana; já as oxapeninas e sulfoxapeninas agem sob a enzima β -lactamase, uma enzima de resistência bacteriana, que degrada antibióticos β -lactâmicos. Os antibióticos do grupo dos peptídeos cíclicos, por exemplo, agem sobre a membrana plasmática da bactéria, afetando a sua permeabilidade e a síntese de alguns componentes externos que compõem a membrana das bactérias gram-positivas. Já os macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas, cloranfenicol, oxazolidinonas, aminoglicosídeos e tetraciclina, inibem a síntese proteica bacteriana (Guimarães *et al.*, 2010).

Portanto, pesquisas para descobrir novos agentes antimicrobianos se fazem necessárias, pois a crescente resistência bacteriana frente aos antibióticos tem gerado estimativas pessimistas para o futuro. Segundo um relatório publicado recentemente por O'Neill (2016), o aumento gradual de mortes causadas por infecções bacterianas resistentes, chegará a previsão de 10 milhões de pessoas mortas por ano em 2050. E os custos que a resistência a antibióticos representa chegarão a US\$ 100 trilhões na metade do século. O'Neill (2016), recomenda uma campanha de conscientização global, além de uma série de estratégias para driblar essas estatísticas, dentre elas, estabelecer um fundo de inovação global para pesquisa em estágio inicial e pagamentos para as empresas por cada antibiótico descoberto.

1.1.3. Atividade anti-HIV

A síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), conhecida popularmente pela sua sigla em inglês, AIDS, é uma doença causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) que compromete o funcionamento do sistema imunológico, deixando-o vulnerável ao ataque de microrganismos como bactérias e outros vírus, parasitas e também à proliferação de células cancerígenas. Com o progressivo comprometimento do sistema imunológico, o corpo humano

torna-se cada vez mais susceptível a doenças oportunistas (Souza e Almeida, 2003; Cunico *et al.*, 2008).

Os vírus no geral podem ser divididos em classes distintas de acordo com o seu material genético, os que consistem de DNA e aqueles cujo material genético consiste de RNA, como é o caso do HIV. Os vírus de RNA são chamados retrovírus e o seu processo de reprodução é um pouco mais complexo que o dos vírus compostos de DNA. Fora da célula, o HIV é conhecido como vírion e é circundado por um envelope protetor, a cápside, que também envolve uma determinada quantidade de proteínas virais e material genético, contendo toda a informação necessária para a criação de novos vírus (Cunico *et al.*, 2008).

O ciclo de reprodução do HIV (Figura 3.1) se inicia quando o vírus se liga a um receptor celular, geralmente o T CD4+, por meio de sua proteína específica chamada gp 120; o vírus então se funde à membrana celular e o conteúdo da cápside é liberado no citoplasma celular. No citoplasma, a enzima viral transcriptase reversa, catalisa a produção de uma cópia de DNA a partir do RNA do vírus HIV. A cópia de DNA viral é então transportada ao núcleo celular onde uma segunda enzima viral chamada integrase, catalisa a incorporação do DNA viral ao material genético do hospedeiro. A expressão subsequente dos genes virais resulta na transcrição do RNA a partir do DNA do HIV e na tradução das proteínas virais. As proteínas virais recém-formadas são produzidas na forma de precursores de poliproteínas, que são longas unidades compostas de enzimas virais e proteínas estruturais. As poliproteínas e o RNA viral migram para a superfície da célula onde ficam incorporados aos novos vírus formando a camada externa viral. Porém, os vírus recém-formados não são infectantes sem a ação de uma terceira classe de enzimas virais, as proteases, que processam as poliproteínas virais em proteínas e enzimas estruturais funcionais (Peçanha *et al.*, 2002; Souza e Almeida, 2003).

Figura 3.1 – Esquema do ciclo de replicação do vírus HIV. Fonte: Cunico *et al.*, 2008.

Existem diferentes estratégias terapêuticas para o tratamento da infecção por HIV, todas elas relacionadas com as etapas do ciclo de replicação viral. Para tanto, os agentes antivirais são testados frente à inibição de algumas enzimas chaves do processo, como as enzimas transcriptase reversa, protease e integrase, além de inibidores da fusão viral (Peçanha *et al.*, 2002).

Alguns produtos naturais têm se mostrado promissores como agentes terapêuticos para o tratamento do HIV. Asres *et al.* (2005) dão destaque aos flavonoides, cumarinas, terpenoides, alcaloides como classes de substâncias naturais promissoras para o tratamento antiviral.

As abordagens *in vitro* comumente utilizadas para a triagem de novas substâncias com potencial anti-HIV utilizam métodos que avaliam a atividade dos agentes antivirais na inibição das atividades das enzimas envolvidas nas etapas de replicação viral.

Para o presente estudo foi utilizado o ensaio colorimétrico, no qual é avaliada a atividade da enzima transcriptase reversa (TR) em sintetizar DNA. Esse ensaio permite a detecção e quantificação de DNA sintetizado que é utilizado como parâmetro para avaliar a atividade da enzima transcriptase reversa (Roche, 2010).

Conforme visto no **Capítulo 1**, o Brasil é o país das Américas com a maior diversidade de espécies de bambus, carecendo de estudos químicos das espécies nativas. Partindo do pressuposto que algumas das espécies de bambus asiáticas são utilizadas pela medicina tradicional e são atribuídas diversas atividades biológicas a essas espécies, os bambus nativos podem apresentar potencial biológico frente a diferentes doenças. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial biológico dos extratos brutos de folhas e colmos de *Merostachys pluriflora*, além das fases obtidas da partição desses extratos e eventuais substâncias isoladas, frente ao seu potencial antioxidante, antibacteriano e anti-HIV1.

2. Materiais e Métodos

2.1. Ensaios de atividade antioxidante *in vitro*

Os extratos brutos etanólicos liofilizados de folhas e colmos de *M. pluriflora* e as fases obtidas da partição desses extratos (ver Cap. 2, item 2.1.1), foram submetidas à análise de sua atividade antioxidante em diferentes concentrações, partindo de soluções com as concentrações iniciais de 0,25 mg/mL a 1,0 mg/mL. Para todos os ensaios antioxidantes, as amostras foram diluídas em DMSO 10% até atingir as concentrações desejadas.

2.1.1. Ensaio do sequestro do radical DPPH

O ensaio de atividade de sequestro do radical DPPH (2,2'-difenil-1-picril-hidrazila) seguiu o protocolo descrito por Furlan *et al.* (2015). Para este ensaio foi utilizada uma solução metanólica de DPPH 0,20 mM. Em microplacas de 96 poços foi colocada uma alíquota de 20 µL de cada amostra

em diferentes concentrações (ou dos controles DMSO 10% e Metanol) com o acréscimo de 200 µL da solução de DPPH. Após 20 minutos de reação a leitura das absorbâncias foi realizada a 515 nm. Todas as amostras e controles (positivo e negativo) foram analisados em triplicatas para obtenção das médias das absorbâncias de cada amostra.

Para calcular a porcentagem de atividade de sequestro (%AS) do radical DPPH foi utilizada a fórmula:

$$\% \text{ AS} = 100 - [(\text{Absorbância da amostra}/\text{Absorbância do controle negativo})] \times 100.$$

Os resultados foram expressos como mg equivalentes a quercetina e trolox por grama de extrato utilizando as equações baseadas nas curvas de calibração das soluções metanólicas de quercetina (15 a 240 µg/mL) e trolox (12 a 200 µg/mL). Os resultados também foram apresentados em concentração mínima efetiva para atingir 50% de sequestro do radical (EC₅₀). Os controles negativos foram feitos utilizando DMSO 10% e metanol.

2.1.2. Ensaio do sequestro do radical ABTS

O ensaio de atividade de sequestro do radical ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico) seguiu o protocolo estabelecido por Santos *et al.*, (2016). A análise foi feita em microplacas de 96 poços onde foram colocados 20 µL de cada amostra em diferentes concentrações e dos controles com o acréscimo de 280 µL da solução do radical ABTS (o radical ABTS foi obtido da combinação da solução de ABTS 7 mM com a solução de persulfato de potássio 2,6 mM, na proporção de 1:1). As placas foram mantidas no escuro por 2 horas para a posterior leitura das absorbâncias em 734 nm.

Para o cálculo da porcentagem de atividade de sequestro (%AS) do radical ABTS foi utilizada a fórmula:

$$\% \text{ AS} = 100 - [(\text{Absorbância da amostra}/ \text{Absorbância do controle negativo})] \times 100.$$

Os resultados foram expressos como mg equivalentes a quercetina e trolox por grama de extrato utilizando as equações baseadas nas curvas de calibração das soluções metanólicas de quercetina (3 a 60 µg/mL) e trolox (12 a 200 µg/mL). Os resultados também foram expressos por sua concentração mínima efetiva para atingir 50% de atividade de sequestro do radical ABTS (EC₅₀). Os controles negativos foram feitos utilizando DMSO 10% e metanol.

2.1.3. Ensaio da atividade redutora de ferro III a ferro II (FRAP)

A atividade redutora de ferro (III) a ferro (II) das amostras foi avaliada segundo o método descrito por Furlan *et al.* (2015). Em microplacas de 96 poços foram adicionados 25 µL de água ultrapura, junto com 10 µL de cada amostra em diferentes concentrações (ou os controles), com a adição de 265 µL do reagente FRAP (o reagente FRAP foi obtido a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M pH 3,6 com 2,5 mL da solução de TPTZ (2,4,6-tris(2- piridil)-s-triazina)

10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM). As placas foram incubadas por 30 min a 37°C e, em seguida, a leitura da absorbância foi realizada a 595 nm.

Para calcular a porcentagem da atividade redutora de ferro (% RF) foi utilizada a fórmula:

% RF= [(Absorbância da amostra x 100)/ média da absorbância do último ponto da curva padrão].

Os resultados foram expressos como mg equivalentes a quercetina e trolox por grama de extrato utilizando as equações baseadas nas curvas de calibração das soluções metanólicas de quercetina (6 a 60 µg/mL) e trolox (12 a 200 µg/mL), os resultados também foram expressos por sua concentração mínima efetiva para atingir 50% de atividade redutora de ferro (EC₅₀). Os controles negativos foram feitos utilizando DMSO 10% e metanol.

2.1.4. Ensaio da atividade quelante de metais

O teste para avaliar a atividade dos extratos como quelante de metais foi realizado segundo o método descrito por Santos *et al.* (2016). Em microplacas de 96 poços foram adicionados 130 µL de acetato de amônio 10%, 10 µL de sulfato de amônio ferroso 1 mM e 10 µL de cada amostra em diferentes concentrações, após 5 minutos foram acrescentados 10 µL da solução de ferrozine 6,1 mM. As placas foram incubadas durante 10 minutos com agitação de 100 rpm para melhor homogeneização, posteriormente foi realizada a leitura das absorbâncias a 562 nm.

Para calcular a porcentagem de atividade quelante de metais (% QM) foi utilizada a fórmula:

% QM= 100- [(Absorbância da amostra/ Absorbância do controle negativo)] x 100.

Os resultados foram expressos como mg equivalentes a ácido gálico por grama de extrato utilizando a equação baseada na curva de calibração da solução metanólica de tal padrão (10 a 300 µg/mL). Os resultados também foram expressos por sua concentração mínima efetiva para atingir 50% de atividade quelante de metais (EC₅₀). Os controles negativos foram feitos utilizando DMSO 10% e metanol.

2.1.5. Ensaio antioxidante ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

A capacidade antioxidante dos extratos também foi avaliada pelo método ORAC seguindo-se o protocolo descrito por Santos *et al.* (2016). Para tanto foram preparadas as soluções de Tampão fosfato (75 mM pH 7).

Foram também preparadas duas soluções estoques de fluoresceína, uma com a concentração de 268,6 µM. Depois de homogeneizada, essa solução foi transferida para um vidro âmbar. A outra solução estoque de fluoresceína preparada foi na concentração de 4 µM, essa solução foi homogeneizada e transferida para um vidro âmbar, onde foi armazenada a 4 °C em ambiente escuro. A solução de fluoresceína de uso foi preparada somente no dia da análise utilizando 50 µL

da solução estoque de fluoresceína a 4 µM em 25 mL de tampão fosfato, após homogeneizada, essa solução foi transferida para um vidro âmbar.

O radical AAPH (2,2' Azobis (2-amininopropane) dihydrochloride) 75 mM foi preparado no momento da análise, em tampão fosfato, depois de homogeneizada, essa solução foi transferida para vidro âmbar até o momento de uso.

Em microplacas de 96 poços foram colocados 25 µL de cada amostra em diferentes concentrações (ou do padrão e controles negativos), com o acréscimo de 150 µL de solução de fluoresceína (67,95 nM de concentração final). As placas foram incubadas a 37 °C por 30 min, em seguida, foram adicionados 25 µL da solução de AAPH e a fluorescência foi medida em intervalos de 1 min durante o período de 120 min. A resposta fluorescente foi determinada a 485 nm de comprimento de onda de excitação e 520 nm de emissão.

Para calcular a porcentagem da atividade antioxidante de sequestro do radical peroxila (%RP) foi utilizada a fórmula:

$$\% \text{ RP} = [(\text{Net AUC da amostra} \times 100) / \text{Net AUC do último ponto da curva padrão}].$$

Onde a AUC corresponde à área sob a curva das amostras e a Net AUC corresponde à subtração da área sob a curva das amostras pela área sob a curva do branco.

Os valores ORAC foram calculados usando a equação da curva construída com Trolox (6,25 a 50 µM). Os valores ORAC foram expressos em µM equivalentes de trolox por grama de extrato. Os resultados também foram expressos por sua concentração mínima efetiva para atingir 50% de atividade de sequestro do radical peroxila (EC₅₀). Os controles negativos foram feitos utilizando DMSO 10% e tampão fosfato.

2.2. Ensaio de inibição da enzima transcriptase reversa (Anti-HIV1)

A avaliação da atividade de inibição da enzima transcriptase reversa (anti-HIV1) foi realizada por meio de método colorimétrico que tem a vantagem de não necessitar do uso de radioisótopos, como as técnicas tradicionais com [³H]-dTTP. A atividade foi medida com o uso do Kit ELISA RT (Roche), conforme instruções do fabricante.

Em microtubos de 200 µL foram colocados 20 µL de cada amostra retomadas em DMSO 10% em água DEPEC em diferentes concentrações (ou do padrão e controles negativos), com 19 µL de tampão de lise, 20 µL da solução de oligo (dT) + poli-A e 1 µL da enzima RT. Em seguida, os microtubos foram incubados a 37 °C durante o período de 1 hora. Posteriormente, todo o conteúdo dos microtubos foi transferido para placas provenientes do Kit e cobertas com fita adesiva. Em seguida, as placas foram incubadas por mais 1 hora a 37 °C. Após esse período, as soluções foram removidas completamente e cada poço foi lavado com 250 µL de tampão de lavagem por 5x consecutivas, depois esse tampão foi removido cuidadosamente e em seguida foram adicionados

200 µL do Mix 1 (anticorpo + tampão conjugado) em cada poço. A placa foi coberta com fita adesiva e novamente incubada por mais 1 hora a 37 °C. Depois desse tempo de incubação, a solução foi removida completamente de cada poço da placa e foram lavados por mais 5x com tampão de lavagem. O tampão foi totalmente removido e em cada poço foram adicionados 200 µL da solução de ABTS.

Em seguida as absorbâncias das amostras foram lidas a 405 nm e 490 nm em espectrofotômetro para microplacas. Foram realizadas duas leituras, a primeira imediatamente após o acréscimo da solução de ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina) 6-ácido sulfônico) e a segunda após 5 minutos da primeira leitura.

Para este ensaio foram feitos um branco utilizando DMSO 10% sem a enzima RT e um controle negativo de DMSO 10% contendo a enzima RT; como controle positivo foi realizado uma curva padrão utilizando Foscarnet em diferentes concentrações (0,075 µg/mL a 3 µg/mL).

A absorbância final da amostra foi dada pela diferença entre as absorbâncias em 405 nm e 490 nm. A atividade anti-HIV1 foi dada como percentual de inibição da enzima TR (% ITR) utilizando a formula:

$$\% \text{ ITR} = 100 - [(\text{Absorbância da amostra}) / \text{Absorbância do controle negativo}) \times 100].$$

Os resultados foram expressos por sua concentração mínima inibitória da atividade da enzima transcriptase reversa em 50% (MIC₅₀).

2.3. Ensaio antimicrobiano

A avaliação do potencial antimicrobiano foi realizada pelo método de micro diluição em caldo, segundo o protocolo descrito por Sedano-Partida *et al.* (em preparação). Para tanto, foram utilizadas cepas de duas bactérias gram-negativas, *Pseudomonas pally*, *Escherichia coli* (MG1655) e uma gram-positiva a *Bacillus subtilis* (PY79). As mesmas estavam armazenadas em glicerol no freezer a -80°C. Para o posterior crescimento de colônias, foram preparadas placas de Petri com meio de cultura sólido LB (Luria Bertani), autoclavado por 15 minutos a 121°C.

Para cada cepa, foram utilizadas 2 placas de Petri para o espalhamento das bactérias. Para que houvesse a formação de colônias, as placas foram mantidas em estufa a 35 °C por 24 horas. Foram utilizadas 2 placas de Petri sem bactéria como controle negativo de crescimento. Posteriormente, uma colônia de cada bactéria foi selecionada e colocada em tubo plástico contendo meio LB líquido autoclavado, ficando em agitação por 16 horas a 35°C para *E. coli* e *P. pally* e 18 horas para *B. subtilis* em mesma temperatura.

Após a incubação, foi retirada uma alíquota de cada pré-inoculo, diluída em meio LB líquido para atingir a concentração de células de 1×10^6 células/mL na escala Macfarland, utilizando-se o leitor de microplacas no comprimento de onda de 595 nm.

O ensaio em microplacas de 96 poços foi realizado segundo o protocolo descrito por Sedano-Partida *et al.* (em preparação). Brevemente, os extratos e fases foram retomados em DMSO 4% em diferentes concentrações e incubados em meio LB com a diluição das três cepas bacterianas testadas. Foram feitos três controles negativos, um utilizando apenas meio LB líquido sem bactéria, outro com meio LB com bactéria e outro utilizando meio LB com bactéria e DMSO 4%; como controle positivo foi realizada uma curva utilizando gentamicina em diferentes concentrações. Todas as amostras e controles foram feitos em triplicata. Posteriormente, as placas com *E. coli* e *P. pally* foram incubadas a 35°C com agitação de 120 rpm durante o período de 18 horas e as placas com *B. subtilis* foram incubadas por 20 horas nas mesmas condições de temperatura e agitação. Após esse período de incubação, parte da solução de cada poço foi transferida para microplacas de 96 poços com meio LB sólido, e o conteúdo restante nas placas foi analisado a 595 nm em espectrofotômetro para microplacas. Após a leitura, foi acrescentada resazurina 0,01% em cada poço para a observação da viabilidade das bactérias. As microplacas contendo meio sólido foram incubadas para observar a existência de bactérias viáveis após a incubação com as amostras.

Para avaliação de atividade antimicrobiana das amostras foi calculado o percentual de inibição do crescimento bacteriano (% IB), utilizando a fórmula:

$$\% \text{ IB} = 100 - [(\text{Absorbância da amostra}) / \text{Absorbância do controle negativo}] \times 100.$$

Os resultados foram expressos em concentração mínima para atingir 50% de inibição do crescimento bacteriano (MIC₅₀).

3. Resultados e Discussão

3.1. Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos e fases liofilizados das folhas e colmos de *M. pluriflora* está apresentada na Tabela 3.1 em concentração mínima efetiva para atingir 50% de atividade antioxidante (EC₅₀). Para este parâmetro, quanto menor o valor de EC₅₀ maior o potencial antioxidante da amostra testada (ver curvas em Anexo 1).

No ensaio do radical DPPH os valores de EC₅₀ das amostras variaram de 117,68 µg/mL a 413,80 µg/mL, sendo os menores valores encontrados para a FAE-F (117,68 µg/mL) e para o EE-F (119,51 µg/mL), seguidos pela FHM-F (137,37 µg/mL), EE-C (181,92 µg/mL), FD-F (190,73 µg/mL), FAE-C (244,85 µg/mL), FH-C (296,94 µg/mL) e FHM-C (413,80 µg/mL). Para este ensaio, a EC₅₀ dos padrões trolox e quercetina foram 4,16 µg/mL e 8,14 µg/mL, respectivamente.

O ensaio do radical ABTS, método que também avalia atividade antiradicalar, se mostrou mais sensível do que o DPPH. Os valores de EC₅₀ das amostras foram menores do que os encontrados para o DPPH e variaram de 16,30 µg/mL a 94,77 µg/mL, destacando-se a FHM-F

(16,30 $\mu\text{g/mL}$) como mais ativa, seguida pela FAE-F (19,66 $\mu\text{g/mL}$), EE-F (25,65 $\mu\text{g/mL}$), FAE-C (33,25 $\mu\text{g/mL}$), FD-F (37,21 $\mu\text{g/mL}$), EE-C (39,51 $\mu\text{g/mL}$), FHM-C (47,22 $\mu\text{g/mL}$), FD-C (60,69 $\mu\text{g/mL}$), e FH-C (94,77 $\mu\text{g/mL}$) com o maior valor. Os valores de EC_{50} dos padrões de trolox e quercetina foram de 7,34 $\mu\text{g/mL}$ e 3,54 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Para este teste, a quercetina mostrou-se mais ativa do que o trolox, indicando que amostras contendo flavonoides podem apresentar maior potencial para o sequestro do radical ABTS.

Comparando-se as duas metodologias antioxidantes que tem como principio a atividade antiradicalar, FAE-F e FHM-F foram as fases que apresentaram baixos valores de EC_{50} em ambas as metodologias, juntamente com o EE-F, sendo, assim, as amostras com o maior potencial antiradicalar.

Já no ensaio FRAP, os valores de EC_{50} das amostras variaram de 27,92 $\mu\text{g/mL}$ a 145,78 $\mu\text{g/mL}$. O menor valor encontrado foi para a FD-C (27,92 $\mu\text{g/mL}$), seguida pela FAE-C (51,22 $\mu\text{g/mL}$), FAE-F (51,88 $\mu\text{g/mL}$), EE-C (62,02 $\mu\text{g/mL}$), FHM-F (85,73 $\mu\text{g/mL}$), FD-F (89,69 $\mu\text{g/mL}$), EE-F (92,08 $\mu\text{g/mL}$), FHM-C (108,53 $\mu\text{g/mL}$) e FH-C (145,78 $\mu\text{g/mL}$) com a maior concentração. O padrão trolox apresentou EC_{50} de 4,70 $\mu\text{g/mL}$ e a quercetina 0,94 $\mu\text{g/mL}$ para este teste.

No ensaio que avalia a capacidade quelante de metais, apenas as amostras mais polares apresentaram resultados positivos para este ensaio. Os valores de EC_{50} encontrados variaram de 20,46 $\mu\text{g/mL}$ a 66,21 $\mu\text{g/mL}$, sendo o menor valor encontrado na FHM-F (20,46 $\mu\text{g/mL}$), seguida pela FAE-F (25,29 $\mu\text{g/mL}$), EE-C (55,39 $\mu\text{g/mL}$), EE-F (66,21 $\mu\text{g/mL}$), FAE-C (86,58 $\mu\text{g/mL}$), FHM-C (96,03 $\mu\text{g/mL}$). Para este ensaio o valor de EC_{50} do padrão de ácido gálico foi de 11,45 $\mu\text{g/mL}$.

O ensaio ORAC se mostrou o método mais sensível, com valores de EC_{50} bem inferiores aos dos outros ensaios utilizados neste estudo. Os valores de EC_{50} das amostras variaram de 1,22 $\mu\text{g/mL}$ a 23,02 $\mu\text{g/mL}$, sendo a FD-C a amostra com a maior capacidade antioxidante (1,22 $\mu\text{g/mL}$), seguida pela FAE-F (2,73 $\mu\text{g/mL}$), FAE-C (3,47 $\mu\text{g/mL}$), EE-C (4,20 $\mu\text{g/mL}$), EE-F (5,79 $\mu\text{g/mL}$), FD-F (6,05 $\mu\text{g/mL}$), FHM-F (6,18 $\mu\text{g/mL}$), FH-C (9,10 $\mu\text{g/mL}$), FHM-C (9,33 $\mu\text{g/mL}$) e a fase com o maior valor de EC_{50} foi a FH-F (23,02 $\mu\text{g/mL}$). Para este ensaio o valor de EC_{50} do padrão trolox foi de 0,46 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 3.1 – EC₅₀ (µg/mL) das amostras de folhas e colmos de *M. pluriflora* para os testes antioxidantes aplicados. (EE) extrato bruto etanólico de folhas (F) e colmos (C); (FH) fase de hexano de folhas (F) e colmos (C); (FD) fase de diclorometano de folhas (F) e colmos (C); (FAE) fase de acetato de etila de folhas (F) e colmos (C); (FHM) fase hidrometanólica de folhas (F) e colmos (C).

Amostras	Ensaio antioxidantes (EC ₅₀ µg/mL)				
	DPPH	ABTS	FRAP	QUELANTE	ORAC
EE-F	119,51	25,65	92,08	66,21	5,79
FH-F	-	-	-	-	23,02
FD-F	190,73	37,21	89,69	-	6,05
FAE-F	117,68	19,66	51,88	25,29	2,73
FHM-F	137,37	16,30	85,73	20,46	6,18
EE-C	181,92	39,51	62,02	55,39	4,20
FH-C	296,94	94,77	145,78	-	9,10
FD-C	-	60,69	27,92	-	1,22
FAE-C	244,85	33,25	51,22	86,58	3,47
FHM-C	413,80	47,22	108,53	96,03	9,33
Trolox	4,16	7,34	4,70	*	0,46
Quercetina	8,14	3,54	0,94	*	*
Ácido gálico	*	*	*	11,45	*

- : amostras não sensíveis aos métodos de detecção utilizados. *não analisado

Os resultados dos testes antioxidantes também foram expressos em mg/g de massa seca de amostra equivalentes a trolox (Tabela 3.2) e quercetina (Tabela 3.3). Para este parâmetro, quanto maior a quantidade de substâncias equivalentes aos padrões, maior a capacidade antioxidante da amostra (ver curvas em Anexo 1).

No ensaio DPPH, os valores equivalentes a trolox variaram de 18,06 mg/g ET a 37,38 mg/g ET. O maior valor observado foi na FAE-F (37,38 mg/g ET), seguido do EE-F (31,31 mg/g ET), FHM-F (29,58 mg/g ET) e FD-F (18,06 mg/g ET). Neste teste, todas as amostras de colmos não apresentaram substâncias equivalentes à trolox. Já os valores equivalentes a quercetina variaram de 14,06 mg/g EQ a 98,53 mg/g EQ. O maior valor encontrado foi na FAE-F (98,53 mg/g EQ), seguido pelo EE-F (97,90 mg/g EQ), FHM-F (92,00 mg/g EQ), FD-F (83,65 mg/g EQ), FH-F (66,32 mg/g EQ), FAE-C (43,91 mg/g EQ), EE-C (36,75 mg/g EQ), FH-C (24,78 mg/g EQ), FHM-C (20,28 mg/g EQ) e FD-C com a menor quantidade (14,06 mg/g EQ). Resultados que corroboram os valores de EC₅₀ encontrados.

No teste de avaliação da captura do radical ABTS, os valores equivalentes a trolox variaram de 4,99 mg/g ET a 129,22 mg/g ET. O maior valor encontrado foi para a FHM-F (129,22 mg/g ET), seguida pela FAE-F (125,32 mg/g ET), EE-F (117,95 mg/g ET), FAE-C (99,18 mg/g ET), FD-F (98,26 mg/g ET), EE-C (92,34 mg/g ET), FHM-C (84,59 mg/g ET), FD-C (69,41 mg/g ET), FH-C (52,43 mg/g ET) e FH-F (4,99 mg/g ET) com o menor valor. Os valores equivalentes a

quercetina variaram de 35,83 mg/g EQ a 128,64 mg/g EQ. O maior valor encontrado para FHM-F (128,64 mg/g EQ), seguida da FAE-F (124,43 mg/g EQ), EE-F (116,48 mg/g EQ), FAE-C (96,22 mg/g EQ), FD-F (95,23 mg/g EQ), EE-C (88,84 mg/g EQ), FHM-C (80,48 mg/g EQ), FD-C (75,18 mg/g EQ) e FH-C (35,83 mg/g EQ).

No ensaio redutor de ferro (FRAP), os valores equivalente a trolox variaram entre 34,21 mg/g ET e 170,49 mg/g ET. Destacando-se a FD-C (170,49 mg/g ET) com o maior valor, seguida pela FH-F (117,53 mg/g ET), FAE-C (111,02 mg/g ET), FAE-F (102,41 mg/g ET), EE-C (92,93 mg/g ET), FHM-F (61,36 mg/g ET), FD-F (61,07 mg/g ET), EE-F (59,08 mg/g ET), FHM-C (48,29 mg/g ET) e FH-C (34,21 mg/g ET) com a menor quantidade. Já os valores equivalentes a quercetina variaram de 4,14 mg/g EQ a 30,88 mg/g EQ. O maior valor observado foi para a FD-C (30,88 mg/g EQ), seguida da FH-F (23,67 mg/g EQ), FAE-C (18,46 mg/g EQ), FAE-F (15,95 mg/g EQ), EE-C (12,92 mg/g EQ), EE-F (9,07 mg/g EQ), FD-F (8,54 mg/g EQ), FHM-F (8,43 mg/g EQ), FHM-C (6,41 mg/g EQ) e FH-C (4,14 mg/g EQ).

No ensaio quelante de metais os valores equivalentes ao ácido gálico variaram de 5,45 mg/g EAG a 63,55 mg/g EAG. O maior valor encontrado foi para a FH-C (63,55 mg/g EAG), seguida pelo EE-C (19,88 mg/g EAG), FHM-C (15,00 mg/g EAG), FAE-C (13,11 mg/g EAG), FHM-F (12,60 mg/g EAG), FAE-F (8,12 mg/g EAG) e EE-F (5,45 mg/g EAG).

No ensaio ORAC os valores equivalentes a trolox variaram de 1822,80 $\mu\text{mol/g ET}$ a 29068,69 $\mu\text{mol/g ET}$. O maior valor encontrado foi para a FD-C (29068,69 $\mu\text{mol/g ET}$), seguida da FAE-F (18697,69 $\mu\text{mol/g ET}$), FAE-C (13670,53 $\mu\text{mol/g ET}$), EE-C (11384,07 $\mu\text{mol/g ET}$), EE-F (8427,18 $\mu\text{mol/g ET}$), FD-F (8225,58 $\mu\text{mol/g ET}$), FHM-F (7984,90 $\mu\text{mol/g ET}$), FH-C (5315,95 $\mu\text{mol/g ET}$), FHM-C (5259,43 $\mu\text{mol/g ET}$) e FH-F (1822,80 $\mu\text{mol/g ET}$) com o menor valor.

No geral, para quase todos os ensaios realizados, exceto o do DPPH, as amostras de folhas e colmos de *M. pluriflora* apresentaram valores de EC_{50} abaixo de 100 $\mu\text{g/mL}$ o que, para muitos autores, é considerado promissor. Cos *et al.* (2006) salientam que valores de EC_{50} abaixo de 100 $\mu\text{g/mL}$ para um extrato ou amostra que apresente uma mistura de constituintes é considerado interessante e promissor para investigações futuras.

Todas as amostra provenientes de *M. pluriflora* apresentaram potencial antioxidante, porém o mecanismo de ação parece ser diferente para os constituintes de folhas quando comparados com os do colmo. Analisando os resultados obtidos para as amostras de folhas, podemos notar que a FAE-F se destaca no ensaio do DPPH e a FHM-F no ensaio do ABTS. Para ambos os testes essas amostras se mostraram como as mais ativas, com os menores valores de EC_{50} e com as maiores quantidades de substâncias equivalentes aos padrões. Com isso podemos inferir que as substâncias fenólicas presente nas folhas de *M. pluriflora* da população estudada possuem maior capacidade antiradicalar.

Tabela 3.2 – Atividade antioxidante dos extratos e fases de *M. pluriflora* expressas em miligramas de substâncias equivalentes à trolox e ácido gálico por grama de extrato seco (mg/g ET e mg/g AG). (EE) extrato bruto etanólico de folhas (F) e colmos (C); (FH) fase de hexano de folhas (F) e colmos (C); (FD) fase de diclorometano de folhas (F) e colmos (C); (FAE) fase de acetato de etila de folhas (F) e colmos (C); (FHM) fase hidrometanólica de folhas (F) e colmos (C). Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Amostras	Testes antioxidantes (mg/g)				
	DPPH ^a	ABTS ^a	FRAP ^a	QUELANTE ^b	ORAC ^c
EE-F	31,31 $\pm$ 2,15	117,95 $\pm$ 0,38	59,08 $\pm$ 2,24	5,45 $\pm$ 1,85	8427,18 $\pm$ 735,71
FH-F	*	4,99 $\pm$ 1,56	117,53 $\pm$ 2,40	*	1822,80 $\pm$ 336,30
FD-F	18,06 $\pm$ 1,06	98,26 $\pm$ 1,88	61,07 $\pm$ 3,68	*	8225,58 $\pm$ 606,27
FAE-F	37,38 $\pm$ 2,84	125,32 $\pm$ 0,80	102,41 $\pm$ 3,16	8,12 $\pm$ 0,63	18697,69 $\pm$ 2073,06
FHM-F	29,58 $\pm$ 1,38	129,22 $\pm$ 1,09	61,36 $\pm$ 2,37	12,60 $\pm$ 3,04	7984,90 $\pm$ 934,42
EE-C	*	92,34 $\pm$ 0,60	92,93 $\pm$ 2,70	19,88 $\pm$ 2,63	11384,07 $\pm$ 445,34
FH-C	*	52,43 $\pm$ 1,46	34,21 $\pm$ 1,01	63,55 $\pm$ 6,85	5315,95 $\pm$ 831,14
FD-C	*	69,41 $\pm$ 3,17	170,49 $\pm$ 2,99	*	29068,69 $\pm$ 1526,44
FAE-C	*	99,18 $\pm$ 1,00	111,02 $\pm$ 7,26	13,11 $\pm$ 1,89	13670,53 $\pm$ 656,53
FHM-C	*	84,59 $\pm$ 2,01	48,29 $\pm$ 1,08	15,00 $\pm$ 0,81	5259,43 $\pm$ 953,62

^a mg/g equivalente a trolox.

^b mg/g equivalente a ácido gálico.

^c μ mol/g equivalente a trolox.

*valores para cálculo menores de 0,0001

Tabela 3.3 – Atividade antioxidante dos extratos e fases de *M. pluriflora* expressas em miligramas de substâncias equivalentes à quercetina por grama de extrato seco (mg/g EQ). (EE) extrato bruto etanólico de folhas (F) e colmos (C); (FH) fase de hexano de folhas (F) e colmos (C); (FD) fase de diclorometano de folhas (F) e colmos (C); (FAE) fase de acetato de etila de folhas (F) e colmos (C); (FHM) fase hidrometanólica de folhas (F) e colmos (C). Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Amostras	Testes antioxidantes (mg/g EQ)		
	DPPH	ABTS	FRAP
EE-F	97,90 $\pm$ 1,84	116,48 $\pm$ 0,41	9,07 $\pm$ 0,64
FH-F	66,32 $\pm$ 2,27	*	23,67 $\pm$ 0,52
FD-F	83,65 $\pm$ 1,07	95,23 $\pm$ 2,03	8,54 $\pm$ 1,06
FAE-F	98,53 $\pm$ 2,70	124,43 $\pm$ 0,87	15,95 $\pm$ 1,69
FHM-F	92,00 $\pm$ 1,18	128,64 $\pm$ 1,18	8,43 $\pm$ 0,88
EE-C	36,75 $\pm$ 4,82	88,84 $\pm$ 0,65	12,92 $\pm$ 1,97
FH-C	24,78 $\pm$ 3,62	35,83 $\pm$ 0,77	4,14 $\pm$ 0,28
FD-C	14,06 $\pm$ 3,35	75,18 $\pm$ 5,06	30,88 $\pm$ 1,91
FAE-C	43,91 $\pm$ 3,97	96,22 $\pm$ 1,08	18,46 $\pm$ 1,03
FHM-C	20,28 $\pm$ 2,47	80,48 $\pm$ 2,17	6,41 $\pm$ 0,29

*valores para cálculo menores de 0,0001

As amostras de colmos foram mais ativas em três dos cinco ensaios antioxidantes aplicados. Destacando-se a FD-C, mais ativa no ensaio FRAP e ORAC, neste último, essa amostra se destacou das demais com o menor valor de EC₅₀; e o FH-C, mais ativo no ensaio quelante de metais.

Podemos então inferir que as substâncias fenólicas presentes nos colmos de *M. pluriflora* possuem grande capacidade redutora, quelante de metais e também antiradicalar, para um dos ensaios aplicados.

Vale lembrar que a FAE-F foi a fase que apresentou a maior quantidade de flavonoides pela quantificação via CLAE-DAD, além de ter sido a única fase que apresentou as flavonas C-glicosiladas, vitexina e isovitexina. A FD-C foi a fase que mais se destacou de todas as outras por apresentar o maior conteúdo de fenilpropanoides e derivados do ácido clorogênico, além de ter sido a fase que apresentou o constituinte cafeato de metila em maior quantidade (ver Cap. 2, item 3.3.3).

Correlacionando as atividades antioxidantes das amostras com as quantidades de substâncias fenólicas nelas presentes, podemos inferir que as flavonas C-glicosiladas como a vitexina e isovitexina, e presentes na FAE-F, possam ter influenciado positivamente a capacidade antiradicalar dessa amostra frente aos testes antioxidantes realizados. As flavonas citadas são conhecidas por sua capacidade antioxidante (Xiao *et al.*, 2015).

Alguns autores retratam que as atividades biológicas atribuídas aos flavonoides estão diretamente relacionadas às diferentes estruturas químicas que essas substâncias podem apresentar. Como exemplo, Van Acker *et al.* (1996) relacionaram os aspectos estruturais dos flavonoides com as atividades antioxidantes exercidas por eles. Foi sugerido que flavonoides exibindo um grupo catecol no anel B (duas hidroxilas vicinais no anel aromático), com uma ligação dupla em C2-C3 e uma hidroxila na posição 3, apresentam grande capacidade antioxidante. Kumar e Pandey (2013) destacam que a configuração estrutural, o padrão de substituição e o número de hidroxilas influenciam diretamente no mecanismo antioxidante do flavonoide. Por exemplo, os autores ressaltam que a configuração dos grupos hidroxilas no anel B do flavonoide é a característica mais importante na eliminação de espécies reativas, pois essas hidroxilas são capazes de doar hidrogênio e elétron para os radicais livres, estabilizando-os. Muito embora algumas das características estruturais citadas pelos autores, como possuir um grupo hidroxila em C3 seja particular de outro grupo de flavonoides, os flavonóis; as flavonas identificadas em *M. pluriflora*, vitexina e isovitexina, também apresentaram um grande potencial antioxidante, provavelmente conferida pelas características estruturais comuns a flavonas e flavonóis como uma dupla ligação entre C2-C3, assim como a configuração de suas hidroxilas.

Contudo, no ensaio ORAC, que também avalia a capacidade antiradicalar, a FD-C se mostrou a amostra mais ativa e o constituinte fenólico presente em maior abundância nessa fase, e que também é encontrado em folhas, mais especificamente na FAE-F, é o fenilpropanoide cafeato de metila.

Além de contribuir com a capacidade antiradicalar, os fenilpropanoides como o cafeato de metila, presente em maiores quantidades na FD-C e no FH-C, podem ter potencializado a

capacidade redutora e quelante de metais dessas amostras. Na revisão feita por Razzaghi-Asl *et al.* (2013), sobre o potencial antioxidante dos ácidos hidroxicinâmicos, os autores destacam que essas substâncias fenólicas possuem a capacidade de aumentar a resistência das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) frente a peroxidação lipídica, além de serem capazes de quelar metais de transição em reações de oxidação, serem varredores de radicais livres e potentes inibidores de enzimas envolvidas no estresse oxidativo. Os mesmos autores citam duas características estruturais que fazem desses compostos ótimos agentes antioxidantes, uma delas é ter mais de uma hidroxila funcional ligada ao anel benzênico e, a outra, de possuir em sua cadeia lateral uma ligação insaturada, a qual pode servir como um sítio de ligação entre essas substâncias e a espécie reativa de oxigênio. Isso pode explicar o fato das amostras com maiores quantidades de fenilpropanoides, como o ácido cafeíco, ácido ferúlico e o cafeato de metila terem apresentado alta capacidade antioxidante frente aos ensaios realizados.

Outro aspecto que sustenta essa correlação entre atividade antioxidante e substâncias fenólicas são os resultados dos ensaios obtidos para as fases de hexano, pois para quase todos os testes essas fases foram as que apresentaram menor capacidade antioxidante. Além disso, ao analisarmos as quantificações de substâncias fenólicas podemos notar que essas fases foram as que também apresentaram as menores quantidades dessas substâncias (ver Cap. 2, item 3.3.3).

Muito embora algumas dessas fases tenham apresentado resultado positivo para atividade antioxidante, seriam necessários mais estudos para poder afirmar com certeza se tais atividades são atribuídas a uma substância somente, ou ao sinergismo entre elas e, ainda, a presença de outras classes de substâncias que não somente as fenólicas. Na literatura é reportado que o sinergismo entre as substâncias presentes em uma mistura pode potencializar ou até mesmo diminuir uma determinada atividade biológica exercida por tal composto. O sinergismo entre diferentes substâncias fenólicas foi observado por Meyer *et al.* (1998) quando avaliaram a capacidade antioxidante de cinco substâncias fenólicas: quercetina, cianidina, catequina, ácido cafeíco e ácido elágico. Os autores fizeram vinte combinações diferentes entre essas substâncias e observaram que na maior parte delas, as substâncias quando misturadas potencializavam a atividade antioxidante, mas algumas combinações resultaram em um efeito antagonista.

No presente estudo, as amostras que mostraram maior potencial antioxidante foram as fases resultantes da partição, onde teoricamente os constituintes já sofreram uma separação, tornando essas amostras com uma menor mistura de constituintes em comparação com os extratos brutos. Podemos inferir que a separação entre os constituintes com polaridades diferentes já mostra um efeito positivo na capacidade antioxidante das fases polares.

Os resultados das atividades antioxidantes observados em *M. pluriflora* corroboram os resultados obtidos para outras espécies de bambus. Goyal *et al.* (2013) atribuíram o potencial

antioxidante das folhas de uma variedade de *Bambusa vulgaris* à presença de uma grande quantidade de flavonoides nos extratos de suas folhas. Tripathi *et al.* (2015) realizaram o teste DPPH com os extratos metanólicos obtidos de folhas de *Bambusa nutans* Wall. ex Munro e *Bambusa vulgaris* e verificaram valores de EC₅₀ de 123,45 µg/mL e 262,90 µg/mL, respectivamente. Kim *et al.* (2002) submeteram os extratos de folhas de *Sasa quepaertensis* Nakai, a este mesmo ensaio antioxidante, e os valores de EC₅₀ apresentados pelo extrato metanólico (862,5 µg/mL) e pela fração de acetato de etila (288,9 µg/mL) foram superiores aos observados para as espécies de *Bambusa*. Já outros autores como Bartholomew *et al.* (2013), submeteram o extrato metanólico de folhas de *Oxytenanthera abyssinica* a esse mesmo ensaio antioxidante e o valor de EC₅₀ observado foi menor para essa espécie (56,20 µg/mL). Xu *et al.* (2016) submeteram diferentes substâncias fenólicas isoladas de *Phyllostachys prominens* W. Y. Xiong ao ensaio com DPPH e os valores de EC₅₀ encontrados variaram de 33 µg/mL a 100 µg/mL para esta espécie de bambu. É possível notar que os valores de EC₅₀ encontrados para as amostras de folhas de *M. pluriflora* foram próximos aos relatados por Tripathi *et al.* (2015) para as folhas das espécies de *Bambusa*.

Para ensaio ORAC, a fase de diclorometano de colmos de *M. pluriflora* se destacou das demais fases, com maior capacidade antioxidante, apresentando valores de substâncias equivalentes ao padrão, por exemplo, quatro vezes maior do que o encontrado em *Fargesia robusta* T. P. Yi (Van Hoyweghen *et al.*, 2010 e 2012). No ensaio ABTS, as folhas de *M. pluriflora* apresentaram valores de EC₅₀ bem inferiores ao observado para as folhas de *Phyllostachys pubescens*, Tanaka *et al.* (2014) relatam que para o extrato aquoso de folhas dessa espécie o valor de EC₅₀ no ensaio ABTS foi de 306,7 µg/mL, enquanto *M. pluriflora* apresentou valores inferiores a 100 µg/mL para todas as amostras testadas.

Muitos dos estudos para avaliar as atividades biológicas das espécies de bambus são realizados com os brotos, por ser fonte alimentícia em muitos países asiáticos. Alguns autores como Park e Jhon (2010) avaliaram o potencial antioxidante de brotos das espécies *Phyllostachys pubescens* e *Phyllostachys nigra* e observaram nos extratos metanólicos e frações aquosas uma grande quantidade de ácido ascórbico (Vitamina C), um potente antioxidante natural, além de oito substâncias fenólicas, como a protocatequina, ácido *p*-hidroxibenzoico, catequina, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido sirínico, ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico. Contudo, podemos observar que as folhas e colmos de *M. pluriflora* também apresentaram alguns desses constituintes fenólicos apontados por esses autores, o que pode indicar que essas substâncias antioxidantes se mantenham com o desenvolvimento da espécie vegetal.

3.2. Ensaio de inibição da enzima transcriptase reversa (Anti-HIV1)

No ensaio de inibição da atividade da enzima transcriptase reversa (TR) os resultados foram expressos em concentração mínima inibitória em 50% da atividade dessa enzima (MIC_{50}). Para este parâmetro, quanto menor o valor de MIC_{50} mais ativa é a amostra (ver curvas em Anexo 1).

De todas as amostras testadas, inclusive das duas frações obtidas da FAE-F com compostos isolados que foram identificados, apenas a EE-F e a FAE-F6 apresentaram atividade anti-HIV1, com valores de MIC_{50} de 0,64 mg/mL e 1,02 mg/mL, respectivamente. Foi possível observar que para este ensaio as amostras não foram efetivas, mesmo as duas amostras que mostraram inibição da TR apresentaram valores de MIC_{50} considerados altos.

Muito embora o potencial de inibição das amostras de *M. pluriflora* tenha se mostrado baixo, até o presente momento não há na literatura nenhum teste antiviral realizado com essa espécie, ou até mesmo com esse gênero de bambu, o que torna esta investigação pioneira para essa espécie.

Em contrapartida, algumas espécies de bambus asiáticos têm sido investigadas com relação à capacidade antiviral. Como exemplo, uma flavona extraída das folhas de *Sasa albo-marginata*, a tricina, se mostrou muito eficaz contra o vírus da herpes, o citomegalovírus humano, apresentando MIC_{50} de 0,17 μ g/mL, bem inferior ao Ganciclovir (MIC_{50} de 1,03 μ g/mL), que é o medicamento comumente usado para o tratamento desta doença (Ninomiya *et al.*, 2011).

Alguns dos constituintes fenólicos identificados em *M. pluriflora* já possuem relatos na literatura com relação à ação antiviral. Como exemplo, na revisão feita por Xiao *et al.* (2015) sobre os benefícios dos flavonoides C-glicosilados para a saúde humana, os autores destacam o potencial antiviral da isovitexina frente ao vírus da hepatite B e ao vírus sincicial respiratório (RSV). Wang *et al.* (2012) também testou alguns C-glicosídeos extraídos de *Lophatherum gracile* Brongn, uma espécie de bambu asiático, frente o vírus RSV, e mais uma vez a isovitexina se mostrou promissora pois apresentou MIC_{50} de 10,0 μ g/mL. Entretanto, dos vírus acima citados, apenas o RSV é um retrovírus, assim como o HIV e a isovitexina, presente em maior quantidade na FAE-F6, não se mostrou eficaz frente ao ensaio anti-HIV1 realizado neste estudo.

Com relação ao vírus HIV, alguns estudos demonstram que os polifenóis aparentemente atuam como agentes multialvo, não só inibindo a atividade das principais enzimas que replicam o vírus, mas também interferindo em outras etapas do ciclo de vida do vírus (Andrae-Marobela *et al.*, 2013).

Outros estudos relatam que alguns flavonoides como a crisina, acacetina e apigenina previnem a ativação do vírus HIV através de um mecanismo que provavelmente envolva a inibição da transcrição viral (Critchfield *et al.*, 1996). Já com relação à estrutura química dos compostos fenólicos, alguns autores sugerem que os flavonoides com grupos hidroxila em C5 e C7 e com uma

ligação dupla entre C2-C3 são inibidores mais potentes do crescimento do vírus HIV. Em geral, a presença de substituintes (hidroxila e halogênio) no anel B pode aumentar a toxicidade, ou diminuir a atividade dessas moléculas (Hu *et al.*, 1994).

Dos flavonoides identificados em *M. pluriflora* da população estudada, a vitexina e a isovitexina apresentam as características estruturais citadas acima, mas provavelmente o sinergismo com os outros compostos presentes nos extratos pode ter diminuído a eficácia dessas substâncias frente ao ensaio anti-HIV realizado.

3.3. Ensaio antimicrobiano

As amostras de folhas e colmos de *M. pluriflora* da população estudada não apresentaram efeito bactericida frente *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas pally*, porém, algumas amostras apresentaram efeito bacteriostático frente a todas as bactérias testadas. Os resultados da atividade antimicrobiana das amostras foram apresentados em concentração mínima inibitória de 50% do crescimento bacteriano (MIC₅₀). Para este parâmetro, quanto menor o valor de MIC₅₀, maior é a atividade de inibição do crescimento bacteriano exercida pela amostra testada (ver curvas em Anexo 1).

No ensaio com *Escherichia coli* apenas a FAE-C e o EE-C apresentaram atividade de inibição de crescimento da bactéria, com valores de MIC₅₀ 468,21 µg/mL e 475,97 µg/mL, respectivamente. No teste com *Bacillus subtilis* somente a FD-C e a FAE-F12 apresentaram atividade de inibição do crescimento, com MIC₅₀ 844,45 µg/mL e 983,22 µg/mL, respectivamente. Já no ensaio com *Pseudomonas pally*, algumas das frações isoladas da FAE-F se destacaram com os menores valores de MIC₅₀, sendo FAE-F6 (101,08 µg/mL) a fração que apresentou maior atividade antimicrobiana, seguida da FAE-F12 (112,05 µg/mL), FD-F (126,22 µg/mL), FAE-F14 (135,88 µg/mL), FAE-F10 (142,09 µg/mL), FHM-F (203,51 µg/mL), FD-C (204,12 µg/mL), FAE-F9 (205,36 µg/mL), FHM-C (322,85 µg/mL), e do EE-C (342,45 µg/mL) com o maior valor de MIC₅₀ frente a esta bactéria (Tabela 3.4).

Vale lembrar que FAE-F6 e FAE-F10 foram enviadas para identificação dos constituintes fenólicos via RMN ¹H (ver Cap. 2, item 3.4) e que os constituintes fenólicos identificados foram a isovitexina (FAE-F6) e o cafeato de metila (FAE-F10) e ambas apresentaram valores de MIC₅₀ menores do que 150 µg/mL.

Tabela 3.4 – MIC₅₀ (µg/mL) para as amostras de folhas e colmos de *M. pluriflora* que apresentaram atividade bacteriostática frente às bactérias testadas. (EE) extrato bruto etanólico de folhas (F) e colmos (C); (FD) fase de diclorometano de folhas (F) e colmos (C); (FAE) fase de acetato de etila de folhas (F) e colmos (C); (FHM) fase hidrometanólica de folhas (F) e colmos (C); (FAE-F) frações obtidas da fase de acetato de etila de folhas via CLAE semi-prep.

Bactéria	Amostra	MIC ₅₀ (µg/mL)
<i>Escherichia coli</i>	EE-C	475,97
	FAE-C	468,21
	Gentamicina	6,10
<i>Bacillus subtilis</i>	FD-C	844,45
	FAE-F12	983,22
	Gentamicina	5,97
<i>Pseudomonas pally</i>	EE-C	342,45
	FD-C	204,12
	FHM-C	322,85
	FD-F	126,22
	FHM-F	203,51
	FAE-F6	101,08
	FAE-F9	205,36
	FAE-F10	142,09
	FAE-F12	112,05
	FAE-F14	135,88
	Gentamicina	1,53

No ensaio com a resazurina foi possível observar que apenas o controle negativo sem bactéria e as maiores concentrações do antibiótico gentamicina (controle positivo do ensaio) apresentaram uma coloração azulada (Figura 3.2), o que significa que não há células bacterianas viáveis na solução. Esse dado foi corroborado pela observação das microplacas contendo o meio de cultura sólido, onde foi possível notar que não houve crescimento das bactérias nos poços em que a resazurina indicou a cor azul, mostrando, mais uma vez, que não havia bactérias vivas nesses poços. Já nos poços correspondentes às amostras testadas, a coloração se mostrou rosada, o que indica a presença de células vivas nos poços, dado que também foi corroborado pela observação do crescimento bacteriano nas placas de Petri contendo o meio sólido. Com isso podemos concluir que as amostras testadas apresentaram um efeito bacteriostático frente às bactérias testadas, mas não apresenta efeito bactericida, ou seja, as amostras foram capazes de inibir o crescimento bacteriano, mas não de causar a completa morte ou inviabilidade da bactéria.

Figura 3.2 - Fotos das microplacas de 96 poços com *P. pally*, *B. subtilis* e *E. coli* após o acréscimo de resazurina 0,01%. Marcado em vermelho o controle negativo (meio líquido sem bactéria); marcado em amarelo o controle positivo de gentamicina da maior para a menor concentração.

Como visto no **Capítulo 1**, os bambus possuem uma ampla gama de aplicações. Em alguns países asiáticos é comum a fabricação de produtos provenientes de extratos de bambus, e um deles é o vinagre, um produto utilizado na culinária e produzido através da fermentação dos extratos de folhas e/ou colmos de algumas espécies de bambus. Esse vinagre obtido de bambus tem sido alvo de estudos para avaliar a capacidade antimicrobiana frente a diversos microrganismos. Por exemplo, Gallón *et al.* (2011) descrevem a atividade antisséptica do vinagre produzido a partir de *Guadua angustifolia* (taquaruçu cultivado no Estado de São Paulo e Paraná) contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Os mesmos autores também identificaram diversos compostos voláteis nesse vinagre com teores e diversidade semelhantes aos de outras espécies de bambus asiáticos estudadas farmacologicamente. Já, em um estudo realizado com *Gigantochloa scortechinii*, uma espécie de bambu proveniente do sudeste asiático, foi verificada a inibição no crescimento dos microrganismos *Ralstonia* sp, *Pseudomonas* sp. e *Alcaligenes* sp. pelo vinagre obtido dos colmos, ou seja, um efeito bacteriostático (Sulaiman *et al.*, 2005).

Além de estudos com os produtos comercializados feitos de bambus, há também relatos na literatura de trabalhos realizados diretamente com os extratos obtidos de folhas e colmos. Shirotake *et al.* (2009) verificaram um efeito bactericida do extrato obtido de folhas de *Sasa veitchii* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Enterococci* sp., que são resistentes a múltiplos antibióticos. Os autores também relataram um efeito sinérgico positivo entre o extrato e alguns antibióticos usados contra essas bactérias.

Owolabi e Lajide (2015) analisaram o potencial antibacteriano de extratos das folhas de *Bambusa vulgaris* obtidos com diferentes solventes, frente a duas bactérias gram-positivas, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, e duas gram-negativas, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Foi observado que o extrato obtido com acetato de etila foi mais eficaz frente às bactérias gram-negativas e os extratos obtidos com solventes mais apolares, como o clorofórmio e o hexano, foram mais efetivos para as bactérias gram-positivas, em especial frente à *Bacillus cereus*. Em *M.*

pluriflora foi possível observar um padrão semelhante de seletividade entre a polaridade dos solventes das amostras com o tipo de parede celular apresentada pelas bactérias testadas. Assim como observado por Owolabi e Lajide (2015), as amostras de *M. pluriflora* obtidas com solventes mais polares, como a FHM e FAE foram mais efetivas frente às cepas gram-negativas (*E. coli* e *P. pally*); já as mais apolares, como a FD, foram mais eficazes frente à cepa gram-positiva (*B. subtilis*).

Analisando os dados obtidos para as amostras de *M. pluriflora* nos ensaios antimicrobianos podemos notar que a FD-F se destacou entre as fases, apresentando a menor MIC₅₀ frente à *P. pally* (126,22 µg/mL). Das fases de folhas, essa amostra foi a que concentrou a maior quantidade de substâncias fenólicas que não flavonoides, e, principalmente o constituinte cafeato de metila. Várias substâncias derivadas do ácido cinâmico possuem relatos na literatura com ação antimicrobiana, principalmente os metilados (Sova, 2012), como é o caso do cafeato de metila. Esses dados sugerem que os fenilpropanoides juntamente com as substâncias derivadas do ácido clorogênico presentes em maiores quantidades na FD-F sejam as substâncias com influência positiva na atividade antimicrobiana apresentada por essa amostra.

Muito embora não tenham sido quantificados por CLAE-DAD, provavelmente os flavonoides presentes em baixas quantidades na FD-F também possam ter contribuído para tal atividade, pois alguns autores sugerem que os flavonoides com caráter lipofílico possuem a capacidade de romper a membrana plasmática das células microbianas (Cowan, 1999), o que pode ter contribuído para ação bacteriostática mais eficaz apresentada pela FD-F frente a *P. pally*.

Além do mais, outras substâncias que não fenólicas e com atividade antimicrobiana, já foram observadas em extratos de diclorometano de folhas de outras espécies de bambus. Como exemplo, Tanaka *et al.* (2013) isolaram dois fitoesteróis, o estigmasterol e dihidrobrassicasterol do extrato de diclorometano de *Phyllostachys pubescens* e observaram que essas substâncias apresentaram efeito bacteriostático frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Algumas das substâncias fenólicas identificadas em *M. pluriflora* já possuem diversos relatos na literatura de ação antimicrobiana. Como exemplo, para a vitexina, já foi reportada ação antimicrobiana frente à *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Afifi *et al.*, 1997). A vitexina é uma flavona comumente encontrada em diversas espécies vegetais, não somente em espécies de bambus. Ravanelli (2013) identificou essa flavona em espécies de *Croton* e verificou uma maior atividade antimicrobiana frente à *P. aeruginosa* das frações contendo maiores teores de vitexina.

Muito embora algumas das amostras de *M. pluriflora* tenham apresentado atividade bacteriostática frente às três cepas de bactérias testadas, os valores de MIC₅₀ são ainda considerados muito altos. Alguns autores como Cushnie e Lamb (2011) reportam que valores de MIC abaixo de 100 µg/mL são considerados notáveis e aqueles com valores inferiores a 10 µg/mL são

considerados muito promissores como antimicrobianos. Como visto, tanto para *E. coli* quanto para *B. subtilis* as amostras de *M. pluriflora* apresentaram atividade com MIC₅₀ muito superiores aos considerados por esses autores como promissores. Frente à *E. coli* o menor valor encontrado foi para a FAE-C (468,21 µg/mL) e para *B. subtilis* a FD-C foi a amostra que apresentou o menor valor de MIC₅₀ (844,45 µg/mL). Para *P. pally*, algumas amostras se mostraram mais promissoras, como a FD-F (126,22 µg/mL) e as frações obtidas da FAE-F, com o menor valor apresentado pela FAE-F6 (101,08 µg/mL), seguida da FAE-F12 (112,05 µg/mL), FAE-F14 (135, 88 µg/mL) e FAE-F10 (142,09 µg/mL).

Conforme visto no **Capítulo 2** na tabela 2.3, das frações obtidas e testadas, FAE-F6 foi a que apresentou a maior quantidade de flavonoides (28,39 mg/g EL), especificamente de isovitexina; FAE-F12 e 14 apresentaram somente flavonoides em sua composição (12,39 mg/g EL e 4,32 mg/g EL, respectivamente); e FAE-F10 apresentou maiores conteúdos de fenilpropanoides (4,51 mg/g EAP), especificamente de cafeato de metila. Os resultados apontam para a importância da presença de isovitexina para a atividade bacteriostática observada frente à *P. pally*.

Parece haver também uma relação entre a estrutura do flavonoide com a atividade antibacteriana por ele exercida. Na revisão feita por Cushnie e Lamb (2011) sobre a ação antimicrobiana exercida pelos flavonoides e suas características estruturais, os autores reportam que as substâncias com grupos hidroxila na posição 5 e 7 do anel A, assim como hidroxilações no anel B, parecem ser mais efetivas na ação antimicrobiana. As duas flavonas identificadas em *M. pluriflora* apresentam essas características estruturais, o que de fato pode ter contribuído, por exemplo, para a eficácia da FAE-F6 frente à *P. pally*, uma vez que nessa fração encontramos vitexina e isovitexina.

Essa relação estrutura/atividade tem sido alvo de inúmeras pesquisas, pois essas características estruturais comuns entre os compostos bioativos podem ser necessárias para que os flavonoides possam se aproximar e permear as células bacterianas (Cushnie e Lamb, 2005).

4. Conclusões

M. pluriflora mostrou ser uma espécie promissora para estudos de prospecção apresentando uma grande quantidade de substâncias fenólicas em sua composição, especialmente a fase de acetato de etila com altos teores dessas substâncias.

No geral, os extratos brutos, assim como as fases obtidas por partição, provindos tanto de folhas como de colmos, apresentaram um grande potencial antiradicalar e redutor de ferro, com valores de EC_{50} inferiores a 100 $\mu\text{g/mL}$ para quase todos os ensaios aplicados, principalmente no ensaio ORAC onde esses valores variaram de 1,22 $\mu\text{g/mL}$ a 23,02 $\mu\text{g/mL}$, considerados muitos promissores.

No ensaio antibacteriano, as fases obtidas com solventes apolares, como diclorometano, se mostraram mais ativas, o que pode indicar que as substâncias fenólicas de caráter lipofílico presentes nesta espécie de bambu são promissoras para esse tipo de atividade, além de sugerir que outras substâncias que não fenólicas, mas de caráter apolar e presentes nessas fases, sejam responsáveis pela atividade observada. Além disso, algumas das frações obtidas da FAE-F, apresentaram potencial bacteriostático, com MIC_{50} próximos a 100 $\mu\text{g/mL}$, resultado que sugere a participação da flavona C-glicosiladas isovitexina na intensidade da atividade bacteriostática observada frente a *P. pally*.

Embora o resultado para o ensaio anti-HIV1 não tenha mostrado resultados promissores, este estudo contribui para o conhecimento do potencial antiviral dos extratos de bambus brasileiros.

5. Referências Bibliográficas

- Antolovich, M.; Prenzler, P. D.; Patsalides, E.; McDonald, S.; Robards, K. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, 127(1): 183-198, 2002.
- Andrae-Marobela, K.; Ghislain, F. W.; Okatch, H.; Majinda, R. R. T. Polyphenols: a diverse class of multi-target anti-HIV-1 agents. **Current Drug Metabolism**, 14: 392-413, 2013.
- Afifi, F. U.; Shervington, A.; Darwish, R. Phytochemical and biological evaluation of *Arum palaestinum*. Part 1: Flavone C-glycosides. **Acta Technologiae et Legis Medicamenti**, 8(2): 105-111, 1997.
- Alves, C. Q.; David, J. M.; David, J. P.; Bahia, M. V.; Aguiar, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, 33(10): 2202-2210, 2010.
- Augusto, O. **Radicais livres: bons, maus e naturais**. Oficina de textos, 115 pág., 2006.
- Asres, K.; Seyoum, A.; Veeresham, C.; Bucar, F.; Gibbons, S. Naturally derived anti-HIV agents. **Phytotherapy Research**, 19(7): 557-581, 2005.
- Bartholomew, O. I.; Maxwell, E.; Bitrus, H. J. Phytochemical constituents and *in vitro* antioxidant capacity of methanolic leaf extract of *Oxytenanthera abyssinica* (A. Rich Murno). **European Journal of Medicinal Plants**, 3(2): 206-217, 2013.
- Barbosa, K. B. F.; Costa, N. M. B.; Alfenas, R. C. G.; De Paula, S. O.; Minim, V. P. R.; Bressan, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, 23(4): 629-643, 2010.
- Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibensouda, S. K. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, 6: 71-79, 2016.
- Cowan, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, 12(4): 564-582, 1999.
- Cotinguiba, G. G.; Silva, J. R. N.; Azevedo, R. R. S.; Rocha, T. J. M.; Santos, A. F. Método de avaliação da defesa antioxidante: uma revisão de literatura. **UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde**, 15(3): 231-237, 2013.
- Cos, P.; Vlietinck, A. J.; Berghe, D. V.; Maes, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, 106: 290-302, 2006.
- Cushnie, T. P. T. & Lamb, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 26: 343-356, 2005.
- Cushnie, T. P. T. & Lamb, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 38: 99-107, 2011.
- Cunico, W.; Gomes, C. R. B.; Vellasco Junior, W. T. HIV - Recentes avanços na pesquisa de fármacos. **Química Nova**, 31 (8): 2111-2117, 2008.
- Critchfield, J. W.; Butera S. T.; Folks, T. M. Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. **AIDS research and human retroviruses**, 12(1): 39-46, 1996.
- Daglia, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, 23: 174-181, 2012.
- David, B.; Wolfender, J.; Dias, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, 14(2): 299-315, 2014.
- Dewick, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. New York: John Wiley & Sons, 2009.

- Ferreira, A. L. A. & Matsubara, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 43(1): 61-68, 1997.
- Furlan, C. M.; Santos, K. P.; Sedano-Partida, M. D.; Motta, L. B.; Santos, D. Y. A. C.; Salatino, M. L. F.; Negri, G.; Berry, P. E.; Van Ee, B. W.; Salatino, A. Flavonoids and antioxidant potential of nine Argentinian species of *Croton* (Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Botany**, 38(4): 693-702, 2015.
- Gallón, A. I. M.; Torres, E. C.; Cabrera, C. G. Actividad antiséptica de vinagre de *Guadua angustifolia* Kunth. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, 16(3): 244-252, 2011.
- Goyal, A. K.; Middha, S. K.; Sen, A. *Bambusa vulgaris* Schrad. Ex. J.C. Wendl. Var. *vittata* Riviere & C. Riviere leaves attenuate oxidative stress – An *in vitro* biochemical assay. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, 4(4): 436-440, 2013.
- Ghasemzadeh, A. & Ghasemzadeh, N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. **Journal of Medicinal Plants Research**, 5(31): 6697-6703, 2011.
- Gyawali, R. & Ibrahim, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, 46: 412-429, 2014.
- Guimarães, D. O.; Momesso, L. S.; Pupo, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, 33(3): 667-679, 2010.
- Harborne, J. B. & Williams, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, 55(6): 481-504, 2000.
- Hu, C. Q.; Chen, K.; Shi, Q.; Kilkuskie, R. E.; Cheng, Y. C.; Lee, K. H. Anti-AIDS agents, 10. Acacetin-7-O-beta-D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure–activity correlation with some related flavonoids. **Journal of Natural Products**, 57(1): 42-51, 1994.
- Karadag, A.; Ozcelik, B.; Saner, S. Review of methods to determine antioxidant capacities. **Food Analytical Methods**, 2(1):41–60, 2009.
- Kim, S.; Hwang, J.; Shin, H.; Jang, M.; Ko, H.; Kang, S. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Sasa quelpaertensis* leaf extracts. **Phytochemicals as Nutraceuticals – Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health**, 2002.
- Kumar, H. & Pandey, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. **The Scientific World Journal**. Article ID 162750, 16 pag. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>, 2013.
- Meyer, A. S.; Heinonen, M.; Frankel, E. N. Antioxidant interactions of catechin, cyaniding, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. **Food Chemistry**, 61(1): 71-75, 1998.
- Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, 26 (2): 211-219, 2004.
- Newman, D. J & Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, 79: 629-661, 2016.
- Ninomiya, M.; Tanaka, K.; Tsuchida, Y.; Muto, Y.; Koketsu, M.; Watanabe, K. Increased bioavailability of tricin-amino acid derivatives via a prodrug approach. **Journal of Medicine Chemistry**, 54: 1529-1536, 2011.
- O'Neill, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Publicado em 19 de Maio de 2016. Disponível em: <http://amr-review.org/Publications>.
- Oroian, M. & Escriche, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, 74: 10-36, 2015.
- Owolabi, M. S. & Lajide, L. Preliminary phytochemical screening and antimicrobial activity of crude extracts of *Bambusa vulgaris* Schrad. Ex J.C. Wendl. (Poaceae) from southwestern Nigeria. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, 3(1): 42-45, 2015.

- Park, E. J. & Jhon, D. Y. The antioxidant, angiotensin converting enzyme inhibition activity, and phenolic compounds of bamboo shoot extracts. **LWT - Food Science and Technology**, 43: 655-659, 2010.
- Petersen, F. & Amstutz, R. **Progress in drug research. Natural compounds as drugs**, Vol. I. ISBN 978-3-7643-8098-4 Birkhäuser Verlag AG, Basel – Boston – Berlin, 2008.
- Peçanha, E. P.; Antunes, O. A. C.; Tanuri, A. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. **Química Nova**, 25(6B): 1108-1116, 2002.
- Ravanelli, N. Perfil químico e atividades biológicas de *Croton echinocarpus* e *Croton vulnerarius*. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Botânica, 2013.
- Razzaghi-Asl, N.; Garrido, J.; Khazraei, H.; Borges, F.; Firuzi, O. Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure- activity relationships. **Current Medicinal Chemistry**, 20(36): 4436-4450, 2013.
- Roche. Reverse Transcriptase Assay, colorimetric. Version 13.0, content version: August 2010. Disponível em: www.roche-applied-science.com.
- Saleem, M.; Nazir, M.; Ali, M. S.; Hussain, H.; Lee, Y. S.; Riaz, N.; Jabbar, A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural Product Reports**, 27(2): 238-254, 2010.
- Santos, K. P.; Sedano-Partida, M. D.; Motta, L. B.; Cordeiro, I.; Furlan, C. M. Antioxidant activity of flavonoids from *Croton sphaerogynus* Baill. **Brazilian Journal of Botany**, (no prelo), 2016).
- Sedano-Partida, M. D.; Silva-Luz, C. L.; Lombello, R.; Furlan, C.M. (em preparação). Anti-HIV-1 and antibacterial potential of *Hyptis* spp. (Lamiaceae).
- Silveira, G. P.; Nome, F.; Gesser, J. C.; Mandolesi Sá, M.; Terenzi, H. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova**, 29(4): 844-855, 2006.
- Souza, M. V. N. & Almeida, M. V. Drogas anti-HIV: passado, presente e perspectivas futuras. **Química Nova**, 26(3): 366-372, 2003.
- Sova, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, 12: 749-767, 2012.
- Shahidi, F. & Zhong, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, 2015. doi: 10.1016/j.jff.2015.01.047.
- Shirotake, S.; Nakamura, J.; Kaneko, A.; Anabuki, E.; Shimizu, N. Screening bactericidal action of cytoplasm extract from kumazasa bamboo (*Sasa veitchii*) leaf against antibiotics-resistant pathogens such as MRSA and VRE strains. **Journal of Bioequivalence & Bioavailability**, 1(3): 080- 085, 2009.
- Singh, S. B. & Barrett, J. F. Empirical antibacterial drug discovery - Foundation in natural products. **Biochemical Pharmacology**, 71(7): 1006-1015, 2006.
- Sucupira, N. R.; Silva, A. B.; Pereira, G.; Costa, J. N. Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. **UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde**, 14(4): 263-269, 2012.
- Sulaiman, O.; Murphy, R. J.; Hashim, R.; Gritsch, C. S. The inhibition of microbial growth by bamboo vinegar. **Journal Bamboo and Rattan**, 4(1): 71-80, 2005.
- Tanaka, A.; Shimizu, K.; Kondo, R. Antibacterial compounds from shoot skins of moso bamboo (*Phyllostachys pubescens*). **Journal of Wood Science**, 59(2): 155-159, 2013.
- Tanaka, A.; Zhu, Q.; Tan, H.; Horiba, H.; Ohnuki, K.; Mori, Y.; Yamauchi, R.; Ishikawa, H.; Iwamoto, A.; Kawahara, H.; Shimizu, K. Biological activities and phytochemical profiles of extracts from different parts of bamboo (*Phyllostachys pubescens*). **Molecules**, 19(6): 8238-8260, 2014.

- 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**, 9(4): 271-277, 2015.
- Van Hoyweghen, L.; Karalic, I.; Calenbergh, S. V.; Deforce, D.; Heyerick, A. Antioxidant flavone glycosides from the leaves of *Fargesia robusta*. **Journal of Natural Products**, 73(9): 1573-1577, 2010.
- Van Hoyweghen, L.; De Beer, T.; Deforce, D.; Heyerick, A. Phenolic compounds and anti-oxidant capacity of twelve morphologically heterogeneous bamboo species. **Phytochemical Analysis**, 23: 433-443, 2012.
- Vasconcelos, T. B.; Cardoso, A. R. N. R.; Josino, J. B.; Macena, R. H. M.; Bastos, V. P. D. Radicais livres e antioxidantes: proteção ou perigo? **UNOPAR Científica: Ciências Biológicas e da Saúde**, 16(3): 213-9, 2014.
- Van Acker, S. A., Van Den Berg, D. J., Tromp, M. N., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J., Bast, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, 20(3): 331-342, 1996.
- Xiao, J.; Capanoglu, E.; Jassbi, A. R.; Miron, A. Advance on the Flavonoid C-glycosides and Health Benefits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 2015. DOI: 10.1080/10408398.2015.1067595
- Xu, X.; Yue, Y.; Jiang, H.; Sun, J.; Tang, F.; Guo, X.; Wang, J. Chemical constituents and antioxidant properties of *Phyllostachys prominens* gramineae (W Y Xiong) leaf extracts. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 15 (3): 569-575, 2016.
- Wang, Y.; Chen, M.; Zhang, J.; Zhang, X.; Huang, X.; Wu, X.; Zhang, Q.; Li, Y.; Ye, W. Flavone C-glycosides from the leaves of *Lophatherum gracile* and their *in vitro* antiviral activity. **Planta Medica**, 78: 46-51, 2012.

Considerações finais

No contexto da grande aplicabilidade econômica de diversas espécies de bambus asiáticos, de uma forma geral, foi possível observar que *M. pluriflora* se mostrou uma espécie nativa promissora para futuras investigações. Tanto as folhas quanto os colmos dessa espécie apresentaram diferentes metabólitos de interesse econômico.

Dos metabólitos primários, maior destaque aos lipídeos, que foram quantificados em maiores quantidades quando comparados aos outros dois tipos de metabólitos primários analisados. Com relação aos metabólitos secundários analisados, mais especificamente os constituintes fenólicos, as folhas de *M. pluriflora* apresentaram uma maior diversidade de flavonoides. Já os colmos apresentaram um maior teor de fenilpropanoides e derivados do ácido clorgênico, evidenciando que a constituição fenólica entre os dois órgãos analisados foi distinta, sendo apenas três os constituintes observados em ambos.

Como era esperado, dentre os constituintes de *M. pluriflora*, foram observadas flavonas C-glicosiladas e derivados do ácido cinâmico e clorogênico, pois são substâncias comumente encontradas em outras espécies de bambus, além de uma série de compostos fenólicos que não foi identificada neste estudo.

M. pluriflora provou ser uma espécie com potencial biológico. No geral, os extratos brutos, assim como as fases obtidas por partição, provindos de folhas e colmos dessa espécie, apresentaram um grande potencial antioxidante, mais precisamente antirradicalar e redutor de ferro. Os constituintes fenólicos mais lipofílicos, assim como alguns flavonoides presentes em *M. pluriflora* apresentaram atividade bacteriostática. No que diz respeito à atividade antiviral, os constituintes presentes em *M. pluriflora* não mostraram ação antirretroviral, porém, esse estudo se mostrou pioneiro em analisar o potencial antiviral de espécies nativas de bambu.

Para obtermos um panorama geral dos resultados observados para *M. pluriflora*, foi correlacionada a composição fenólica dos extratos brutos e das fases obtidas por partição com as atividades biológicas analisadas neste estudo, utilizando, para isso, uma análise multivariada pelo método de análise do componente principal (PCA) (Figura 4.1). Para essa análise foi construída uma matriz de covariância contendo como variáveis as quantificações de substâncias fenólicas majoritárias para cada amostra, obtidas via CLAE-DAD, assim como as quantidades em miligramas por grama equivalentes aos padrões apresentados pelas amostras nos ensaios antioxidantes, e os valores de MIC₅₀ para o ensaio antimicrobiano realizado com *P. pally*.

Podemos observar na figura 4.1, que a PCA pode explicar 65% da variabilidade existente nos dados nos dois primeiros eixos. É possível notar a representação espacial das amostras de acordo com o órgão estudado, onde as amostras de folhas ficaram mais concentradas no lado positivo do eixo 2 e as amostras de colmos no lado negativo deste mesmo eixo.

Conforme verificado no decorrer do trabalho e corroborado pela PCA, os diferentes constituintes fenólicos encontrados em maior abundância se apresentam como variável determinante para a separação das amostras. Podemos observar que as amostras posicionadas no lado negativo do eixo 1, FD-C, EE-C e FAE-C são as fases que apresentaram os maiores teores de fenilpropanoides e derivados do ácido clorogênico. A posição da FD-C mais distante no lado negativo do eixo 1 evidencia a alta capacidade antioxidante dessa amostra. Já no lado positivo do eixo 1, podemos observar que a composição flavonoídica das amostras de folhas foi o que mais influenciou na capacidade antiradicalar das mesmas, com destaque para a FAE-F.

Foi possível observar que os constituintes fenólicos presentes nos colmos parecem exercer maior capacidade quelante e menor atividade antimicrobiana frente a *P. pally*. Cabe ressaltar que os vetores da PCA indicam o sentido dos maiores valores para a variável em questão e, dessa forma, para a atividade antimicrobiana o maior valor de MIC₅₀ indica menor atividade, ou seja, o vetor aponta para as amostras com menor potencial antimicrobiano.

Embora este estudo não tenha isolado e identificado os diferentes constituintes fenólicos devido ao curto período do curso de mestrado, os extratos, suas fases e alguns isolados foram analisados quanto ao potencial antioxidante, antibacteriano e anti-HIV. Dessa forma, com este estudo foi possível verificar que os bambus nativos também podem ser fontes de substâncias fenólicas bioativas com grande potencial biológico, especialmente flavonoides C-glicosilados, derivados do ácido cinâmico e derivados do ácido clorogênico.

Figura 4.1 – (A) Análise de componente principal utilizando 19 variáveis relacionadas à composição química, atividade antioxidante e antibacteriana dos extratos e fases de folhas e colmos de *M. pluriflora*. (EE) extrato bruto etanólico de folhas (F) e colmos (C); (FH) fase de hexano de folhas (F) e colmos (C); (FD) fase de diclorometano de folhas (F) e colmos (C); (FAE) fase de acetato de etila de folhas (F) e colmos (C); (FHM) fase hidrometanólica de folhas (F) e colmos (C). (B). Coeficientes de correlação entre as variáveis analisadas e os eixos 1 e 2. (C). Porcentagem de variância explicada pela análise e porcentagem de variância esperada estimada pelo teste da vara quebrada.

Resumo

Diferentemente do que muitos imaginam, o Brasil é detentor da maior diversidade de espécies de bambus dos países do Novo Mundo. O conhecimento sobre o potencial de aplicações de bambus nativos é extremamente subdesenvolvido em comparação ao de espécies asiáticas. Considerando que as espécies asiáticas são utilizadas na medicina popular e se têm relatos de várias atividades biológicas atribuídas à presença de flavonoides e outras substâncias fenólicas de interesse, espécies de bambu do Neotrópico são potenciais fontes de bioativos. Utilizando-se essa premissa, *Merostachys pluriflora*, uma espécie nativa de bambu, foi escolhida como modelo de estudo. Este trabalho teve como objetivos quantificar o teor de amido, carboidratos solúveis, lipídeos, fenóis totais, flavonoides, taninos totais e proantocianidinas de folhas e colmos de *M. pluriflora*; e avaliar o potencial biológico dos seus extratos, fases e substâncias isoladas através de ensaios *in vitro* da capacidade antioxidante, anti-HIV-1 e antibacteriana. Foi possível observar que o extrato bruto de folhas rendeu o dobro do extrato de colmo e que as fases obtidas com solventes mais polares, como a fase hidrometanólica, apresentaram maiores rendimentos. Dos metabólitos primários quantificados em *M. pluriflora*, os lipídeos se destacaram em conteúdo em ambos os órgãos estudados. Com relação as substâncias fenólicas, foi possível observar que o extrato bruto dos colmos apresentou uma maior abundância de fenilpropanoides e derivados do ácido clorogênico, enquanto o extrato bruto das folhas apresentou uma maior abundância de flavonoides, quando comparadas aos colmos. Das substâncias fenólicas presentes em *M. pluriflora*, foram identificadas duas flavonas, a vitexina e a isovitexina; e três fenilpropanoides, o ácido cafeico, ácido ferúlico e o cafeato de metila. Das fases geradas por partição, a de acetato de etila e de diclorometano, para ambos os órgãos, foram as que apresentaram a maior parte dos constituintes fenólicos, sendo as fases de acetato de etila mais ricas em flavonoides e as de diclorometano em fenilpropanoides. No geral, os extratos brutos, assim como as fases de folhas e colmos de *M. pluriflora*, apresentaram um grande potencial antioxidante, principalmente antiradicalar e redutor de ferro, apresentando valores de EC₅₀ de 16,30 µg/mL a 94,77 µg/mL no ensaio ABTS, no ensaio FRAP esses valores variaram de 27,92 µg/mL a 145,78 µg/mL. No ensaio antibacteriano, especialmente frente à *P. pally*, a fase de diclorometano de folhas se mostrou mais ativa, com MIC₅₀ de 126,22 µg/mL o que pode indicar que as substâncias fenólicas de caráter lipofílico, nessa espécie, são promissoras para essa atividade. Embora o ensaio anti-HIV1 mostrou que as amostras não apresentam atividade antirretroviral, este estudo contribui para o conhecimento do potencial antiviral dos extratos de bambus brasileiros. *M. pluriflora* se mostrou uma espécie promissora para estudos de prospecção, com uma grande quantidade de substâncias fenólicas em sua composição.

Abstract

Brazil is the country with the highest diversity of bamboo species in the New World. Knowledge about the medicinal potential of native bamboos is extremely underdeveloped when compared to Asian species. Some Asian bamboo species are used in folk medicine and have reports of various biological activities attributed to the presence of phenolic compounds, so bamboo species of the Neotropics are potential sources of bioactive substances. Using this assumption, *Merostachys pluriflora*, a native bamboo species, was chosen as a model for this study. The aimed of this study was to quantify the contents of starch, soluble carbohydrates, lipids, total phenols, flavonoids, total tannins and proanthocyanidins in leaves and culms of *M. pluriflora*; and evaluate the biological potential of the extracts, phases and isolated substances through *in vitro* assays: antioxidant activity, anti-HIV1 and antibacterial activity. It was observed that the crude extract of leaves yielded twice more than the culm extract; phases obtained with more polar solvents, such as hydromethanolic phases, had the highest yields. Lipids were the class of primary metabolites that presented higher quantities on both organs studied. Regarding the phenolic substances, it was observed that the crude extract of culms presented higher abundance of phenylpropanoids and chlorogenic acid derivates, but the crude extract from leaves showed higher abundance of flavonoids (all of then derived from apigenin) when compared to culms. Were identified two flavones, vitexin and isovitexin, and three phenylpropanoids, caffeic acid, ferulic acid and methyl caffeate. Phases using ethyl acetate and dichloromethane as extraction solvents were those that retained the majority of phenolic constituents. Ethyl acetate phase presented flavonoids while dichloromethane phase presented phenylpropanoids as major contituents. In general, the crude extracts and phases from leaves and culms of *M. pluriflora* showed antioxidant activity, especially antiradical and iron reducer capacity, presenting EC₅₀ values of 16.30 mg/mL to 94.77 mg/ml in ABTS assay. For FRAP assay these values ranged from 27.92 mg/mL to 145.78 mg/mL. In the antibacterial assay, especially for *P. pally*, the dichloromethane phase from leaves was more active, presenting MIC₅₀ of 126.22 mg/mL. This might indicate that the lipophilic phenolic present in this species of bamboo are promising for antibacterial activity. Although the anti-HIV1 assay showed that the samples do not present antiretroviral potential, this study contributes to the knowledge of the antiviral potential of Brazilian bamboo species. *M. pluriflora* showed to be a promising species for prospecting studies, with a large amount of phenolic substances in its composition.

Anexos

A1)

Tabela A.1.1- Curvas utilizadas para a quantificação de metabólitos primários e de substâncias fenólicas de folhas e colmos de *M. pluriflora*.

Método	Doseamento	Substância referência	(µg)	Equação da reta	R ²
Colorimétrico	Amido	Glicose	1.3 - 17.5	$y = 0,0606x - 0,002$	0,9996
	Carboidratos solúveis	Glicose	3.0 - 30.0	$y = 0,0152x + 0,1519$	0,9954
	Fenóis totais	Ácido gálico	0.25 - 4.0	$y = 0,2562x + 0,0856$	0,9969
	Flavonoide	Quercetina	0.36 - 8.4	$y = 0,1359x + 0,0369$	0,9965
	Tanino total	Ácido tânico	10.0 - 120.0	$y = 0,0124x + 0,0902$	0,9946
	Proantocianidina	Tanino de quebracho	24.0 - 144.0	$y = 0,0087x + 0,0294$	0,9964
CLAE-DAD	Derivados de ácido clorogênico	Ácido clorogênico	0.002 - 0.45	$y = 18364x + 40,089$	0,9996
	Fenilpropanoides	Ácido <i>p</i> -cumárico	0.002 - 0.45	$y = 49167x - 67,878$	0,9951
	Flavonoides	Luteolina	0.002 - 0.45	$y = 47576x + 150,21$	0,9984

Tabela A.1.2 - Curvas utilizadas para a quantificação de substâncias equivalentes aos padrões utilizados nos ensaios de atividade antioxidante.

Ensaio	Substância referência	Quantidade	Equação da reta	R ²
DPPH	Trolox	0.25 µg - 4.0 µg	$y = -0,2854x + 0,9637$	0,9989
	Quercetina	0.30 µg - 4.8 µg	$y = -0,3462x + 1,3184$	0,9916
FRAP	Trolox	0.12 µg - 2.0 µg	$y = 0,5312x + 0,078$	0,9968
	Quercetina	0.06 µg - 0.6 µg	$y = 2,4615x + 0,1196$	0,9923
ABTS	Trolox	0.12 µg - 2.0 µg	$y = -0,4616x + 0,9897$	0,9909
	Quercetina	0.06 µg - 1.20 µg	$y = -0,4277x + 0,9203$	0,9974
Quelante	Ácido gálico	0.07 µg - 10.0 µg	$y = -0,3454x + 0,6945$	0,9926
ORAC	Trolox	0.00015 µmol - 0.0025 µmol	$y = 27705x + 4,3208$	0,9972

Tabela A.1.3 - Curvas utilizadas para o cálculo de EC₅₀ dos padrões e das amostras de folhas e colmos de *M. pluriflora* para todos os ensaios antioxidantes. * EC não calculada.

Ensaio	Amostras	(µg/mL)	Equação da reta	R ²
DPPH	EE-F	20.0 - 90.0	$y = 0,1988x + 26,241$	0,9844
	FH-F	20.0 - 90.0	*	*
	FD-F	20.0 - 90.0	$y = 0,1188x + 27,341$	0,9200
	FAE-F	20.0 - 90.0	$y = 0,169x + 30,112$	0,9954
	FHM-F	20.0 - 90.0	$y = 0,153x + 28,982$	0,9887
	EE-C	20.0 - 90.0	$y = 0,2637x + 2,0289$	0,9951
	FH-C	20.0 - 90.0	$y = 0,1772x - 2,6186$	0,9984
	FD-C	20.0 - 90.0	*	*
	FAE-C	20.0 - 90.0	$y = 0,1725x + 7,764$	0,8657
	FHM-C	20.0 - 90.0	$y = 0,1108x + 4,1505$	0,9944
	Trolox	1.1 - 18.2	$y = 3,8046x + 34,159$	0,9549
	Quercetina	1.4 - 21.8	$y = 5,4929x + 5,2975$	0,989
ABTS	EE-F	17.0 - 67.0	$y = 1,0797x + 22,303$	0,9522
	FH-F	17.0 - 67.0	*	*
	FD-F	17.0 - 67.0	$y = 1,0126x + 12,32$	0,9800
	FAE-F	17.0 - 67.0	$y = 1,0424x + 29,509$	0,9251
	FHM-F	17.0 - 67.0	$y = 1,021x + 33,359$	0,8273
	EE-C	17.0 - 67.0	$y = 0,7705x + 19,558$	0,9848
	FH-C	17.0 - 67.0	$y = 0,5966x - 6,539$	0,9255
	FD-C	17.0 - 67.0	$y = 0,6789x + 8,7973$	0,9813
	FAE-C	17.0 - 67.0	$y = 0,7847x + 23,91$	0,9424
	FHM-C	17.0 - 67.0	$y = 0,8269x + 10,953$	0,9767
	Trolox	0.8 - 13.3	$y = 8,2031x - 10,22$	0,9897
	Quercetina	0.2 - 4.0	$y = 14,558x - 1,5078$	0,9837
FRAP	EE-F	0.5 - 66.70	$y = 0,4871x + 5,1481$	0,9994
	FH-F	0.5 - 66.70	*	*
	FD-F	0.5 - 66.70	$y = 0,5014x + 5,0288$	0,9980
	FAE-F	0.5 - 66.70	$y = 0,8606x + 5,3509$	0,9996
	FHM-F	0.5 - 66.70	$y = 0,5263x + 4,8807$	0,9974
	EE-C	0.5 - 66.70	$y = 0,7179x + 5,4754$	0,9986
	FH-C	0.5 - 66.70	$y = 0,3079x + 5,1133$	0,9946
	FD-C	0.5 - 66.70	$y = 1,5829x + 5,8007$	0,9987
	FAE-C	0.5 - 66.70	$y = 0,8534x + 6,2867$	0,9984
	FHM-C	0.5 - 66.70	$y = 0,4139x + 5,0782$	0,9980
	Trolox	0.4 - 6.7	$y = 9,8263x + 3,5566$	0,9847
	Quercetina	0.2 - 2.0	$y = 44,381x + 8,1991$	0,9915

Tabela A.1.3 - continuação.

Ensaio	Amostras	($\mu\text{g/mL}$)	Equação da reta	R ²
QUELANTE	EE-F	0.3 - 40.0	$y = 0,7089x + 3,0652$	0,9722
	FH-F	0.3 - 40.0	*	*
	FD-F	0.3 - 40.0	*	*
	FAE-F	0.3 - 40.0	$y = 1,8464x + 3,2968$	0,9906
	FHM-F	0.3 - 40.0	$y = 2,1059x + 6,9075$	0,9976
	EE-C	0.3 - 40.0	$y = 0,8039x + 5,4729$	0,9934
	FH-C	0.3 - 40.0	*	*
	FD-C	0.3 - 40.0	*	*
	FAE-C	0.3 - 40.0	$y = 0,4897x + 7,6032$	0,9994
	FHM-C	0.3 - 40.0	$y = 0,3881x + 12,732$	0,9546
	Ácido gálico	0.6 - 20.0	$y = 3,6267x + 8,465$	0,9882
ORAC	EE-F	0.97 - 31.30	$y = 8,064x + 3,2839$	0,9876
	FH-F	0.97 - 31.30	$y = 2,1735x - 0,036$	0,9961
	FD-F	0.97 - 31.30	$y = 7,9358x + 1,979$	0,9859
	FAE-F	0.97 - 31.30	$y = 16,465x + 5,0084$	0,9784
	FHM-F	0.97 - 31.30	$y = 7,9769x + 0,737$	0,983
	EE-C	0.97 - 31.30	$y = 9,0214x + 12,077$	0,9877
	FH-C	0.97 - 31.30	$y = 4,7075x + 7,1503$	0,9635
	FD-C	0.97 - 31.30	$y = 14,218x + 32,617$	0,8962
	FAE-C	0.97 - 31.30	$y = 12,684x + 6,0208$	0,994
	FHM-C	0.97 - 31.30	$y = 4,6392x + 6,7006$	0,9469
	Trolox	0.06 - 1.01	$y = 95,101x + 5,8519$	0,9963

Tabela A.1.4 - Curvas utilizadas para cálculo de MIC₅₀ das amostras de folhas de *M. pluriflora* para o ensaio anti-HIV.

Ensaio	Amostras	($\mu\text{g/mL}$)	Equação da reta	R ²
Anti-HIV	EE-F	42.0 - 333.0	$y = 12,639\ln(x) - 31,718$	0,9782
	FAE-F6	42.0 - 333.0	$y = 5,8063\ln(x) - 3,6065$	0,9391

Tabela A.1.5 - Curvas utilizadas para cálculo de MIC₅₀ dos padrões e das amostras de folhas e colmos de *M. pluriflora* para o ensaio antimicrobiano.

Bactéria	Amostras	(µg/mL)	Equação da reta	R ²
<i>Escherichia coli</i>	EE-C	10.0 - 200.0	$y = 0,1222x - 8,1638$	0,9732
	FAE-C	10.0 - 200.0	$y = 0,088x + 8,7971$	0,9478
	Gentamicina	0.3 - 50.0	$y = 5,009x + 19,462$	0,8946
<i>Pseudomonas pally</i>	FD-F	50.0 - 150.0	$y = 0,5438x - 18,638$	0,9674
	FHM-F	10.0 - 200.0	$y = 0,2256x + 4,0881$	0,9915
	EE-C	10.0 - 200.0	$y = 0,1317x + 4,899$	0,9987
	FD-C	10.0 - 200.0	$y = 0,2196x + 5,1744$	0,9832
	FHM-C	10.0 - 200.0	$y = 0,1224x + 10,483$	0,9739
	FAE-F6	25.0 - 100.0	$y = 0,5054x - 1,0867$	0,9979
	FAE-F9	25.0 - 100.0	$y = 0,224x + 4$	0,9013
	FAE-F10	25.0 - 100.0	$y = 0,3652x - 1,89$	0,9156
	FAE-F12	25.0 - 100.0	$y = 0,2921x + 17,27$	0,9784
	FAE-F14	25.0 - 100.0	$y = 0,1898x + 24,21$	0,8871
	Gentamicina	0.3 - 50.0	$y = 7,8848x + 37,96$	0,9061
<i>Bacillus subtilis</i>	FD-C	75.0 - 200.0	$y = 0,0559x + 2,7953$	0,9935
	FAE-F12	25.0 - 100.0	$y = 0,0413x + 9,3929$	0,9636
	Gentamicina	0.3 - 50.0	$y = 3,8014x + 27,289$	0,9742

Tabela A.1.6 - Curvas utilizadas como controle positivo nos ensaios antimicrobianos e anti-HIV.

Ensaio	Substância referência	Medida	Equação da reta	R ²
Antimicrobiano (<i>E. coli</i>)	Gentamicina	0.07 µg - 20.0 µg	$y = -0,153\ln(x) + 0,3656$	0,962
Antimicrobiano (<i>P. pally</i>)	Gentamicina	0.07 µg - 20.0 µg	$y = -0,171\ln(x) + 0,2452$	0,9221
Antimicrobiano (<i>B. subtilis</i>)	Gentamicina	0.07 µg - 20.0 µg	$y = -0,037\ln(x) + 0,1264$	0,9289
Anti-HIV	Foscarnet	75 ng/mL - 6.000 ng/mL	$y = 23,163\ln(x) - 94,726$	0,9638