

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FILIFE FERNANDES HORST

ESTUDO FITOQUÍMICO, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E  
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DA ESPÉCIE VEGETAL  
*Chusquea pinifolia* NESS (NESS) (POACEAE).



CURITIBA  
2018

FILIPPE FERNANDES HORST

ESTUDO FITOQUÍMICO, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E  
PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DA ESPÉCIE VEGETAL  
*Chusquea pinifolia* NESS (NESS) (POACEAE).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, tendo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Dr. Obdulio Gomes Miguel.

Coorientador: Dr. Vinícius Bednarczuk de Oliveira.

CURITIBA  
2018



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **FILIPPE FERNANDES HORST** intitulada: **ESTUDO FITOQUÍMICO, ATIVIDADES BIOLÓGICAS E PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DA ESPÉCIE VEGETAL *Chusquea pinifolia* NESS (NESS) (POACEAE)**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 22 de Março de 2018.

ABDULIO GOMES MIGUEL  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

VITOR ALBERTO KERBER  
Avaliador Externo (UFPR)

MARILIS DALLARMI MIGUEL  
Avaliador Interno (UFPR)

Horst, Filipe Fernandes

Estudo fitoquímico, atividades biológicas e propriedades antioxidantes da espécie vegetal *Chusquea pinifolia* NESS (NESS) (POACEAE) / Filipe Fernandes Horst. - Curitiba, 2018.

84 f.: il. (color.) ; 30 cm.

Orientador: Professor Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Friedelina. 2. Tricin. 3. Artemia salina. 4. Hemólise. 5. Complexo fosfomolibdênio. I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.321

“Aquele que cresceu nas montanhas pode viver durante anos na cidade, desenvolver um trabalho científico e enriquecer sua inteligência, mas o que não pode fazer é permanecer eternamente lá embaixo.

Quando vê aparecer o sol entre as nuvens e sente o vento no rosto, sonha como uma criança com novas aventuras nas montanhas.”

**(Reinhold Messner)**

## AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Obdulio** pela orientação comprometida e o mais incentivador suporte que eu já pude receber durante minha atividade acadêmica e pelo exemplo de vida que eu vou sempre levar comigo como na minha carreira profissional, meu mais sincero obrigado.

À **Profª Drª Marilis Dallarmi Miguel** pelos ensinamentos, paciência e confiança.

Ao **Prof. Dr. Vinicios Bednarczuk** pelo direcionamento no projeto de maneira genial, por toda atenção e dedicação que sigo como um exemplo de vida.

À **Universidade Federal do Paraná** e ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** pela oportunidade.

Ao **Departamento de Química** da Universidade Federal do Paraná pelos espectros de ressonância magnética nuclear.

E aos **Servidores da UFPR**, a bolsa de Estudo da **CAPES** que tornou possível para eu descobrir o fascinante mundo da pesquisa científica.

A todos os professores das disciplinas que cursei no Mestrado e também aos meus pais pelos ensinamentos que contribuíram de forma direta ou indireta na realização desta pesquisa.

## RESUMO

A espécie *Chusquea pinifolia* pertence à família Poacea, é uma espécie endêmica encontrada nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná, localizada em campos de altitude na região de alta montanha. O ambiente onde é encontrada e a falta de estudo sobre a espécie foi o que motivou o desenvolvimento deste trabalho que tem como principal objetivo a identificação de compostos e a avaliação das atividades biológicas presentes nos constituintes químicos. Para o estudo da espécie foram obtidos extratos brutos para folha e caule utilizando etanol como solvente. Posteriormente os extratos brutos foram fracionados com solventes de polaridade crescente para obtenção das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente. Foram feitos doseamentos de polifenóis e flavonoides totais. As atividades biológicas realizadas foram a de toxicidade frente à *Artemia salina*, atividade hemolítica e atividade antioxidante (DPPH, complexo fosfomolibdênio). Isolou-se um triterpeno identificado como Friedelina da fração hexano do caule, estudos realizados apontam significativa atividade analgésica desta substância, e da fração clorofórmio das folhas foi isolado um flavonoide identificado como Tricin, avaliado como composto majoritário do extrato bruto das folhas. Nenhuma das frações dos extratos brutos causou toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. Na atividade hemolítica a fração hexano do caule, nas concentrações de 500, 800 e 1000 µg/mL, causou hemólise de média 60% em relação ao controle. Na atividade antioxidante pelo método DPPH, a fração acetato de etila do caule foi a que apresentou melhor atividade, com IC<sub>50</sub> de 21µg/mL, no complexo fosfomolibdênio a fração clorofórmio tanto para folha como para o caule expressaram atividades respectivamente de 18,23% e 41,08%, comparada ao controle vitamina C. Conclui-se que a espécie *Chusquea pinifolia* necessita de mais estudos com finalidade de verificar suas atividades farmacológicas já que os resultados demonstram baixa toxicidade e boa atividade antioxidante nos modelos analisados.

Palavras-chave: Friedelina. Tricin. *Artemia salina*. Hemólise. Complexo fosfomolibdênio.

## ABSTRACT

The species *Chusquea pinifolia* belongs to the family Poacea, is a species found in the states of Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro and Paraná, located in high altitude fields in the high mountain region. Due to the environment where it is found and the lack of study on a species in which the development of the work has as main objective the identification of an evaluation of the biological activity present in the chemical constituents. For the study of the species with obtained crude extracts for leaf and stem, use as solvent. Subsequently the crude extracts were fractionated with solvents of increasing polarity to obtain the remaining hexane, chloroform, ethyl acetate and hydroalcoholic fractions. Doses of polyphenols and total flavonoids were made. As biological activities performed the toxicity to *Artemia salina*, hemolytic activity and antioxidant activity (DPPH, phosphomolybdenum complex). It was isolated a triterpene identified as Friedelina of the hexane fraction of the stem, studies carried out indicate significant analgesic activity of this substance, and of the chloroform fraction of leaves was isolated a flavonoid identified as Tricin, evaluated as the major compound of the raw extract of the leaves. None of the fractions from the crude extracts caused toxicity to the microcrack *Artemia salina*. In the hemolytic activity, the hexane fraction of the stem, at concentrations of 500, 800 and 1000 µg /mL, caused a mean hemolysis of 60% in relation to the control. In the antioxidant activity by the DPPH method, a ethyl acetate fraction of the stem was the one that presented the best activity, with IC<sub>50</sub> of 21 µg/mL, phosphomolybdenum complex the chloroform fraction for both leaf and stem respectively expressed 18.23% and 41.08% compared to vitamin C control. It is concluded that the species *Chusquea pinifolia* requires further studies to verify its pharmacological activities since the results demonstrate low toxicity and good antioxidant activity in the analyzed models.

Keywords: Friedelina. Tricin. *Artemia salina*. Hemolysis. Fossomolybdenum complex.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ESPÉCIES DE BAMBUS NO GLOBO. .....	18
FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO DO GÊNERO <i>Chusquea</i> NAS AMÉRICAS.....	19
FIGURA 3 -DISTRIBUIÇÃO DO GÊNERO <i>Chusquea</i> NO BRASIL.....	20
FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE <i>Chusquea pinifolia</i> NO BRASIL.....	22
FIGURA 5 - EXSICATA DE <i>Chusquea pinifolia</i> .....	24
FIGURA 6 - POSIÇÃO GEOGRÁFICA PICO CARATUVA.....	25
FIGUARA 7 - FLUXOGRAMA DOS ESTUDOS FITOQUÍMICOS E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PARTES AÉREAS (FOLHAS E CAULE) DE <i>Chusquea pinifolia</i> .....	26
FIGURA 8 - SECAGEM, ESTABILIZAÇÃO E TRITURAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL ( <i>Chusquea pinifolia</i> ).....	27
FIGURA 9 - ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H DO ISOLADO FH-5. ....	52
FIGURA 10 - ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DO ISOLADO FH-5. ....	52
FIGURA 11 - ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C (REGIÃO AMPLIADA) DO ISOLADO FH-5. ....	52
FIGURA 12 - ESTRUTURA QUÍMICA DO 3-OXO-FRIEDELANO.....	53
FIGURA 13 - ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H DO ISOLADO FCL-157. ....	54
FIGURA 14 – ESPECTRO DE RMM <sup>13</sup> C DO ISOLADO FCL-157. ....	55
FIGURA 15 - ESTRUTURA QUÍMICA DA 5,7 DIIDROXIFLAVONA.....	55
FIGURA 16 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DA ESPECIE VEGETAL <i>Chusquea pinifolia</i> .....	57
FIGURA 17 - CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DO CAULE DA ESPECIE VEGETAL <i>Chusquea pinifolia</i> .....	58
FIGURA 18 – CROMATOGRAMA DA SUBSTÂNCIA ISOLADA FCL-157. ....	59

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - RESULTADOS DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA FRENTE AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DA ESPÉCIE <i>Chusquea pinifolia</i> . .....	63
GRÁFICO 2 - RESULTADOS DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA FRENTE AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DA ESPÉCIE <i>Chusquea pinifolia</i> . .....	65
GRÁFICO 3 - CURVA PADRÃO DA VITAMINA C PELA REDUÇÃO DO DPPH. ....	66
GRÁFICO 4 - CURVA PADRÃO DA RUTINA PELA REDUÇÃO DO DPPH. ....	66
GRÁFICO 5 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>Chusquea pinifolia</i> DO EXTRATO BRUTO DO CAULE PELA REDUÇÃO DO DPPH. ....	67
GRÁFICO 6 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>Chusquea pinifolia</i> DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DO CAULE PELA REDUÇÃO DO DPPH. ....	67
GRÁFICO 7 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>Chusquea pinifolia</i> DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO CAULE PELA REDUÇÃO DO DPPH. ....	68
GRÁFICO 8 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>Chusquea pinifolia</i> DA FRAÇÃO HIDROALCÓLICA DO CAULE PELA REDUÇÃO DO DPPH. ....	68
GRÁFICO 9 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>Chusquea pinifolia</i> DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS PELA REDUÇÃO DO DPPH. ....	69
GRÁFICO 10 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>Chusquea pinifolia</i> DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DAS FOLHAS PELA REDUÇÃO DO DPPH. ....	69
GRÁFICO 11 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>Chusquea pinifolia</i> DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS PELA REDUÇÃO DO DPPH. ....	70
GRÁFICO 12 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>Chusquea pinifolia</i> DA FRAÇÃO HIDROALCÓLICA DAS FOLHAS PELA REDUÇÃO DO DPPH. ....	70

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE <i>Chusquea pinifolia</i> .....	21
TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO DOS TERPENOS ENCONTRADOS NAS PLANTAS.....	22
TABELA 3 - TEOR DE CINZAS E UMIDADE.....	46
TABELA 4 - TESTES FÍSICO-QUÍMICOS DO EXTRATO BRUTO.....	47
TABELA 5 - ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DE <i>Chusquea pinifolia</i> . 47	
TABELA 6 - ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO 20% DE <i>Chusquea pinifolia</i> .....	48
TABELA 7 - RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES DO CAULE EXTRAÍDOS POR SOXHLET MODIFICADO.....	49
TABELA 8 - RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS EXTRAÍDOS POR SOXHLET MODIFICADO.....	49
TABELA 9 - DADOS RMN <sup>13</sup> C PARA (FH-5) 3-OXO-FRIEDELANO, COMPARADO COM DADOS DA LITERATURA.....	51
TABELA 10 - DADOS RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C PARA (FCL-157) 5,7 DIIDROXIFLAVONA, COMPARADO COM DADOS DA LITERATURA.....	54
TABELA 11 - TEOR DE POLIFENÓIS E FLAVONOÍDES TOTAIS DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE FOLHA E CAULE de <i>Chusquea pinifolia</i> .....	60
TABELA 12 - ENSAIO DE MORTALIDADE DE <i>Artemia salina</i> E DL50 FRENTE A EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE <i>Chusquea pinifolia</i> .....	61
TABELA 13 - ENSAIO DE MORTALIDADE DE <i>Artemia salina</i> E DL50 FRENTE A EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE <i>Chusquea pinifolia</i> .....	61
TABELA 14 - ENSAIO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DA ESPÉCIE <i>Chusquea pinifolia</i> .....	62
TABELA 15 - ENSAIO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DA ESPÉCIE <i>Chusquea pinifolia</i> .....	64
TABELA 16 – RESULTADOS IC50 E TUKEY DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS E DO CAULE DA ESPÉCIE <i>Chusquea pinifolia</i> .....	71
TABELA 17 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DA ESPÉCIE <i>Chusquea pinifolia</i> .....	72
TABELA 18 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DA ESPÉCIE <i>Chusquea pinifolia</i> .....	73

**LISTA DE SIGLAS**

AA%	–	Atividade Antioxidante
ARR%	–	Atividade Antioxidante Relativa
BHT	–	Butilhidroxidotolueno
CCD	–	Cromatografia de Camada Delgada
CLAE	–	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	–	Detector de Arranjo de Diodo
DMAPP	–	Dimetil-alil-difosfato
DMSO	–	Dimetil Sulfóxido
DPPH	–	2,2-difenil-1-picrihidrazila
HPLC	–	<i>High Performace Liquid Cromatography</i>
IPP	–	Isopentil-difosfato
PBS	–	Salina Tamponada com Fosfato
RMN <sup>13</sup> C	–	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono - 13
RMN <sup>1</sup> H	–	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
UV	–	Ultra Violeta
d	–	Dubleto
sl	–	Singleto Largo
<i>J</i>	–	Constante de Acoplamento
MEP	–	Metil eritritol - fosfato

**LISTA DE SIMBOLOS**

%	–	Por cento
µg	–	Micrograma
µL	–	Microlitro
g	–	Gramma
mL	–	Mililitro
°C	–	Graus Celsius
M	–	Molar
mg/mL	–	Miligramma por mililitro
N	–	Normal
nm	–	Nanômetro
m	–	Metro
cm	–	Centímetro
µg/mL	–	Micrograma por mililitro
DL <sub>50</sub>	–	Dose letal média
IC <sub>50</sub>	–	Concentração inibitória média
v/v	–	Volume/volume
HCl	–	Ácido clorídrico
NaOH	–	Hidróxido de sódio
NH <sub>4</sub> OH	–	Hidróxido de amônio
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	–	Ácido sulfúrico
pH	–	Potencial hidrogeniônico
KCl	–	Cloreto de potássio

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
1.1. OBJETIVO GERAL .....	16
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	17
2.1. FAMÍLIA Poaceae .....	17
2.2. GÊNERO <i>Chusquea</i> .....	19
2.3. ESPÉCIE <i>Chusquea pinifolia</i> Ness (Ness) .....	21
2.4. TERPENOS .....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
3.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL .....	24
3.2. FLUXOGRAMA DO METODO .....	25
3.3. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS .....	26
3.3.1. Secagem do Material Botânico e estabilização .....	26
3.3.2. Determinação de Cinzas Totais .....	27
3.3.3. Determinação de perda por Dessecação – Umidade .....	28
3.4. SCREENING FITOQUÍMICO .....	28
3.4.1. Preparo de extrato hidroalcoólico 20% .....	28
3.4.1.1. Pesquisa de Flavonóides .....	29
3.4.1.2. Pesquisa de alcaloides .....	31
3.4.1.3. Pesquisa de cumarinas .....	31
3.4.1.4. Pesquisa de antraquinonas e naftoquinonas .....	32
3.4.1.5. Pesquisa de esteróis e triterpenos .....	33
3.4.2. Preparo do extrato aquoso 20% .....	34
3.4.2.1. Pesquisa de antocianinas .....	34
3.4.2.2. Pesquisa de heterosídeos saponínicos .....	34
3.4.2.3. Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos .....	35
3.4.2.4. Pesquisa de taninos .....	35
3.4.2.5. Pesquisa de amino grupos .....	36
3.4.2.6. Pesquisa de ácidos fixos .....	36
3.4.2.7. Pesquisa de ácidos voláteis .....	37
3.5. OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES .....	37
3.5.1. Extrato bruto etanólico .....	37

3.5.1.1. Determinação de cor, pH e teor de sólidos .....	38
3.5.2. Partição dos extratos brutos etanólicos.....	38
3.6. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS.....	38
3.6.1. Isolamento do constituinte químico da fração hexano do caule .....	38
3.6.2. Isolamento do constituinte químico da fração clorofórmio das folhas .....	39
3.6.3. Caracterização dos constituintes químicos isolados .....	40
3.7. ANÁLISE POR CLAE/DAD .....	40
3.8. DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS .....	40
3.9. DOSEAMENTOS DE FLAVONOIDES TOTAIS .....	41
3.10. ATIVIDADES BIOLÓGICAS .....	41
3.10.1. Teste Toxicidade <i>Artemia salina</i> .....	41
3.10.2. Avaliação Hemolítica <i>in vitro</i> .....	42
3.11. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>in vitro</i> .....	43
3.11.1.1. Redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina).....	43
3.11.1.2. Formação do complexo fosfomolibdênio .....	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO .....	46
4.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE E CINZAS TOTAIS .....	46
4.3. PARAMETROS FISICO-QUÍMICOS DO EXTRATO BRUTO .....	46
4.4. ESTUDO FITOQUÍMICO PRELIMINAR .....	47
4.4.1. Análise fitoquímica do extrato aquoso 20%.....	47
4.4.2. Análise fitoquímica do extrato etanólico 20% .....	48
4.5. PARTIÇÃO DAS FRAÇÕES .....	49
4.6. CARACTERIZAÇÃO E ISOLAMENTO DO CONSTITUINTE QUÍMICO ISOLADO.....	50
4.6.1. Composto FH-5 .....	50
4.6.2. Composto FCL-157 .....	53
4.7. ANÁLISE DA ESPÉCIE VEGETAL <i>Chusquea pinifolia</i> por CLAE/DAD .....	56
4.8. DOSEAMENTO FLAVONOIDES TOTAIS E POLIFENÓIS .....	59
4.9. ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	60
4.9.1. Avaliação da toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> .....	60
4.9.2. Atividade hemolítica .....	61
4.10. ATIVIDADES ANTIOXIDANTES .....	65
4.10.1. Redução do radical DPPH.....	65

4.10.2. Formação do Complexo Fosfomolibdênio .....	71
5. CONCLUSÃO .....	74
REFERÊNCIAS .....	76



## 1. INTRODUÇÃO

O homem utiliza as espécies vegetais desde os primórdios da civilização, como vestuário, fonte de alimentos, matéria-prima e para a produção de meios de transporte. Dentre essas diversas fontes alternativas sabe-se que os insumos de origem vegetal participam da existência da sociedade, tendo como principal vantagem o fato de representar uma fonte de recursos renováveis (SIMÕES, 2000).

Historicamente os tratamentos farmacológicos de doenças iniciaram-se com o uso de plantas medicinais, utilizadas como matéria-prima para produção de medicamentos, métodos populares de cura começaram a ser praticados pelos povos da região do Mediterrâneo e do Oriente (SCHULS, 2002).

As plantas são constituídas por inúmeras moléculas do metabolismo secundário as quais representam os produtos de origem natural, estas substâncias podem ser tão eficazes quanto os produtos produzidos pela síntese química (MACIEL et al., 2002).

As espécies de bambus encontram-se distribuídas entre às famílias Poaceae e Bambusoideae conhecidas popularmente pela extensa aplicação no cotidiano humano. Muitas destas espécies são adaptadas às florestas sombrias, considerado alimento exclusivo de mamíferos como o Panda gigante cujo habitat natural localiza-se no centro sul da China (JUDZIEWICZ et al, 1999).

Do ponto de vista econômico a família Poaceae é a principal família das angiospermas, que se justifica pela importância de determinadas espécies como fonte de alimentação por diversos povos do mundo, incluindo o arroz (*Oryza sativa*), o trigo (*Triticum aestivum*), o milho (*Zea mays*), o centeio (*Secale cereale*) e a cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (SOUZA, 2007).

Devido à produção em massa desses cereais como o milho e cana-de-açúcar, que apresentam grande impacto socioeconômico, caracterizam-se como várias formas de uso, servindo como principais insumos para formulação de rações utilizadas para criação animal, e constituem a matéria prima para diversos produtos industrializados de alta tecnologia (URQUIAGA et al., 1991; CRUZ et al., 2008).

O Brasil possui maior diversidade de bambus do ocidente, classificadas com 155 espécies pertencentes a 18 gêneros que estão presentes em maior quantidade nas Florestas Atlântica e Amazônica. Diversos bambus das Américas só foram apresentados pela ciência na geração passada. Grandes áreas da Amazônia

permanecem inexploradas e várias espécies de bambus ainda não foram descritas. (FILGUEIRAS e SANTOS-GONÇALVES, 2004).

Segundo Safford (1999a) os campos de altitude compreendem o diversificado Bioma Mata Atlântica e estão presentes na parte mais alta da Serra do Mar nos estados do Paraná, Santa Catarina, Rio de Janeiro e São Paulo. Sua composição florística assemelha-se a estepe gramíneo-lenhosa e à do componente herbário da savana (TRAMUJAS, 2000).

Sendo assim, a espécie vegetal *Chusquea pinifolia* é encontrada na Floresta Atlântica em campos de altitude, local de difícil acesso. Devido à escassez de estudos fitoquímicos, e das atividades biológicas da espécie justifica-se o estudo para possível elucidação de metabólitos de interesse.

### 1.1. OBJETIVO GERAL

Realizar estudo fitoquímico, atividades biológicas e propriedades antioxidantes das partes aéreas da espécie vegetal *Chusquea pinifolia* (NESS) (POACEAE).

### 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Solicitar autorização de pesquisa e coleta no CEGEN;
- Realizar levantamento de literatura;
- Realizar a coleta e a identificação por exsicata da espécie vegetal;
- Realizar os ensaios físico-químicos da droga vegetal;
- Obtenção do extrato vegetal por aparato de Soxhlet;
- Realizar screening fitoquímico;
- Realizar isolamento e identificação de constituintes químicos;
- Verificar perfil cromatográfico por CLAE/DAD;
- Realizar doseamento de flavonoides e polifenóis totais;
- Realizar estudo de toxicidade in vitro;
- Realizar atividade hemolítica;
- Realizar estudo de atividade antioxidante;

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. FAMÍLIA Poaceae

A família Poaceae é largamente distribuída em todo mundo e agrega uma grande variedade de espécies vegetais já descritas. Possui cerca de 750 gêneros e 10.000 espécies (GONZÁLES et al., 2011), que se encontram desde o nível do mar até ambiente alto de montanha a 5.000 metros de altitude, sendo que no Brasil, Filgueiras et al. (2010) registram 1438 classificadas em 218 gêneros.

Os exemplares da família Poaceae predominam em formações campestres, sendo menos comuns no interior das florestas. Com significativa importância ecológica e econômica desta família predomina-se a dominância em vários ecossistemas vegetais, é comumente utilizada na alimentação dos animais e como cereais no regime alimentar do homem (WELKER, 2007).

Conforme Clayton e Renvoize (1986) existem três temas recorrentes nesta família que inclui constantemente capacidade de adaptação a vários tipos de ambientes, a capacidade de coexistir com variadas formas de animais, e a possibilidade de uma forma de vida distinta.

Os bambusnativos, endêmicos de cada região, crescem naturalmente em todos os continentes, exceto na Europa (FILGUEIRAS e SANTOS-GONÇALVES, 2004). Estão amplamente distribuídos nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do globo conforme pode ser visulizado na FIGURA 1.

FIGURA 1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ESPÉCIES DE BAMBUS NO GLOBO.



FONTE: TERRA (2007).

Por conseguinte, gêneros da família Poaceae, possuem o mecanismo C4 assimilação fotossintética (WATSON e DALLWITZ, 1992). Em plantas C4 foto-respiração é inibido por uma concentração mais elevada gás carbônico em torno da enzima de fixação de carbono, a Rubisco, que também facilita a assimilação de carbono com menos uso de água (DOWNES, 1969).

A família Poaceae também representada como plantas de cultivo de cereais, os membros mais importantes da Poaceae, fornecem a maior parte da ingestão calórica do mundo (FAO, 2005). Arroz e trigo são os dois cereais mais importantes para consumo humano direto, no entanto milho, trigo e arroz, juntos responderam por 87% de toda a produção de grãos em todo o mundo e 43% de todas as calorias dos alimentos mais de uma década atrás (DYSON, 1996). Os representantes desta família produzem fitoalexinas que são em grande parte diterpenóides. O passo comprometido na biossíntese de diterpeno labdano-relacionada é catalisada por labdadienyl / copalyl sintase difosfato, a CPS (WU et al., 2012).

Estudos fitoquímicos desenvolvidos por Gomes et al. (2011), feitos com extratos de *Cymbopogon citratus* (Poaceae) conhecida como capim santo revelou a presença de taninos, alcaloides e flavonoides como, flavonas e flavonóis. Saleh et al. (1988) desvendaram os flavonoides em 25 das quase 30 espécies de Avena (Poaceae), identificando sinais de correlação entre os diferentes grupos químicos e os níveis de ploidia entre elas.

Segundo Negrelle e Gomes (2007) *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (Cy), Poaceae-Gramineae, vulgarmente conhecida como erva-cidreira, é uma gramínea perene espontânea, amplamente distribuída em todo o mundo, especialmente em países com climas tropicais e subtropicais. Sua folha de citral possui óleo essencial que é utilizado nas indústrias de alimentos, perfumaria, sabão, cosméticos, farmacêutico e inseticida.

## 2.2. GÊNERO *Chusquea*

Segundo Rodriguez (2005), a taquara do gênero *Chusquea* sp., pertencente à família Poaceae onde estão presentes rizomas, colmos lenhosos sólidos, 0,5 a 20 metros de altura, 0,3 a 7 cm de diâmetro e são perenes. Existem cerca de 200 espécies na América Central e do Sul, sendo elas mais de 50 espécies no Brasil, frequentemente encontrados em florestas serranas. Conforme Judziewicz (1999) os bambus americanos são muito diversificados na Floresta Atlântica, sendo que o gênero *Chusquea* o mais diverso, com a mais ampla distribuição. Conforme pode ser visualizado na FIGURA 2 o gênero é distribuído nas Américas.

FIGURA 2 - DISTRIBUIÇÃO DO GÊNERO *Chusquea* NAS AMÉRICAS.



FONTE: FLORA DO BRASIL 2020 UNDER CONSTRUCTION (2018).

No Brasil encontram-se distribuídas predominantemente na região sul, sudeste e nordeste, conforme FIGURA 3.

FIGURA 3 - DISTRIBUIÇÃO DO GÊNERO *Chusquea* NO BRASIL.

FONTE: FLORA DO BRASIL 2020 UNDER CONSTRUCTION (2018).

Existem seis gêneros (com 129 espécies) endêmicos dentre os bambus lenhosos, destacando-se os gêneros: *Merostachys*, com 53 espécies; *Chusquea*, com 40 espécies; e *Guadua*, com 16 espécies (FILGUEIRAS e GONÇALVES, 2004).

A grande maioria dos táxons da subfamília *Bambusoideae* e muitas gramíneas basais são nativas da América tropical e subtropical, que normalmente dependem de umidade, sombra, e temperaturas quentes (CALDERÓN ESODERSTROM, 1980). No entanto, *Chusquea*, o gênero de bambu mais diverso, também abrangente desde o nível do mar até 4000 mil metros de altitude e é a mais diversa e abundante em floresta montana dos Andes (CLARK, 1997).

Estudos realizados nas florestas temperadas da América do Sul por Muñoz (2012) revelaram que o bambusea *Chusqueaculeou* (colihue) é a espécie dominante no sub-bosque, onde a floração e morte podem criar uma oportunidade para o estabelecimento e crescimento da regeneração da árvore, especialmente em clareiras, Rodriguez (2005) reporta o gênero americano *Chusquea*, como o mais diverso no mundo, sendo as mais conhecidas: *Chusquea anclytroides*, *Chusquea bilimekii* e *Chusquea caparaoensis*.

Sabe-se que bambus *Chusquea* são espécies-chave em florestas temperadas do Chile e do Sul da Argentina, principalmente devido à sua posição dominante no

sub-bosque da floresta, sua importância como combustível e sua capacidade de inibir a regeneração da árvore e de outras espécies lenhosas (VEBLEN, 1982).

### 2.3. ESPÉCIE *Chusquea pinifolia* Ness (Ness)

A espécie *Chusquea pinifolia* é de origem nativa e endêmica do Brasil, sua distribuição geográfica situa-se na região sul e sudeste com ocorrência nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná. O domínio fitogeográfico presente no Cerrado e Floresta Atlântica predominantemente nos tipos de vegetação como Campo de Altitude, Campo Rupestre, Floresta Ciliar e Floresta Ombrófila (SHIRAZUNA et al, 2015).

A espécie constitui a organização taxonômica descrita na Tabela 1.

TABELA 1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE *Chusquea pinifolia*

HIERARQUIA	TAXONÔMICA
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Subclasse	Commelinidae
Ordem	Poales
Família	Poaceae
Subfamília	Bambusoideae
Gênero	<i>Chusquea</i>
Espécie	<i>Chusquea pinifolia</i>

FONTE: KUNTH (1822).

A FIGURA 4 demonstra a maior predominância da espécie *Chusquea pinifolia* nos estados do Mato Grosso, Rio de Janeiro e São Paulo.

FIGURA 4 - DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE *Chusquea pinifolia* NO BRASIL

FONTE: FLORA DO BRASIL 2020 UNDER CONSTRUCTION (2018).

## 2.4. TERPENOS

Os terpenos ou terpenóides apresentam a maior classe de hidrocarbonetos naturais do metabolismo secundário, biossintetizados a partir da via clássica do Ácido Mevalônico conforme TABELA 2 (DEWICK, 2009). A formação do ácido mevalônico ocorre no citoplasma por reações de condensação de 3 moléculas de acetil-Coa com atuação das enzimas acetil-CoA aciltransferases, seguido por reações de piro-fosforilação, descarboxilação e desidratação resulta na molécula de isopentenil-difosfato (IPP) que por sua vez dá origem também ao isômero dimetilalildifosfato (DMAPP) (LÜCKER et al., 2007).

TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO DOS TERPENOS ENCONTRADOS NAS PLANTAS.

ISOPRENOS	ÁTOMOS DE CARBONO	NOME	EXEMPLOS
1	5	ISOPRENO	CADEIA LATERAL DAS CITOCININAS
2	10	MONOTERPENO	PIRETRÓIDES E ÓLEOS ESSENCIAIS
3	15	SESQUITERPENO	ABA, LACTONAS
4	20	DITERPENO	GIBERILINAS, TAXOL
6	30	TRITERPENO	ESTERÓIDES, SAPONINAS
8	40	TETRATERPENO	CAROTENÓIDES



FONTE: PERES (2004).

O DMAPP também pode ser sintetizado pela rota metil eritritol – fosfato (MEP) que ocorre nos cloroplastos. Na rota MEP ocorre reação de condensação entre uma molécula de gliceraldeído -3-fosfato e piruvato que origina o DMAPP que é convertido para seu isômero IPP (DEWICK, 2009).

Os isômeros IPP e DMAPP que são precursores da rota dos terpenos contêm 5 carbonos (C5) sendo conhecidos como hemiterpenos dão origem á moléculas maiores por meio de reações de condensação sendo elas os monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos ( C40) (BASER e DEMIRCI, 2007; DEWICK, 2009).

Representados por uma grande atividade biológica os triterpenos apresentam propriedades medicinais como anti-inflamatórios, bacterianas, antivirais, analgésicas, fungicidas, antitumorais, hepatoprotetores, cardiotônicos, sedativos e tônicos (CONNOLLY e HILL, 2007).

Caracterizados por sabor amargo os limonóides são triterpenos que atuam contra herbívoros. A formação dos esteroides se dá pelos triterpenos que participam da formação das membranas celulares das plantas. A ecdisona é um esteroide de atividade protetora contra insetos (GARCÍA e CARRIL, 2009).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. COLETA DO MATERIAL VEGETAL

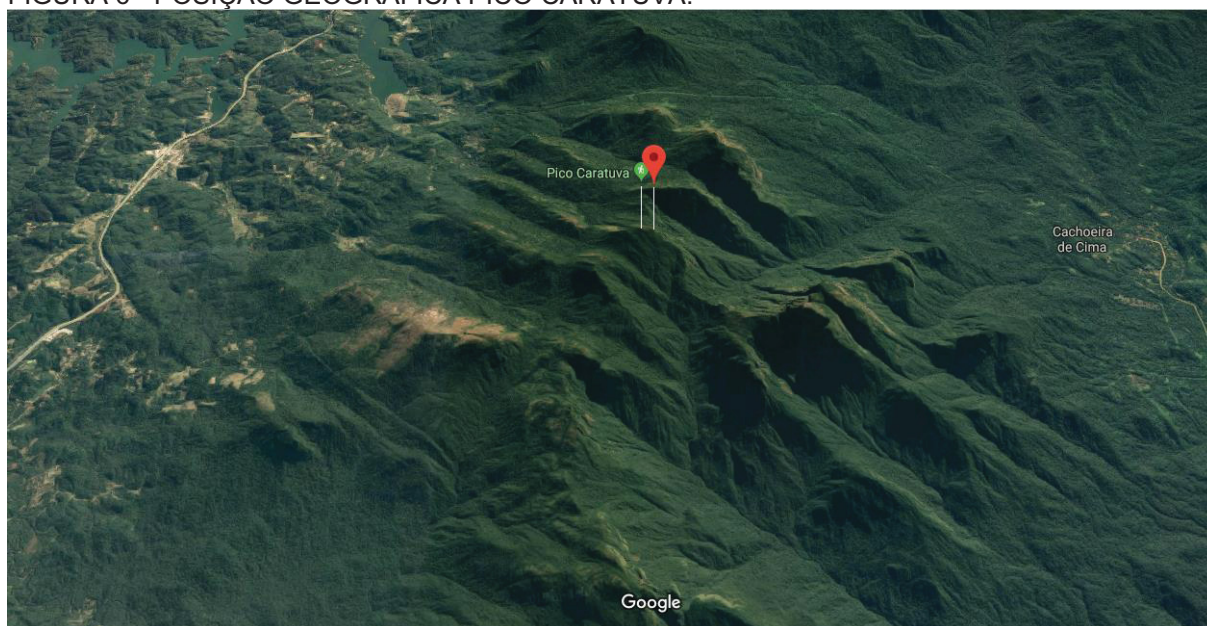
A espécie *Chusquea pinifolia* foi coletada com autorização de pesquisa do CGEN, sob n° do processo: 02001.001165/2013-47 no dia 13 (treze) de março de 2016. A coleta foi realizada na segunda montanha mais alta do Sul do Brasil, o Pico Caratuva, com altitude de 1860m, localizada no Conjunto de Montanhas Ibitiraquire entre os municípios de Antonina e Campina Grande do Sul - Paraná, nas imediações e coordenadas 25° 26'S e 49° 14'W (FIGURA 6). A identificação da espécie vegetal foi realizada por comparação pelo Biólogo e Curador do Museu Botânico Municipal de Curitiba José Tadeu Weidlich Motta sob o número MBM 385941 (FIGURA 5).

FIGURA 5 - EXSICATA DE *Chusquea pinifolia*.



FONTE: O autor (2018).

FIGURA 6 - POSIÇÃO GEOGRÁFICA PICO CARATUVA.

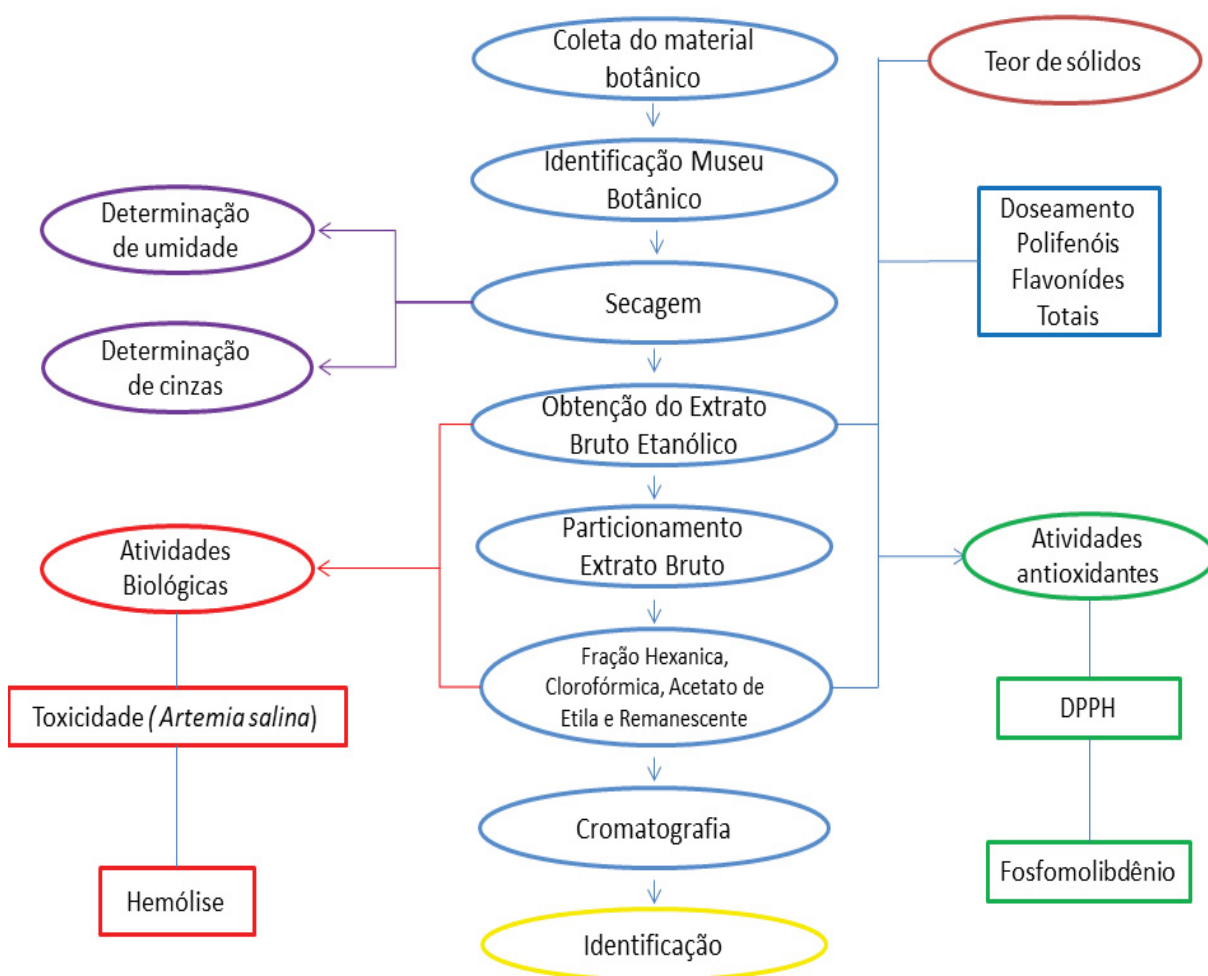


FONTE: Google Maps (2018).

### 3.2. FLUXOGRAMA DO METODO

O trabalho foi realizado segundo o fluxograma (FIGURA 7) e realizado segundo as metodologias descritas nos itens a seguir.

FIGURA 7 - FLUXOGRAMA DOS ESTUDOS FITOQUÍMICOS E DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE PARTES AÉREAS (FOLHAS E CAULE) DE *Chusquea pinifolia*.



FONTE: O autor (2018).

### 3.3. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

#### 3.3.1. Secagem do Material Botânico e estabilização

As partes coletadas foram caules e folhas, submetidos à dessecação em temperatura ambiente em local fresco e arejado, protegidas de raios solares e umidade por duas semanas e posteriormente estabilização por 48 horas em estufa com circulação de ar forçada à 40°C. O seccionamento foi realizado em moinho de facas e martelos conforme FIGURA 8 com o objetivo de aumentar a superfície de contato do solvente com a planta durante a extração (SONAGLIO et al., 1999).

FIGURA 8 - SECAGEM, ESTABILIZAÇÃO E TRITURAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL (*Chusquea pinifolia*).



FONTE: O autor (2018).

### 3.3.2. Determinação de Cinzas Totais

O ensaio para a determinação de cinzas totais foi realizado de acordo com a Farmacopéia Brasileira V edição (BRASIL, 2010) e teve como objetivo estabelecer a quantidade de substâncias residuais não voláteis no processo de incineração. Foram utilizadas como amostras as partes aéreas de *Chusquea pinifolia* divididas em caule e folhas. O material foi incinerado em mufla a 600°C durante 6 horas, até eliminação total do carvão, em triplicata. Após a incineração, os cadinhos foram esfriados em dessecador, seguidos da pesagem do resíduo presente e efetuados os cálculos em porcentagem de cinzas em relação ao material vegetal original, por meio da fórmula (1).

$$\% \text{ de cinzas} = \frac{P_2 - P_1}{P_3} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

P<sub>1</sub> = Peso do cadinho após a calcinação e esfriamento.

P<sub>2</sub> = Peso do cadinho com amostra após a calcinação e esfriamento em dessecador.

P<sub>3</sub> = Peso da amostra inicial.

### 3.3.3. Determinação de perda por Dessecação – Umidade

A umidade das partes aéreas de *Chusquea pinifolia* foi determinada por meio do método gravimétrico (BRASIL, 2010). O ensaio foi realizado em triplicata, utilizando amostras do caule e das folhas. O material vegetal foi submetido à temperatura de 100-105°C até que se observou peso constante, não diferindo por mais de 5 mg entre duas pesagens. O resultado foi representado pela porcentagem de água em relação ao material vegetal seco, por meio da fórmula (2).

$$\% \text{ de umidade} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

P<sub>u</sub> = peso do cadinho contendo a amostra antes da dessecação.

P<sub>s</sub> = peso do cadinho contendo a amostra após a dessecação.

P<sub>a</sub> = peso da amostra.

## 3.4. SCREENING FITOQUÍMICO

São realizados ensaios que utilizam reações de coloração e/ou precipitação para mostrar as características qualitativas dos principais grupos químicos dos componentes ativos da droga vegetal, tendo como compostos pesquisados no extrato hidroalcoólico: flavonoides, alcaloides, esteroides e/ou triterpenos, cumarinas, iridoides e antraquinonas.

O ensaio sistemático de análise fitoquímica foi realizado de acordo com Moreira (1979), com adaptações realizadas por Miguel (2003), pelo método de maceração a quente, partindo de um extrato hidroalcoólico a 20% do vegetal em estudo. Além dos testes realizados a partir do extrato aquoso a 20%, foi preparado um extrato hidroalcoólico tendo em vista analisar as partes aéreas (caule e folha) juntas. A partir do extrato foi verificado pH, teor de sólidos, cor, odor e sabor.

### 3.4.1. Preparo de extrato hidroalcoólico 20%

Foram pesados 40 g das partes aéreas da planta fragmentada submetendo-se a maceração em 200 mL de álcool etílico a 70% em banho-maria a 70° C por 1 hora. Após, o macerado foi filtrado em papel de filtro e lavado com o líquido extrator até completar o volume de 200 mL.

Em seguida, foi feita a partição do extrato hidroalcoólico com solventes de polaridade crescente. Dessa forma, os solventes utilizados foram o hexano, clorofórmio e acetato de etila, os quais serviram para orientar, por solubilidade, os grupos químicos a serem pesquisados.

Assim, foi concentrado o extrato hidroalcoólico até adquirir 1/3 do seu volume para retirar o excesso de álcool etílico, posteriormente foi colocado o extrato em um funil de separação para dar sequência ao particionamento. Foram adicionados 20 mL do primeiro solvente separando-os, após agitação, a fração dissolvida no mesmo. Esse procedimento foi repetido por 10 vezes com os demais solventes até chegar a 4 frações de 200 mL cada. Assim, foram obtidas as frações: hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente. Até que todos os ensaios sejam realizados as frações foram mantidas refrigeradas.

#### 3.4.1.1. Pesquisa de Flavonóides

Esta pesquisa baseia-se na modificação da estrutura do flavonoide em presença de ácido, como na reação de Shinoda ou cianidina, com HCl concentrado e magnésio em pó. Com essa reação pode-se caracterizar compostos contendo um núcleo  $\alpha$ -benzopirona, pelo desenvolvimento de cor laranja a vermelha.

Foram levadas à secura em banho-maria 10 mL das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila. Para a fração hidroalcoólica não há necessidade de secar. Foram adicionados 10 mL de etanol nas cápsulas com resíduo seco e transferido 5 mL para cada tubo de ensaio, inclusive 5 mL da fração hidroalcoólica. A cada tubo de ensaio foram adicionados 200 mg de limalha e ácido clorídrico fumegante (lentamente) com ocorrência de reação exotérmica (esta pesquisa foi realizada com os tubos de ensaio dentro de um copo de béquer com gelo, dentro da capela).

A reação positiva desenvolve coloração conforme as estruturas químicas presentes: flavonas com coloração amarela a vermelho; flavonol e dihidroflavonol com coloração vermelho a vermelho sangue; flavononas com coloração vermelha a

violeta; derivados antociânicos com coloração vermelha tornando-se rosa e chalconas, auronas, dihidrochalconas, isoflavonas e isoflavononas não apresentam coloração.

- Teste do oxálico bórico ou reação de Taubock

Levou-se à secura em banho-maria 10 mL de cada fração. Ao resíduo foi adicionado 5 gotas de acetona e 30 mg de ácido bórico misturado com ácido oxálico na proporção 1:1, agitando-o e levando-o novamente à secura. Ao resíduo foi adicionado 5 mL de éter etílico e transferido os respectivos resíduos para tubos de ensaio para verificação de fluorescência.

Esta reação é explicada pela formação de quelatos, que nos flavonoides, desenvolvem o aparecimento de fluorescência amarela esverdeada, enquanto que as flavonas e isoflavonas não apresentam esta propriedade. Os antociânicos coram-se, porém não produzem fluorescência.

- Ensaio de Pacheco

Levou-se à secura em banho-maria 10 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica. Foram adicionados alguns cristais de acetato de sódio e 0,1 mL de anidrido acético e foi aquecido em fogareiro. Em seguida, foi adicionado 0,1 mL de HCl concentrado.

Os diidroflavonóis produzem um efeito batocrômico das bandas I e II, apresentando uma coloração roxa característica. Enquanto as flavonas, chalconas, auronas e os flavonóis, dão resposta negativa.

- Ensaio com Zn e HCL

Levou-se à secura em banho-maria 10 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila. O resíduo foi dissolvido com 10 mL de etanol, por isso não houve necessidade de secar a fração hidroalcoólica. Transferiu-se para cada tubo de ensaio 5 mL do conteúdo das cápsulas, adicionando-se uma pastilha de zinco lentamente HCl fumegante. Essa reação é exotérmica e foi realizada em copo de becker contendo gelo e sob a capela.



Apenas os diidroflavonóis produzem coloração rocha violeta. As flavononas e flavonol não produzem coloração.

- Pesquisa de leucoantocianidinas

Transferiu-se para cada cápsula de porcelana 10 mL das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila e levou-se à secura. A cápsula com a fração hidroalcoólica não houve necessidade de secar.

Foi dissolvido o resíduo nas cápsulas com 5 mL de álcool etílico e adicionando 5 gotas de HCL concentrado, aquecendo-o.

As leucoantocianidinas são consideradas flavonoides monoméricos 3,4-dióis ou raramente 4-óis. Na reação positiva espera-se observar o desenvolvimento de coloração vermelha.

#### 3.4.1.2. Pesquisa de alcaloides

Esta técnica é baseada na capacidade que os alcaloides possuem quando em estado de sal (extratos ácidos), de combinar-se com o iodo e metais pesados como bismuto, mercúrio, tungstênio, formando precipitados.

Para esta pesquisa utilizou-se os reativos gerais para alcaloides: Mayer (iodo-mercurato de potássio), Dragendorff (iodo-bismutato de potássio) e Bouchardart (iodo-iodeto de potássio).

Levou-se à secura 50 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica, em banho-maria a 70°C. O resíduo foi dissolvido em 1 mL de etanol e 20 mL de ácido clorídrico a 1%. Foram transferidos 2 mL do extrato clorídrico para 5 tubos de ensaio e adicionou-se em cada tubo duas gotas dos reativos gerais para alcaloides, mantendo o quinto tubo como branco.

O aparecimento de precipitado indica reação positiva, sendo este precipitado branco para o reativo de Mayer, cor alaranjado tijolo para o reativo de Dragendorff e alaranjado para o reativo de Bouchardat.

#### 3.4.1.3. Pesquisa de cumarinas

As cumarinas são caracterizadas pela observação sob luz ultravioleta (UV) em 360 nm, já que a maioria possui fluorescência azul brilhante ou verde.

A pesquisa baseia-se na conversão em sal alcalino fluorescente do ácido hidroxí cinâmico, por meio da dissolução das cumarinas em álcali cáustico com clivagem do anel pirrólico e consequente formação do ácido hidroxí cinâmico ou sais de seu ânion. Ao irradiar luz ultravioleta, a forma cis migra para forma trans, que exibe coloração azul ou verde amarelada em poucos minutos.

Neste ensaio foram concentrados 30 mL de cada fração hexano, clorofórmio e acetato de etila, até volume de 5 mL.

Da fração hidroalcoólica foram transferidos 30 mL para uma cápsula de porcelana acidificada com HCl 2N até pH 1. Foi concentrado em banho-maria até volume de 5 mL. Após o esfriamento foi transferido para um funil de separação e foram extraídas 2 vezes com 10 mL de éter etílico. As frações etéreas foram concentradas em banho-maria até volume de 5 mL.

Foi transferido para cada tubo de ensaio 3 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e a etérea, adicionando-se 2 mL de NaOH 1N e esses tubos foram levados a uma câmara de luz ultravioleta em 366 nm, deixando-os expostos por 15 minutos. No caso então de reação positiva observa-se o aparecimento de fluorescência com coloração azul ou verde amarelada.

Além disso, foram marcados, em um papel de filtro, três pontos com manchas de aproximadamente 1cm de diâmetro.

As manchas 1 e 2 foram tratadas com NaOH 1N e, sobre a mancha 1, foi colocada uma moeda, depois foram levadas à câmara de ultravioleta a 365nm, novamente deixando-as em exposição por 15 minutos. A reação é tida como positiva com o desenvolvimento de fluorescência, com coloração azul ou verde amarelada na mancha 2.

#### 3.4.1.4. Pesquisa de antraquinonas e naftoquinonas

Levou-se à fervura 30 mL do extrato alcoólico em um balão, por 15 minutos sob refluxo adicionando-se 5 mL de ácido sulfúrico 10 %. Antes de esfriar, foi filtrado em papel filtro e adicionou-se ao filtrado 30 mL de água destilada. Com um funil de separação, foi separada a fração orgânica das frações hexano, clorofórmio e acetato

de etila. A fração hidroalcoólica foi extraída com 10 mL de éter etílico por duas vezes. As frações foram concentradas até aproximadamente 5 mL e transferidas para um tubo de ensaio, efetuando-se a reação de Bornträger. Ou seja, adicionou-se 5 mL de hidróxido de amônia, agitando lentamente.

O aparecimento de coloração avermelhada indicará a presença de antraquinonas e/ ou naftoquinonas.

#### 3.4.1.5. Pesquisa de esteróis e triterpenos

Foram evaporados 30 mL de cada fração em banho-maria e, com o auxílio de um bastão seco, dissolveu-se com clorofórmio e filtrou-se. Em seguida, foram pipetados 0,1 mL, 0,5 mL e 1,0 mL do extrato clorofórmico de cada fração para 3 tubos de ensaio, completando-os para o volume de 2 mL com clorofórmio. Foi realizada a reação de Libermann Bouchard, em capela, adicionando-se 1,0mL de anidrido acético e 2,0mL de ácido sulfúrico concentrado lentamente.

O desenvolvimento de coloração rósea escura ou azul é um indicativo da presença da função carbonila na posição 3 e duplo enlace em 5, 6. Enquanto que a coloração verde indica função hidroxila na posição 3 e duplo enlace em 5, 6. Quando ocorre o desenvolvimento de coloração amarela, possivelmente existe a presença de metila em C14. A coloração verde demonstra a presença de esteroides e /ou triterpenos.

- Reação de Keller Kelliani

Foram transferidos para 4 tubos de ensaio 2 mL das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila, e hidroalcoólica, em seguida, levou-se à secura. Após, o resíduo foi dissolvido com 2 mL de ácido acético glacial e 0,2mL de solução aquosa de cloreto férrico a 1%. Transferiu-se a mistura cautelosamente para um tubo de ensaio que continha 2 mL de ácido sulfúrico concentrado.

O desenvolvimento de coloração azul ou verde na fase de contato dos dois líquidos ou na fase acética indica reação para desoxiaçúcares. A coloração azul indica a presença de esteroides, enquanto a coloração verde indica a presença de triterpeno.

### 3.4.2. Preparo do extrato aquoso 20%

Preparou-se o extrato aquoso 20% pelo processo de maceração à quente em banho-maria a 70°C por uma hora, utilizando 40 g de material vegetal (caule ou folha) e 200mL de água destilada (líquido extrator). Decorrida uma hora, retirou-se o frasco do banho-maria, filtrou-se o extrato e o volume completado até 200 mL com o líquido extrator, lavando o material.

Este extrato foi submetido aos testes para antocianinas, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogenéticos, taninos, amino grupos, ácidos fixos e ácidos voláteis.

#### 3.4.2.1. Pesquisa de antocianinas

A antocianinas são pigmentos hidrossolúveis presentes nas plantas, com colorações que modificam de acordo com o pH. Com ácidos, as antocianinas reagem formando sais de oxônio corados de vermelho e com bases reagem com hidroxilas fenólicas livres e adquire coloração azul devido à estrutura quinóide.

Para realização deste ensaio, transferiu-se 5 mL do extrato aquoso para três tubos de ensaio, acidificando-se o primeiro tubo com ácido clorídrico 1% (pH aproximadamente 4), alcalinizando-se o segundo tubo com hidróxido de amônio (pH aproximadamente 10) e neutralizando-se o terceiro tubo (pH 7).

O desenvolvimento de coloração avermelhada em meio ácido, azulada em meio alcalino, ou violáceo em meio neutro, indica reação positiva.

#### 3.4.2.2. Pesquisa de heterosídios saponínicos

Foram agitados energicamente com movimentos succionais por cinco minutos os tubos da pesquisa de antocianinas, deixando-os em repouso por trinta minutos. Após agitação e decorrido trinta minutos, mediu-se a altura do anel de espuma formado.

Reação positiva é indicada com desenvolvimento de espuma com altura superior a um centímetro e persistente após o repouso.

As saponinas apresentam estruturas com assimetria hidrófilo-hidrofóbica, fazendo com que haja redução da tensão superficial dos compostos em solução aquosa, com conseqüente formação de espuma mediante agitação (ROBBERS et al.,1997).

#### 3.4.2.3. Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos

Os heterosídeos cianogenéticos produzem ácido cianídrico nas plantas e são acompanhados por enzimas (b-glicosidases) responsáveis pela catálise da hidrólise (ROBBERS et al.,1997).

Para este ensaio utilizou-se a reação do isopurpurato de sódio, que ocorre na transferência para um tubo de ensaio de 5 mL de extrato aquoso (cuidando-se para não umedecer as paredes do tubo de ensaio), com a adição de 1 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico 1N, suspensão de uma tira de papel picro-sódico no tubo e encaminhamento ao banho-maria por trinta minutos à 60°C.

Reação positiva é observada com a formação de isopurpurato de sódio que apresenta coloração castanha a avermelhada.

O papel picro-sódico é preparado embebendo tiras de papel de filtro com 1 cm de largura em solução de ácido pícrico 1% e secando-as ao abrigo da luz. As tiras pícricas secas são embebidas em solução de carbonato de sódio 10%, secas e armazenadas em frasco âmbar.

#### 3.4.2.4. Pesquisa de taninos

Os taninos são divididos em duas classes considerando os núcleos fenólicos existentes e na união destes. Os taninos hidrolisáveis apresentam ácido gálico ou ácido hexaidroxidifênico com seus derivados esterificados com glicose. Estes ésteres são facilmente hidrolisados em ácidos fenólicos e açúcar (ROBBERS et al.,1997).

Os taninos condensados contêm núcleos fenólicos que muitas vezes estão ligados a carboidratos ou a proteínas, sendo em sua maioria resultantes da condensação de dois flavan-3-óis, ou mais (catequina) ou de flavan-3,4-dióis (leucocianidina) (ROBBERS et al.,1997).

Para a pesquisa de taninos adicionou-se três a cinco gotas de solução aquosa a 1% de cloreto férrico a 1 mL de extrato aquoso. Reação positiva para taninos desenvolve coloração azul. O desenvolvimento de coloração verde indica flavonoides e coloração marrom indica polifenóis.

Além dessa reação, realizou-se o ensaio de Staniasny que utiliza formol clorídrico. Assim, transferiu-se 30 mL de extrato aquoso para um balão de fundo chato com 250 mL de capacidade adicionando-se 6 mL de formaldeído 40% e 4 mL de ácido clorídrico 37%. Foi acoplado o balão a um condensador de bolas e levado a refluxo durante uma hora. Decorrido o tempo, será deixou-se esfriar e filtrou-se o extrato formol-clorídrico reservando o filtrado para pesquisa de taninos hidrolisáveis. Lavou-se o resíduo da filtração com uma solução de etanol 50%, gotejando-se sobre o resíduo da lavagem gotas de solução aquosa de hidróxido de potássio 5%. Reação positiva para taninos condensados visualiza-se com desenvolvimento de coloração verde ao gotejar o hidróxido de potássio.

Utilizou-se o filtrado reservado e adicionou-se excesso de acetato de sódio, sem agitação e gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%. Reação positiva para taninos hidrolisáveis visualiza-se com desenvolvimento de coloração azul ao adicionar o cloreto férrico.

#### 3.4.2.5. Pesquisa de amino grupos

Com auxílio de um condensador de bolas e temperatura de 60° C, concentrou-se 10 mL de extrato aquoso até 5 mL. Em tira de papel de filtro adicionou-se cinco gotas do extrato aquoso concentrado em pontos previamente demarcados. Após secagem, nebulizou-se o papel de filtro com solução de ninhidrina levando-o à estufa (95-100°C) durante quinze minutos. Reação positiva é visualizada com o aparecimento de coloração azul-violácea.

#### 3.4.2.6. Pesquisa de ácidos fixos

Transferiu-se 20 mL de extrato aquoso e 2 mL de hidróxido de sódio 1N para balão de fundo chato com 100 mL de capacidade, acoplando-se um condensador de bolas e levando-o a refluxo durante trinta minutos. Decorrido o tempo, esfriou-se e acidificou-se o extrato alcalino com solução de ácido sulfúrico 1N. Procedeu-se a

extração, com auxílio de um funil de separação, com 10 mL de éter etílico (três vezes).

Os extratos etéreos foram reunidos, tratados com carvão ativado, filtrados e levados à secura em banho-maria a 50°C. Aqueceu-se o resíduo em estufa à 100°C por dez minutos, esfriou-se, adicionou-se 5 mL de solução aquosa de hidróxido de amônio 1N e filtrou-se. Adicionaram-se três gotas do filtrado anterior a um papel de filtro, obtendo uma mancha com aproximadamente um centímetro de diâmetro e pingou-se sobre esta mancha uma gota de reagente de Nessler. Para controle negativo utilizou-se uma mancha com o reativo de Nessler. Levou-se o papel de filtro à estufa por cinco minutos. Visualiza-se reação positiva com o aparecimento de coloração marrom.

#### 3.4.2.7. Pesquisa de ácidos voláteis

Com solução de ácido sulfúrico 1N, adicionou-se 10 mL de extrato aquoso. Colocou-se o extrato ácido em tubo de ensaio e levou-se à fervura, determinando o pH dos vapores com auxílio de fita indicadora de pH presa ao tubo com rolha de cortiça.

O aparecimento de pH abaixo de sete indica presença de ácidos voláteis.

### 3.5. OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

#### 3.5.1. Extrato bruto etanólico

Os extratos brutos das partes aéreas (caule e folhas) foram preparados em sistema fechado à quente no aparelho de Soxhlet sendo 1000g das folhas e 700g de caule triturado, utilizou-se como solvente extrator o álcool etílico absoluto (PA), sendo 5,100 L para as folhas e 2,5 L para o caule.

Terminada as extrações com ciclos de 7 horas/dia em destilação, com duração de 6 dias para as folhas e 5 dias para o caule, cada material (caule e folhas) foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório até adquirir aspecto de extrato fluido.

#### 3.5.1.1. Determinação de cor, pH e teor de sólidos

Após o preparo do extrato, realizou-se a determinação de cor, pH e teor de sólidos. Para determinação de cor e pH utilizou-se a verificação feita pelo observador e tira indicadora da Merck®, respectivamente.

O teor de sólidos baseia-se na eliminação total da fase líquida por secagem do produto proveniente da extração dos componentes solúveis. Para esta determinação, depositou-se 1 mL do extrato bruto etanólico em placa de petri, previamente seca e tarada. Em seguida, foram levadas à estufa a 100 °C até peso constante e procedeu-se os cálculos onde o resultado foi apresentado em quantidade de sólidos em porcentagem em relação a massa do material vegetal seco coletado.

#### 3.5.2. Partição dos extratos brutos etanólicos

Segundo Carvalho (2001) o extrato bruto etanólico foi obtido e fracionado separadamente, por meio de partição líquido-líquido em aparelho de soxhlet modificado sob número de registro: PI 0601703-7 A, com solventes de polaridade crescente. Obteve-se dessa forma as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente.

Todo o sistema foi levado ao aquecimento e deixado em refluxo contínuo por aproximadamente 6 horas para que os solventes possam realizar uma adequada partição (L/L).

### 3.6. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS

#### 3.6.1. Isolamento do constituinte químico da fração hexano do caule

Após a obtenção da fração hexano do caule realizou-se uma coluna cromatográfica utilizando como fase estacionária sílica gel 60 Merck® (0,063 – 0,200mm) e fase móvel a mistura dos solventes hexano e acetato de etila, inicialmente partindo-se de 100% hexano até 100% acetato de etila. As misturas foram realizadas utilizando um volume máximo de 100 mL, aumentando-se o



gradiente de polaridade de 5 mL em 5 mL. No final desse processo, utilizou-se 50 mL de metanol para extrair compostos de maior polaridade.

Utilizou-se 155 frascos de aproximadamente 10 mL para a coleta do eluato. Porém foram selecionados apenas os frascos 01 ao 16, os quais apresentaram aparecimento de cristais. Em seguida esses frascos foram lavados com éter de petróleo para retirada da clorofila.

A pastilha a ser cromatografada foi preparada com sílica gel 60 F 254 na proporção de 5 partes em relação a quantidade de amostra e levada à secura em banho-maria a 50°C, sob constante homogeneização.

Esta técnica, que se utiliza de processos cromatográficos para análise e identificação de compostos de um determinado extrato, segue etapas que incluem desde a: montagem de coluna ou placa cromatográfica; escolha da fase estacionária e fase móvel; escolha do revelador e índice de retenção e respectivos; revelação/visualização das zonas de separação dos compostos; e/ou extração das substâncias retidas na fase estacionária. Além disso, a cromatografia em coluna é uma das mais utilizadas para a separação e isolamento dos constituintes do extrato analisado.

### 3.6.2. Isolamento do constituinte químico da fração clorofórmio das folhas

Após a obtenção da fração clorofórmio das folhas realizou-se uma coluna cromatográfica utilizando como fase estacionária sílica gel 60 Merck® (0,063 – 0,200mm) e fase móvel a mistura dos solventes hexano e acetato de etila, inicialmente partindo-se de 100% clorofórmio até 100% acetato de etila. As misturas foram realizadas utilizando um volume máximo de 100 mL, aumentando-se o gradiente de polaridade de 5 mL em 5 mL. No final desse processo, utilizou-se 50 mL de metanol para extrair compostos de maior polaridade.

Utilizou-se 250 frascos de aproximadamente 10 mL para a coleta do eluato. Porém foram selecionados apenas os frascos 156 e 157, os quais apresentaram aparecimento de cristais. Em seguida esses frascos foram lavados com acetona para retirada da clorofila.

A pastilha a ser cromatografada foi preparada com sílica gel 60 F 254 na proporção de 5 partes em relação a quantidade de amostra e levada à secura em banho-maria a 50°C, sob constante homogeneização.

### 3.6.3. Caracterização dos constituintes químicos isolados

Para a identificação dos isolados obtidos no processo de separação foi utilizado a metodologia de espectroscopia de ressonância magnética nuclear, utilizando o aparelho RMN Bruker DPX 200, operando a 4,7 Tesla, observando os núcleos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  à 200,13 e 50,62 MHz, respectivamente.

### 3.7. ANÁLISE POR CLAE/DAD

Os extratos brutos (caule e folhas) de *Chusquea pinifolia* foram diluídos em MeOH a uma concentração de 20,00 mg/mL e submetidos à análise por CLAE Merck Hitachi – Elite Lachrom, com detector diodo (DAD) em 350 nm, coluna XTerra® RP18 5  $\mu\text{m}$ , 4,6x250 mm, volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ , fluxo 1,00 ml/min. Como fase móvel foi utilizado gradiente de concentração o sistema  $\text{H}_2\text{O}:\text{H}_3\text{PO}_4$  a 0,1% (A) e MeOH (B) na seguinte programação: 1-40 min, iniciando com 10% de fase B e finalizando em 45 min com 100% de fase B. O MeOH utilizado foi grau HPLC (TEDIA) e a água MilliQ.

### 3.8. DOSEAMENTO DE POLIFENÓIS

As técnicas de doseamento de polifenóis e flavonoides totais são técnicas espectrométricas, que por meio de uma curva de calibração, compara-se com um padrão e calcula-se a concentração dos metabólitos.

Para determinação do teor de fenólicos totais, os extratos brutos (caule e folhas) foram diluídos em metanol (1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e adicionados ao tubo de ensaio e este completado para 3,4 mL com água destilada, após total solubilização foi adicionado 0,2 mL de reativo de Folin-Ciocalteu novamente homogeneizado e adicionado 0,4 mL de carbonato de sódio a 10%, agitado e depois 30 minutos de repouso em temperatura ambiente (SLINKARD e SINGLETON, 1977). Após este período, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro UV visível da marca Shimadzu®, modelo UV-1601 PC, à 760 nm, utilizando curva de calibração de equivalente em ácido gálico nas concentrações de 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5 e 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  como padrão, as leituras foram realizadas em triplicata. Os teores de fenólicos totais foram determinados em miligramas equivalente de ácido gálico (EG)

por grama de extrato bruto, utilizando a equação abaixo com base na curva de calibração e Coeficiente de determinação  $R^2=0,9964$ .

$$Y = \text{Absorbância medida}$$

$$Y = 0,0329x - 0,0583$$

### 3.9. DOSEAMENTOS DE FLAVONOIDES TOTAIS

Os extratos brutos foram diluídos em metanol (1000 µg/ml) e posteriormente adicionados 2 ml de  $AlCl_3$  2%, o volume da amostra foi completado para 2 mL. Após 60 minutos foram realizadas as leituras em espectrofotômetro UV visível da marca Shimadzu®, modelo UV-1601 PC, à 420 nm, utilizando curva de calibração de quercetina nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30 µg/mL como padrão, as leituras foram realizadas em triplicata (CHANG et al., 2002). Os teores de flavonoides totais foram determinados em miligramas equivalente de quercetina (EQ) por grama de extrato bruto, utilizando a equação abaixo com base na curva de calibração e Coeficiente de determinação  $R^2=0,9996$ .

$$Y = \text{Absorbância medida}$$

$$Y = 0,0314x - 0,0164$$

### 3.10. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

#### 3.10.1. Teste Toxicidade *Artemia salina*

Foram adquiridos os ovos de microcrustáceo da espécie *Artemia salina* e procedeu-se ao preparo do ensaio conforme metodologia citada por Meyer et al. (1982).

Os ovos do microcrustáceo foram eclodidos em água salina, preparada com 14g de sal marinho e dissolvidos em 400 mL de água purificada. Para esta quantidade, foram adicionados 200 mg dos ovos do crustáceo. O pH foi mantido entre 8,0 e 9,0 para evitar a morte dos náuplios. A temperatura foi controlada entre 27°C e 30°C e a solução foi mantida sob agitação e aeração constante por 48 horas. Nas primeiras horas do processo foi mantida iluminação (20 W) sobre o recipiente.

Foi preparada uma solução com os extratos e frações em concentrações de 1000  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{L}/\text{mL}$  e 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , todos em triplicata. Foram colocados 10 microcrustáceos em cada frasco para possibilitar posteriormente a visualização dos microcrustáceos vivos. Os frascos com as soluções foram colocados em estufa para total eliminação do solvente (metanol), inclusive a do controle que utilizará apenas o solvente utilizado na dissolução das amostras.

Após a evaporação do mesmo, os microcrustáceos foram adicionados ao frasco com a ajuda de conta gotas de vidro, totalizando 10 em cada eppendorf, adicionou-se água salina suficiente para acomodar e visualizar os microcrustáceos. Após 24 horas observaram-se quantos deles morreram em presença das concentrações analisadas, procedendo-se aos cálculos da dose letal média ( $DL_{50}$ ) através do método estatístico Probitos com 95% de intervalos de confiança. As frações são consideradas ativas quando  $DL_{50}$  for menor que 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (MEYER et al., 1982).

### 3.10.2. Avaliação Hemolítica *in vitro*

A determinação das porcentagens de hemólise foi realizada segundo método de Banerjee et al. (2008), adaptado por Merino (2014).

Foram transferidos 5 mL de sangue de carneiro de origem comercial da empresa Newprov®, previamente homogeneizado sob leve agitação, para um tubo de ensaio e centrifugado durante 5 minutos a 3000 rpm com PBS gelado. Foram realizadas 5 lavagens sequenciais com PBS e descartando-se sempre o sobrenadante. Na última lavagem o sobrenadante encontrou-se incolor. Em seguida, foi realizada uma diluição a 2% com a papa de eritrócitos utilizando como diluente o PBS.

Para a realização da prova de hemólise foram preparados eppendorfs com hemólise a 100% (controle positivo), branco, controle solvente e os testes (amostras). Na realização do controle positivo foram pipetados 200  $\mu\text{L}$  da solução de Triton X-100 a 10%I em 200  $\mu\text{L}$  de solução de eritrócito a 2%(V/V). Enquanto para o branco foram pipetados 200  $\mu\text{L}$  de PBS em 200  $\mu\text{L}$  de solução de eritrócito a 2%. No controle solvente foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de etanol mais 180  $\mu\text{L}$  de PBS em 200  $\mu\text{L}$  de solução de eritrócito a 2%. Para o preparo das amostras foram preparadas soluções nas concentrações de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e

100 µg/mL em 200 µL de solução de eritrócito a 2%. Para dissolver melhor as amostras foram adicionados 10% de etanol do volume total de cada amostra. Todas as amostras, os controles e o branco foram realizados em triplicatas.

Em seguida os eppendorfs foram uniformemente homogeneizados com leve agitação manual. Após foram incubados durante 3 horas em estufa com temperatura controlada a 37°C. Ao término da incubação os eppendorfs foram centrifugados em centrífuga Minispin Plus da empresa Eppendorf® a 3000 rpm durante 5 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em microplaca de Elisa de 96 poços, para onde foram pipetados 300 µL do sobrenadante das amostras. A leitura foi realizada no fotômetro de microplaca Multiscan FC da empresa Thermo Scientific®. A leitura foi realizada a 540nm.

A TAXA DE HOMÓLISE SERÁ CALCULADA DA SEGUINTE MANEIRA (EQUAÇÃO 4):

$$Hemólise (\%) = \frac{Abs amostra - Abs basal}{Abs total - Abs basal} \cdot 100 \quad (4)$$

### 3.11. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro*

#### 3.11.1.1. Redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina)

Este ensaio consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical livre 2,2 - difenil-1-picril-hidrazila - DPPH•, de coloração púrpura que absorve a 518 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH• é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determinou-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres.

A metodologia foi realizada de acordo com Mensor et al. (2001), que a capacidade antioxidante quantitativa tendo como base este princípio da redução do radical DPPH medida em espectrofotometria de UV visível. Foi preparada uma solução de DPPH minutos antes do ensaio a 0,03 mmol/mL em metanol absoluto.

Foram preparadas cinco diluições de cada amostra, com concentrações que variam entre 5 µg/mL a 450 µg/mL e, em seguida, foi adicionado 1 mL da solução de DPPH.

Para cada amostra foi preparado um branco com 2,5 mL da solução da amostra e 1 mL de metanol para cada concentração. Paralelamente foi realizado um controle com 2,5 mL de metanol e 1 mL de DPPH. Como padrões foram utilizados a vitamina C (1,6 a 8 µg/mL) e a rutina (2,0 a 12 µg/mL). Após 30 minutos, a absorbância das soluções foi medida em 518 nm e, em seguida, a porcentagem da atividade antioxidante (AA%) calculada. A porcentagem de atividade antioxidante (AA%) foi calculada através da fórmula abaixo:

$$AA\% = \frac{100 - (\text{Abs. amostra} - \text{Abs. branco})}{\text{Abs. controle}}$$

Foram calculados os valores da concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante ou concentração inibitória mínima (IC<sub>50</sub>) em gráfico, onde a abscissa representa a concentração da amostra e a ordenada é a média da AA% das amostras de cada concentração. A equação da reta desse gráfico, do tipo  $y = ax + b$ , servirá de base para determinação do valor de IC<sub>50</sub>.

#### 3.11.1.2. Formação do complexo fosfomolibdênio

O ensaio de complexação pelo fosfomolibdênio foi realizado de acordo com Prieto, Pineda e Aguilar et al. (1999). A técnica baseia-se na redução do molibdênio VI a molibdênio V, pela amostra analisada, e obtenção de um complexo fosfato-molibdênio V, de coloração verde em pH ácido, o qual é determinado espectrometricamente a 695 nm. O método possui a vantagem de avaliar, de forma simples, a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto de hidrofílicos.

Para a reação de formação do complexo foi necessário o preparo de um reativo que consiste de uma solução com fosfato de sódio 0,1M (28 mL), molibdato de amônio 0,03M (12 mL) e ácido sulfúrico 3M (20 mL), sendo o volume completado com água para 100 mL. Esse reativo foi preparado no momento do uso. Soluções

padrões de vitamina C e rutina, bem como as amostras a serem testadas, foram preparadas na concentração de 200 µg/mL em metanol.

Em um tubo de ensaio, foi pipetado uma alíquota de 0,3 mL de cada amostra, e adicionado 3 mL de reativo previamente preparado. O mesmo foi realizado com os padrões. O branco é constituído de 0,3 mL de metanol e 3 mL de reativo. A análise foi realizada em triplicata. Os tubos foram hermeticamente fechados e colocados em banho-maria a 95°C por 90 minutos. Ao atingir a temperatura ambiente, realizou-se a leitura das absorvâncias (Abs) em espectrofotômetro de UV da marca Shimadzu®, modelo UV-1601 PC, em 695 nm. Os resultados foram expressos como atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação à vitamina C e rutina.

As seguintes fórmulas demonstram o cálculo de atividade antioxidante frente a rutina e vitamina C.

$$\text{AA\% em relação à Rutina} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)} \times 100}{\text{Abs (rutina)} - \text{Abs (branco)}}$$

$$\text{AA\% em relação à Vitamina C} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)} \times 100}{\text{Abs (vitamina C)} - \text{Abs (branco)}}$$

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

Foram obtidos 4750 gramas de partes aéreas fragmentadas e secas da espécie *Chusquea pinifolia*. O material botânico (folhas e caule) foi seco a temperatura ambiente e protegido da luz solar e umidade por 2 semanas e posteriormente estabilizado em estufa ventilada a 40°C por 48h.

### 4.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE E CINZAS TOTAIS

Os parâmetros de análises de umidade e cinzas totais (TABELA 3) foram determinados pela primeira vez para espécie *Chusquea pinifolia*. Foi encontrado um valor maior de umidade no caule e um valor maior de cinzas na folha.

TABELA 3 - TEOR DE CINZAS E UMIDADE.

ANÁLISE	FOLHA		CAULE	
	%	±DP	%	±DP
Umidade	8,39	0,166	10,71	0,142
Cinzas	4,99	0,068	1,44	0,035

FONTE: O autor (2018).

### 4.3. PARAMETROS FISICO-QUIMICOS DO EXTRATO BRUTO

A obtenção do extrato bruto foi realizada por aparelho de Soxhlet, utilizando como solvente álcool 96% e concentrado em evaporador rotatório. Após obtenção do extrato bruto foram realizados alguns testes físico-químicos descritos na TABELA 4.

O rendimento dos extratos brutos foi calculado a partir do valor obtido no teor de sólidos. O extrato bruto do caule possui um rendimento de 4,48% ± 0,001697, enquanto para o extrato bruto das folhas foi de 8,364% ± 0,000737.



TABELA 4 - TESTES FÍSICO-QUÍMICOS DO EXTRATO BRUTO.

ANÁLISE	FOLHA		CAULE	
	%	±DP	%	±DP
TEOR DE SÓLIDOS	8,36	0,000737	4,48	0,001697
pH	5		5,5	
COR	VERDE CLARO		MARROM CLARO	

FONTE: O autor (2018).

#### 4.4. ESTUDO FITOQUÍMICO PRELIMINAR

##### 4.4.1. Análise fitoquímica do extrato aquoso 20%

Na análise fitoquímica do extrato aquoso (TABELA 5) foi verificada a presença de: amino grupos, representada pela cor violácea. No resíduo de papel filtro foram encontrados taninos condensados não hidrolisáveis, indicados pela presença da cor verde. No extrato foi verificado também a presença de ácidos fixos e voláteis caracterizado por ter o pH indicando 5, para o grupo de heterosídeos saponínicos foi representado como positivo para o caule devido a presença de espuma. Os grupos heterosídeos antociânicos e heterosídeos cianogênicos não foram identificadas a presença no extrato testado.

Foi possível observar a presença de grupos heterosídeos saponínicos pela presença de espuma.

TABELA 5 - ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO DE *Chusquea pinifolia*.

ANÁLISES	CAULE	FOLHA
Heterosídeos antociânicos	-	-
Heterosídeos saponínicos	-	+
Heterosídeos cianogênicos	-	-
Taninos condensados	+	+
Amino grupos	+	+
Ácidos fixos	+	+
Ácidos voláteis	+	+

FONTE: O autor (2018).

NOTA: + positivo e - negativo.

## 4.4.2. Análise fitoquímica do extrato etanólico 20%

Os ensaios da análise fitoquímica do extrato etanólico 20% (TABELA 6) foram realizados para as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólico.

TABELA 6 - ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO 20% DE *Chusquea pinifolia*.

ANÁLISES	FRAÇÃO HEXANO		FRAÇÃO CLOROFÓRMIO		FRAÇÃO ACETADO DE ETILA		FRAÇÃO REMANESCENTE	
	Caule	Folha	Caule	Folha	Caule	Folha	Caule	Folha
Flavonoides	-	-	+	+	+	+	+	+
Leucoantocianidinas	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcalóides	-	-	+	+	-	-	-	-
Cumarinas	-	-	+	+	+	+	+	+
Iridoides	-	-	-	-	-	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-	-	-	-	-
Esteróides/Triterpenos	+	+	+	+	-	-	-	-

FONTE: O autor (2018).

Como pode ser observada na TABELA 6 a análise fitoquímica do extrato hidroalcoólico a 20%, nota-se positivo a presença de alcaloides para fração clorofórmio indicados pelos reagentes de Dragendorff, Mayer e Bertrand. Para esteróides e triterpenos a reação de Libermann Bouchard indicou a presença de triterpenos na fração clorofórmio, a coloração esverdeada nesta reação indica função hidroxila em 3 e dupla ligação entre 5 e 6 no anel aromático. Observou-se como positivas reações para cumarinas que é representado com o aparecimento de fluorescência de coloração verde amarelada em papel filtro submetido à camera ultravioleta 366nm.

Diversas pesquisas destacam maior presença de compostos fenólicos e flavonoides na família Poaceae em folhas de bambu sendo C-glicosilados e fenilpropanoides (ZHANG et al., 2008; COFFIE et al., 2014). Que ocorreu indicação positiva para flavonoides no teste preliminar caracterizada como positivo para flavonol e dihidroflavonol a coloração vermelho sangue. Não houve reação positiva para os grupos iridóides, antraquinonas e leucoantocianidinas.

#### 4.5. PARTIÇÃO DAS FRAÇÕES

Após obtenção dos extratos brutos foi feita a partição líquido-líquido das frações em aparelho Soxhlet modificado. Para obtenção das frações foram utilizados solventes em ordem de polaridade crescente (hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente).

Estão representados nas TABELAS 7 e 8 a quantidade em gramas das frações do caule e folhas e o rendimento em % em relação à quantidade de material vegetal coletado.

TABELA 7 - RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES DO CAULE EXTRAÍDOS POR SOXHLET MODIFICADO.

FRAÇÕES	RENDIMENTO	
	G	%
Hexano	2,03	2,9
Clorofórmio	14,15	2,02
Acetato de Etila	9,12	1,3
Remanescente	18,19	2,5

FONTE: O autor (2018).

Nota-se um menor rendimento para frações acetato de etila tanto do caule quanto das folhas (TABELAS 7 e 8). Obtendo o melhor rendimento a fração hidroalcólica das folhas e a fração hexano para o caule.

TABELA 8 - RENDIMENTOS DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS EXTRAÍDOS POR SOXHLET MODIFICADO.

FRAÇÕES	RENDIMENTO	
	G	%
Hexano	21,03	2,1
Clorofórmio	20,12	2,01
Acetato de Etila	12	1,2
Remanescente	23	2,3

FONTE: O autor (2018).

#### 4.6. CARACTERIZAÇÃO E ISOLAMENTO DO CONSTITUINTE QUÍMICO ISOLADO

##### 4.6.1. Composto FH-5

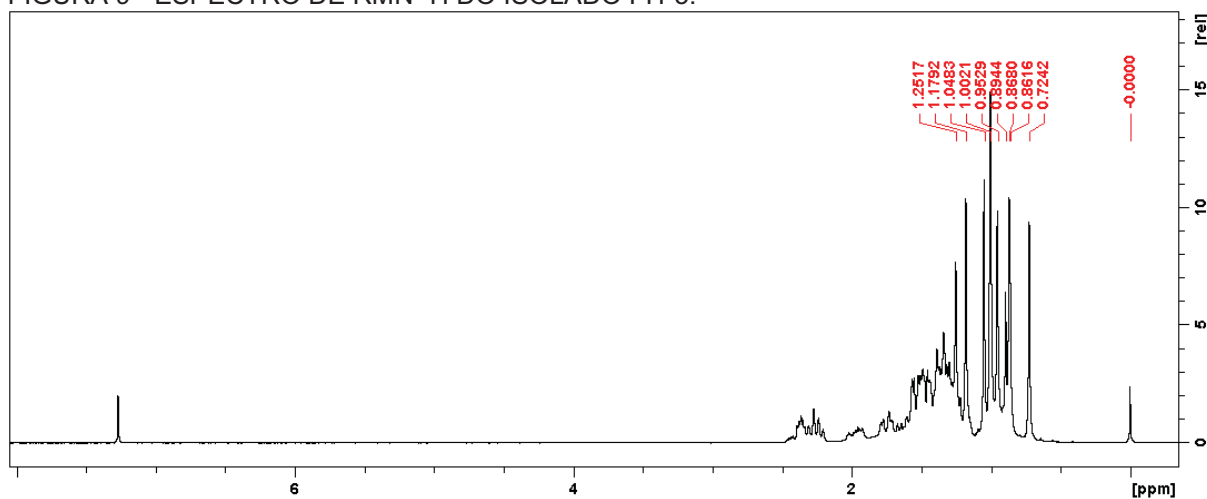
O composto FH-5 foi isolado dos fracos FH-5 e FH-15 da fração hexano do caule da espécie *Chusquea pinifolia* na forma de cristais em formato de agulhas com peso de 5g. Utilizou-se éter de petróleo e acetona para purificar os cristais. Para identificação do isolado foi utilizado RMN conforme descrito no item 3.6.

O Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 9) apresenta sinais característicos de triterpenos que estão localizados até a região de 2,5 ppm, no Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  notou-se a presença de 30 sinais dentre eles um sinal característico (FIGURA 10 e 11) localizado na região  $\delta\text{C}213,35$  (C) que é específico para carbonila que está localizada no C-3 da estrutura. E por comparação de dados espectrais representados na TABELA 9, foi possível identificar o composto 3-oxo-friedelano (friedelina).

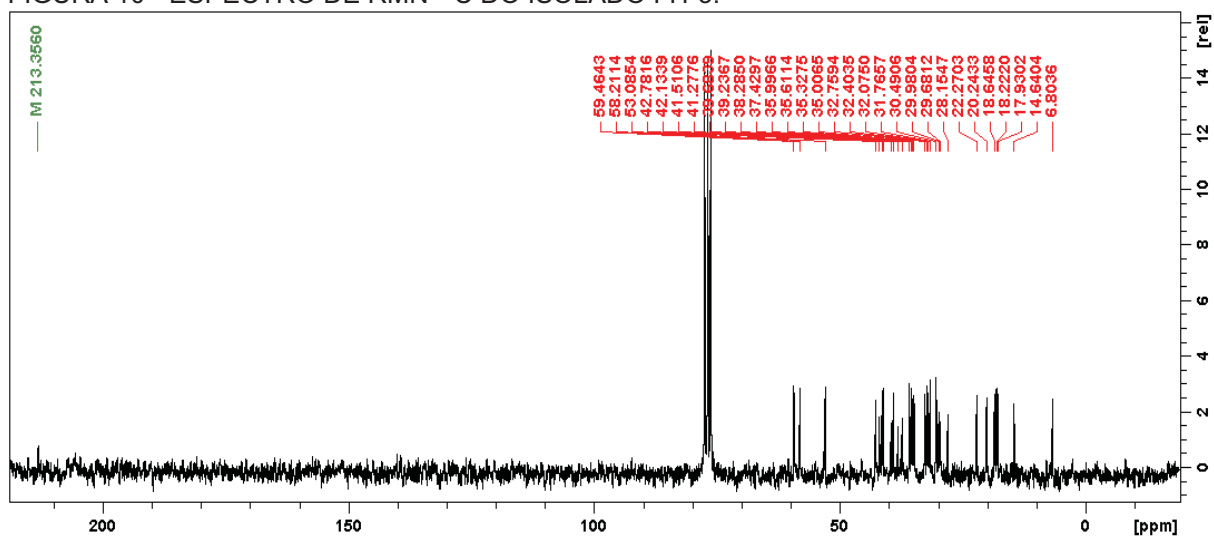
TABELA 9 - DADOS RMN  $^{13}\text{C}$  PARA (FH-5) 3-OXO-FRIEDELANO, COMPARADO COM DADOS DA LITERATURA.

$^{13}\text{C}$	<b>3-oxo-friedelano (KROGH, 1996)</b>	<b>3-oxo-friedelano (friedelina) FH-5</b>
	$^{13}\text{C}$	$^{13}\text{C}$
1	22.3	22.27
2	41.5	41.51
3	213.2	213.35
4	58.2	58.21
5	42.1	42.13
6	41.3	41.27
7	18.2	18.22
8	53.1	53.08
9	37.4	37.42
10	59.4	59.46
11	35.6	35.61
12	30.5	30.49
13	39.7	39.68
14	38.3	38.28
15	32.4	32.40
16	36.0	35.99
17	30.0	29.98
18	42.8	42.78
19	35.3	35.32
20	28.1	28.15
21	32.7	32.75
22	39.2	39.23
23	6.8	6.80
24	14.6	14.64
25	17.9	17.93
26	20.2	20.24
27	18.6	18.64
28	32.1	32.07
29	35.0	35.00
30	31.8	31.76

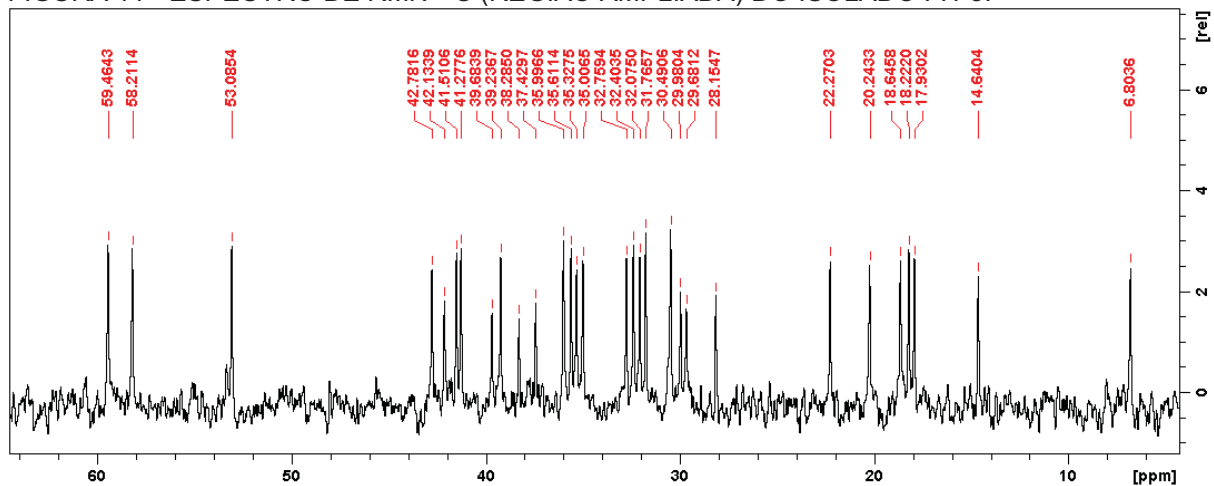
FONTE: O autor (2018).

FIGURA 9 - ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DO ISOLADO FH-5.

FONTE: O autor (2018).

FIGURA 10 - ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  DO ISOLADO FH-5.

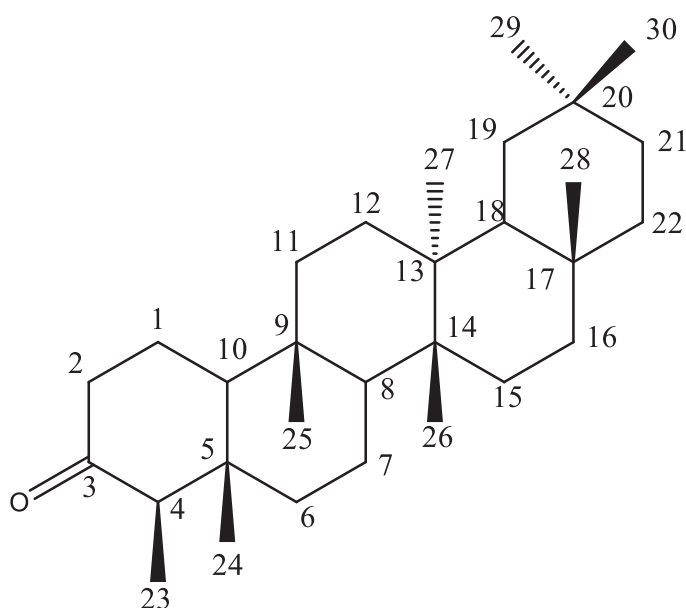
FONTE: O autor (2018).

FIGURA 11 - ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  (REGIÃO AMPLIADA) DO ISOLADO FH-5.

FONTE: O autor (2018).

A FIGURA 12 representa a estrutura química da substância Friedelina.

FIGURA 12 - ESTRUTURA QUÍMICA DO 3-OXO-FRIEDELANO.



FONTE: O autor (2018).

A friedelina tem sido extraída de outras plantas e testada em diferentes atividades biológicas e farmacológicas, as quais apresentam resultados promissores. Pesquisas afirmam à friedelina boa atividade antibacteriana, atividades antiúlcera e contra gastrite (CORDEIRO et al., 1999; RAMESH et al., 2002).

Estudos atribuem ao composto friedelina seletividade para células MCF-7 (carcinoma mamário), quando administrada por via tópica, inclusive por inflamações oculares possui efeito antiinflamatório (MIRANDA, 2015; DI STASI et al., 1999).

#### 4.6.2. Composto FCL-157

O composto FCL-157 foi isolado dos frascos FCL-156 e FCL-157 da fração clorofórmio das folhas da espécie *Chusquea pinifolia* em forma de cristais de cor amarelada pesando 2,5g. Foi utilizado acetona para purificar os cristais e verificou que possui solubilidade em DMSO. Para identificação do composto isolado foi utilizado RMN conforme descrito no item 3.6.

O Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (FIGURA 13) apresenta sinais característicos da presença de anéis aromáticos, situados na região entre 6 e 8 ppm. Por comparação

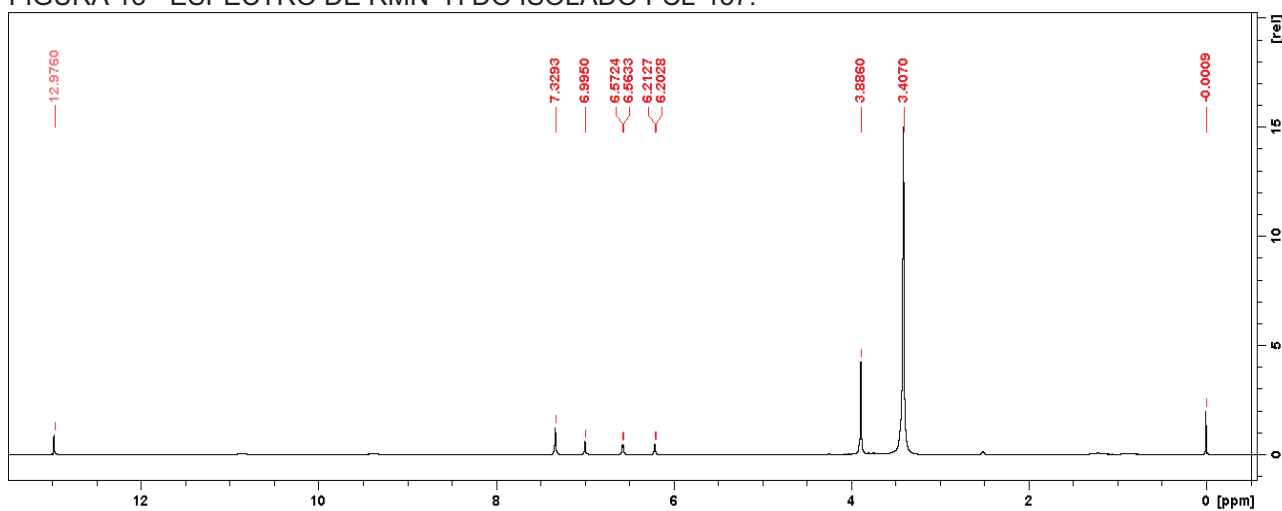
de dados espectrais representados na Tabela 10, foi possível identificar o composto Tricin, denominado quimicamente por 5,7 diidroxiflavona.

TABELA 10 – DADOS RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  PARA (FCL-157) 5,7 DIIDROXIFLAVONA, COMPARADO COM DADOS DA LITERATURA.

POSIÇÃO	$^{13}\text{C}$		$^1\text{H}$	
	FCL-157	(LI et al.,2016)	FCL-157	(LI et al.,2016)
3			6,99 s	
4	182,3	182,7		6,93-6,98 s
5	161,8	161,8	12,98 s	
6	99,3	99,1	6,20 d ( $J=2\text{Hz}$ )	12,96 s
7	164,5	163,6	10,87 sl	6,19-6,21 d( $J=2\text{Hz}$ )
8	94,7	94,4	6,57 d ( $J=2\text{Hz}$ )	
9	157,9	157,8		6,54-6,56 d( $J=2\text{Hz}$ )
2', 6'	104,8	104,6	7,33 s	
3', 5'	56,8	56,4	3,88 s	7,30-7,33 s
4'	148,6	140,2	9,38 sl	3,87-3,90 s

FONTE: O autor (2018).

FIGURA 13 - ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DO ISOLADO FCL-157.



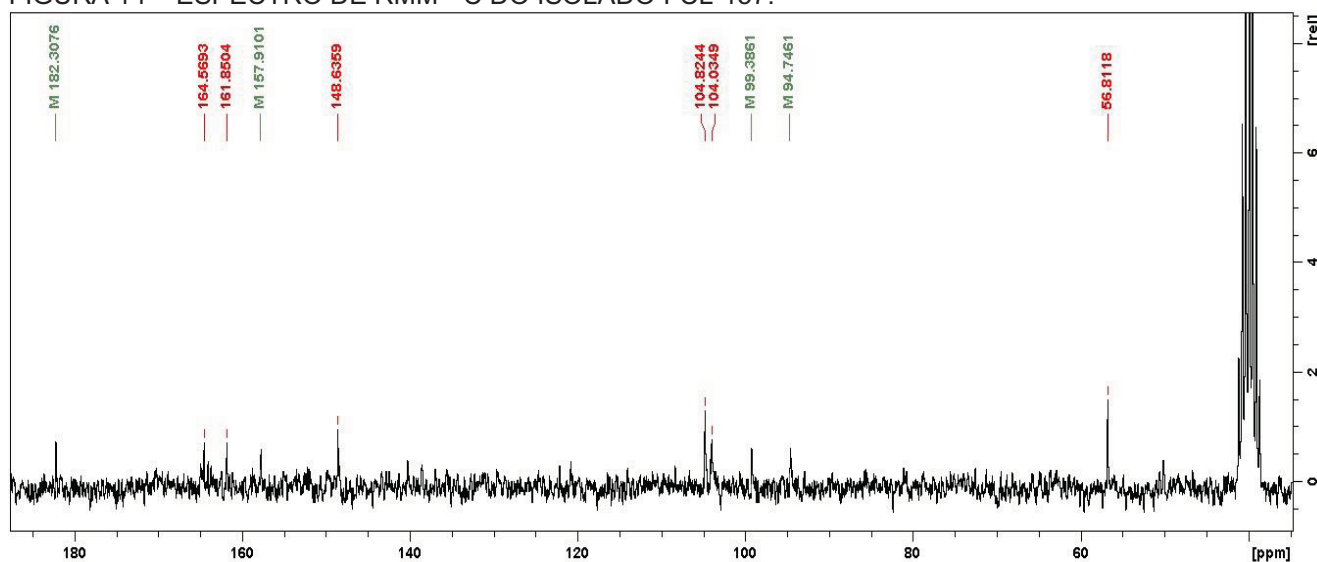
FONTE: O autor (2018).

Após Análise fitoquímica do extrato etanólico 20%, sendo positivo para Flavonóides na fração clorofórmio das folhas, confirma-se que a substância FCL – 157 isolada da fração clorofórmio das folhas da espécie *Chusquea pinifolia*,



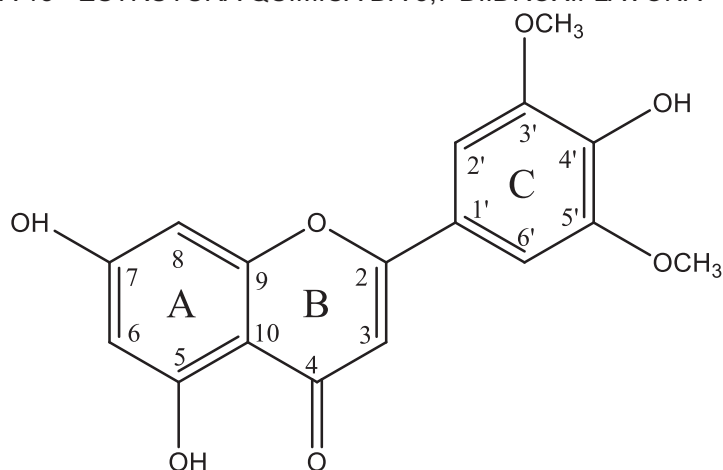
identificada como Tricin (Flavonóide), seja responsável pela atividade antioxidante demonstrada, sendo que para o ensaio de fosfomolibdênio sua fração obteve melhor atividade em relação à vitamina C com 18,23%.

FIGURA 14 – ESPECTRO DE RMM  $^{13}\text{C}$  DO ISOLADO FCL-157.



FONTE: O autor (2018).

FIGURA 15 - ESTRUTURA QUÍMICA DA 5,7 DIIDROXIFLAVONA



TRICIN

FONTE: O autor (2018).

Tricin é um flavonoide da subclasse flavona, sendo estruturalmente composto por dois anéis fenílicos e um anel heterocíclico, um anel benzol (anel-A), um anel cinamoíl (anel-B) e um sistema heterocíclico (anel-C) (FIGURA 15).

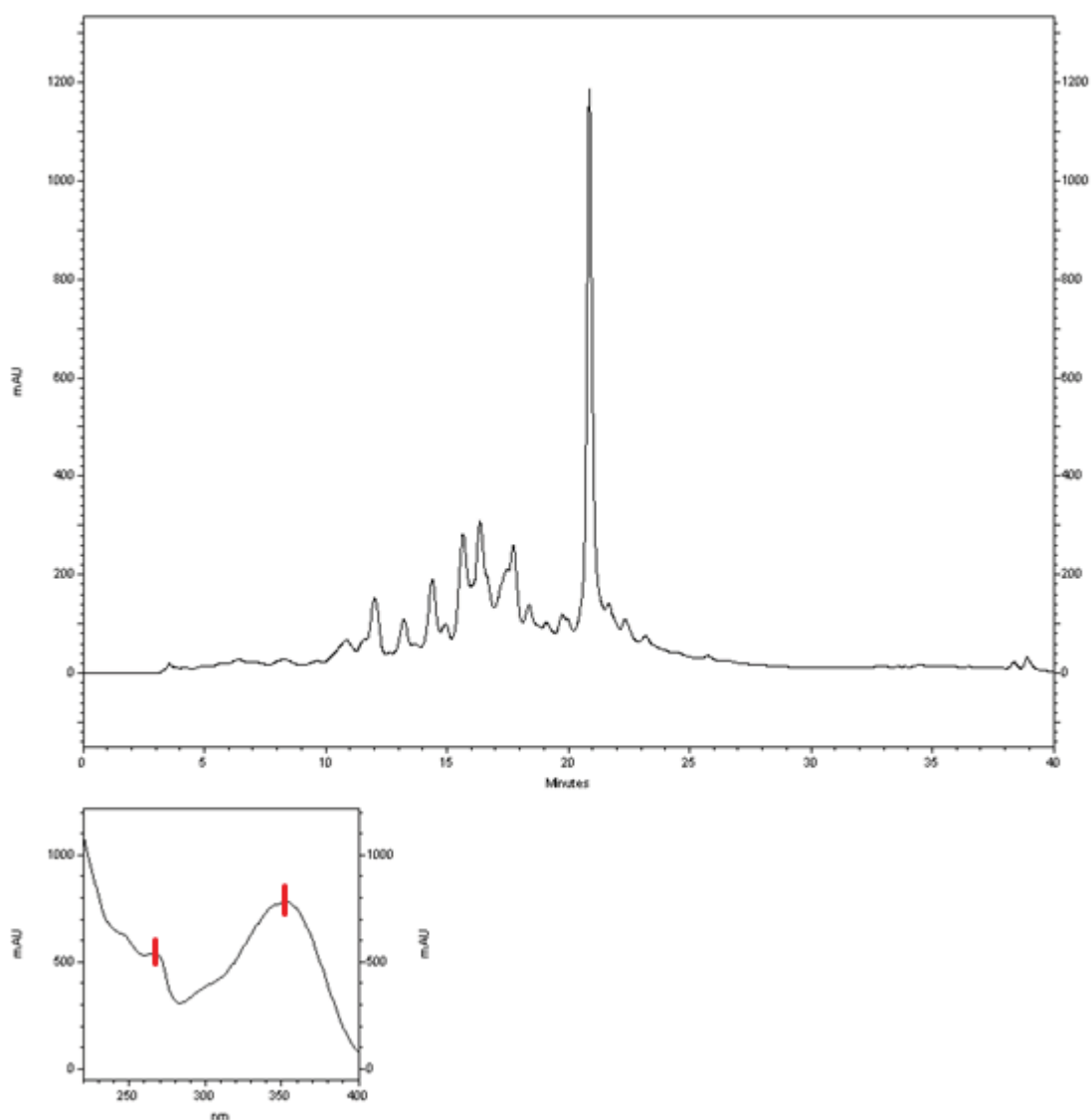
A 5,7 diidroxiflavona foi o primeiro isolado da folhas de trigo, datado em 1930, mais tarde também foi observado em outras plantas das famílias da Gramineae e Cyperaceae (LI et al., 2016).

Estudos relatam que esta substância apresenta atividade protetora para a planta, além de possuir atividade antialérgica, atividade anti-HIV, atividade anti-inflamatória, antioxidante, atividade antitumoral, atividade anti-ulcerogênica, atividade antiviral, hipoglicemiante, supressão e inibição de pigmentação. Esta substância também apresenta potencial aplicação em produtos farmacêuticos devido à sua eficácia preventiva, baixa toxicidade e biodisponibilidade razoável (LI et al., 2016).

#### 4.7. ANÁLISE DA ESPÉCIE VEGETAL *Chusquea pinifolia* por CLAE/DAD

Na análise por cromatografia líquida de alta eficiência verificou que os extratos das folhas e do caule da espécie vegetal *Chusquea pinifolia* apresentam perfis distintos. Na análise cromatográfica das folhas (FIGURA 16) evidenciou-se um pico majoritário com tempo de retenção em 20,97 min. com lambda máximo em 350 nm e 268 nm, os demais picos cromatográficos apresentaram aproximadamente 1/3 da intensidade do pico majoritário.

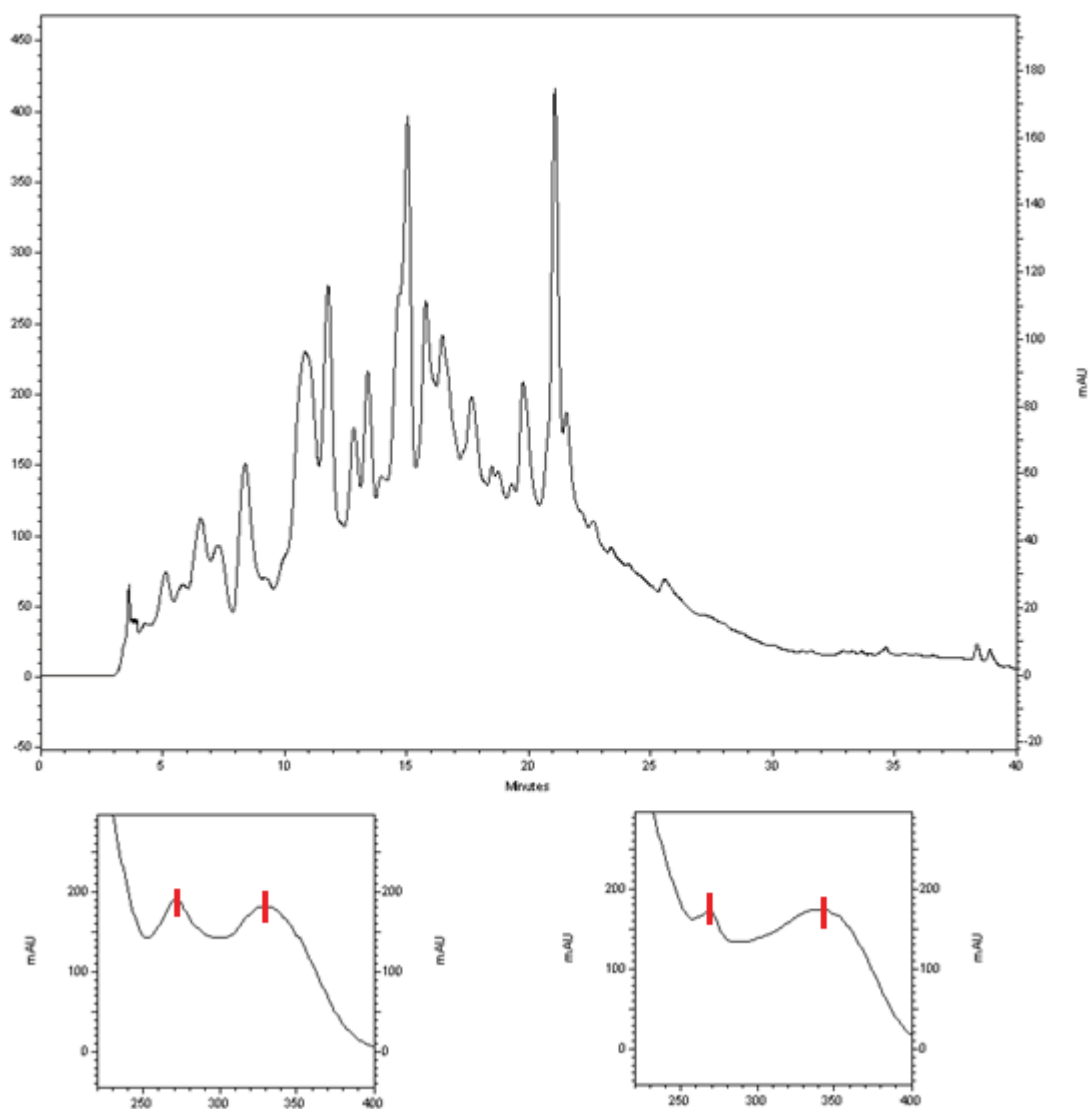
FIGURA 16 – CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DA ESPECIE VEGETAL *Chusquea pinifolia*.



FONTE: O autor (2018).

A análise cromatográfica do extrato bruto do caule (FIGURA 17) demonstrou uma variedade de picos, mostrando assim ser mais complexo que as folhas. Este extrato não apresentou um composto majoritário como demonstrado no extrato bruto das folhas.

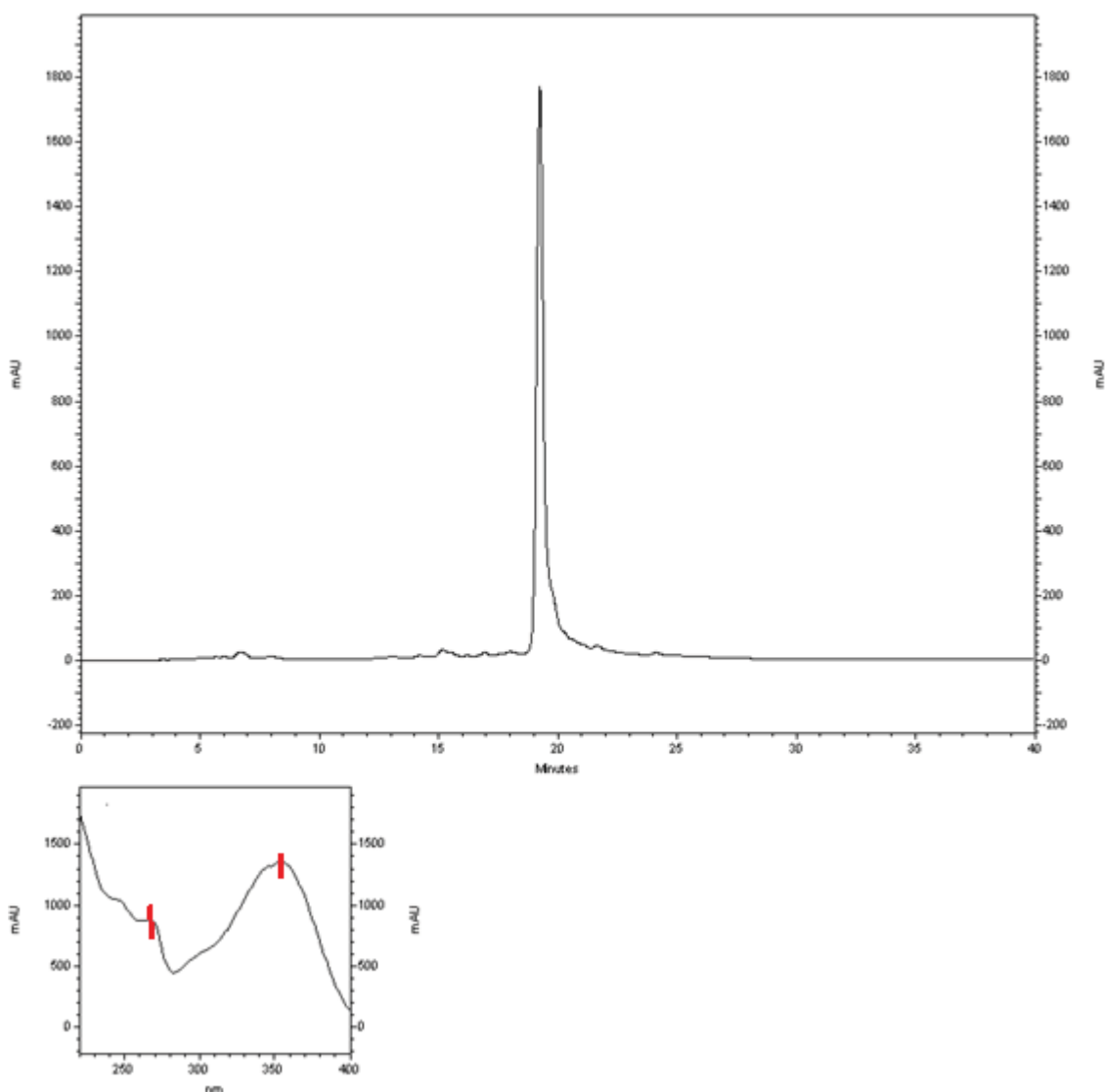
FIGURA 17 - CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DO CAULE DA ESPECIE VEGETAL *Chusquea pinifolia*.



FONTE: O autor (2018).

O composto identificado como 5,7 diidroxiflavona foi analisado por CLAE e apresentou tempo de retenção em 20,97 min. com lambda max. em 350 nm e 268 nm (FIGURA 18). Esta substância foi a mesma evidenciada como composto majoritário no extrato bruto das folhas.

FIGURA 18 – CROMATOGRAMA DA SUBSTÂNCIA ISOLADA FCL-157.



FONTE: O autor (2018).

#### 4.8. DOSEAMENTO FLAVONOIDES TOTAIS E POLIFENÓIS

Nos doseamentos de polifenóis e flavonoides totais dos extratos brutos e frações das folhas e caule de *Chusquea pinifolia* (TABELA 11), observa-se que o maior rendimento para flavonoides totais da folha foi o extrato bruto (53,7 mg EQ g<sup>-1</sup>) e para o caule a fração clorofórmio com (35,0 mg EQ g<sup>-1</sup>). O melhor rendimento de polifenóis da folha está na fração clorofórmio com (216,0 mg EG g<sup>-1</sup>) e do caule na fração acetato de etila com (200,08 mg EG g<sup>-1</sup>).

Os constituintes fenólicos por estarem distribuídos em diferentes solventes estão relacionados devido às substâncias fenólicas apresentam caráter polar,

portanto maior afinidade por solventes mais polares, no caso por acetato de etila, etanol e água. Comparada a uma espécie de bambu asiática *Shizostachyum lumampao* pertencente à mesma família, apresentou 0,17 mg/g EQ no extrato aquoso de suas folhas e 0,70 mg/g EQ de flavonoides no extrato etanólico (TONGCO et al., 2014).

TABELA 11 - TEOR DE POLIFENÓIS E FLAVONOÍDES TOTAIS DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES DE FOLHA E CAULE de *Chusquea pinifolia*.

	FOLHAS		CAULE	
	Flavonóides totais (mg EG g <sup>-1</sup> ) ± DP	Polifenóis totais (mg EQ g <sup>-1</sup> ) ± DP	Flavonóides totais (mg EQ g <sup>-1</sup> ) ± DP	Polifenóis totais (mg EG g <sup>-1</sup> ) ± DP
Extrato bruto	53,7a±0,71	134,8b±0,56	5,6c±0,20	151,2b±0,53
Clorofórmio	44,8b±1,86	216,0a±0,09	35,0a±0,18	104,5c±0,19
Acetato de etila	38,0c±0,51	107,5c±0,80	7,3b±0,22	200,8a±1,15
Hidroalcoólico	17,7d±0,13	111,7c±0,14	2,7d±0,23	74,8d±0,27

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

FONTE: O autor (2018).

Os flavonóides por apresentarem em sua estrutura química grande número de hidroxilas apresentam caráter polar e são geralmente encontrados em sua forma glicosilada tornando essas moléculas ainda mais polares sendo elas solúveis em solventes como a água, metanol, acetona, DMSO e etanol (MARKHAM, 1982). Estes resultados corroboram com a presença de flavonoides nas folhas e caules no screening fitoquímico e no doseamento de flavonoides totais.

#### 4.9. ATIVIDADES BIOLÓGICAS

##### 4.9.1. Avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina*

Também conhecida como “camarão de salmoura”, a *Artemia salina* é um microcrustáceo utilizado como fonte de alimento para peixes e crustáceos. Seu ciclo de vida inicia-se pela eclosão dos cistos dormentes, que são embriões enclausurados e metabolicamente inativos (PELKA et al., 2000).

Para Meyer et al. (1982) o microcrustáceo pode ser utilizado para estimar a toxicidade através da concentração média letal (DL<sub>50</sub>), servindo como parâmetro para avaliação da atividade biológica. Dentre as vantagens do uso da *Artemia salina*, necessita-se de uma pequena quantidade de amostra para avaliação, facilidade de

aquisição dos cistos, fácil incubação e utilizam-se equipamentos simples para realização do teste.

Nas TABELAS 12 e 13 está evidenciado o número de náuplios mortos e a DL<sub>50</sub> calculada por meio do método estatístico Probitos.

TABELA 12 - ENSAIO DE MORTALIDADE DE *Artemia salina* E DL<sub>50</sub> FRENTE A EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DE *Chusquea pinifolia*.

AMOSTRA	MORTALIDADE/CONCENTRAÇÃO (µg/mL)			DL <sub>50</sub> (µg/mL)	INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%(µg/mL)
	10	100	1000		
Ex. Bruto	1	1	4	>1000	-
F. Hexano	1	1	1	>1000	-
F. Clorofórmio	1	1	3	>1000	-
F. Acetato de Etila	0	1	2	>1000	-
F. Hidroalcoólica	1	1	1	>1000	-
Metanol	0	0	0	>1000	-
Sulfato de quinidina	2	5	10	99,92	63,78 – 255,67

FONTE: O autor (2018).

Para uma amostra ser considerada tóxica frente ao microcrustáceo é necessário que as amostras apresentem valor de DL<sub>50</sub> inferior a 1000µg/mL (MEYER, 1982).

Interpretando os resultados, nenhuma das amostras testadas frente à *Artemia salina* apresentou efeito tóxico, devido ao DL<sub>50</sub> para cada uma das amostras apresentarem-se superiores a 1000µg/mL.

TABELA 13 - ENSAIO DE MORTALIDADE DE *Artemia salina* E DL<sub>50</sub> FRENTE A EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DE *Chusquea pinifolia*.

AMOSTRA	MORTALIDADE/CONCENTRAÇÃO (µg/mL)			DL <sub>50</sub> (µg/mL)	INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%(µg/mL)
	10	100	1000		
Ex. Bruto	1	0	1	>1000	-
F. Hexano	0	1	1	>1000	-
F. Clorofórmio	1	0	0	>1000	-
F. Acetato de Etila	0	1	1	>1000	-
F. Hidroalcoólica	0	0	1	>1000	-
Metanol	0	0	0	>1000	-
Sulfato de quinidina	2	5	10	99,92	63,78 – 255,67

FONTE: O autor (2018).

#### 4.9.2. Atividade hemolítica

Nas atividades hemolíticas do extrato bruto e frações do caule nota-se que a fração hexano teve uma maior porcentagem de hemólise correspondendo a maior concentração conforme pode ser visualizado na TABELA 14 e GRÁFICO 1.

Segundo Bukowska e Kowalska (2004) a hemólise pode ocorrer pela ação de compostos fenólicos por meio da oxidação da hemoglobina. Solventes como acetato de etila e clorofórmio permitem a extração de flavonoides, entre outros compostos. Enquanto solventes de maior polaridade, como etanol extraem flavonas e flavonóis mais polares (ZUANAZZI e MONTANA, 2004).

TABELA 14 - ENSAIO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DA ESPECIE *Chusquea pinifolia*

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA ( $\mu\text{g/mL}$ )	% HEMÓLISE	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT*			
EX. BRUTO	100	0,957				d
	200	0,574				d
	500	10,342			c	
	800	30,0933		b		
	1000	37,395	a			
F. HEXANO	100	0,287			c	
	200	2,657			c	
	500	60,857		b		
	800	56,858	a			
	1000	48,695	a			
F. CLOROFÓRMIO	100	1,220				d
	200	3,208			c	
	500	3,495			c	
	800	7,828		b		
	1000	9,456	a			
F. ACETATO DE ETILA	100	0,454				d
	200	0,215				d
	500	0,406			c	
	800	0,718		b		
	1000	1,00	a			
F. HIDROALCÓLICA	100	1,771		b		
	200	2,226		b		
	500	2,968	a			
	800	3,638	a			
	1000	3,974	a			

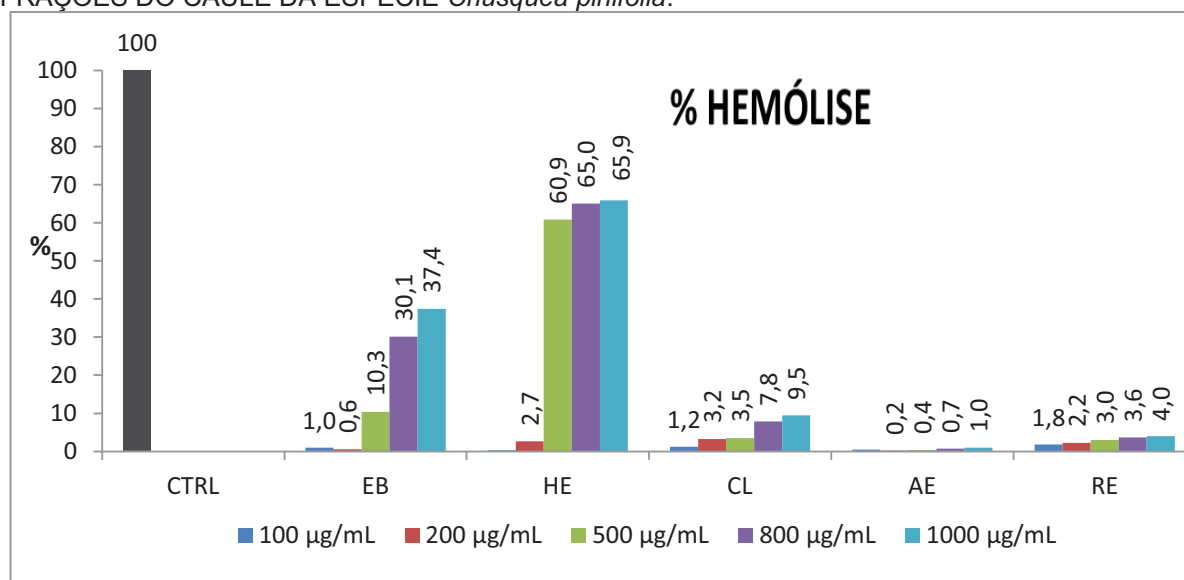


CONTROLE	-	100				
----------	---	-----	--	--	--	--

FONTE: O autor (2018).

(\*) - As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

GRÁFICO 1 - RESULTADOS DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA FRENTE AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DA ESPÉCIE *Chusquea pinifolia*.



FONTE: O autor (2018).

Na atividade hemolítica do extrato bruto e frações das folhas nota-se uma baixa atividade na fração remanescente e na concentração de 200µg/mL da fração hexano foi a que obteve melhor atividade, conforme pode ser visualizado na TABELA 15 e GRÁFICO 2.

Conforme (BIANCHI et al., 2000) compostos fenólicos podem inibir o processo de oxidação, dependendo de diversos fatores, sendo eles: doses ideais, concentração adequadas para obter proteção e mecanismos de defesa antioxidante que podem limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos.

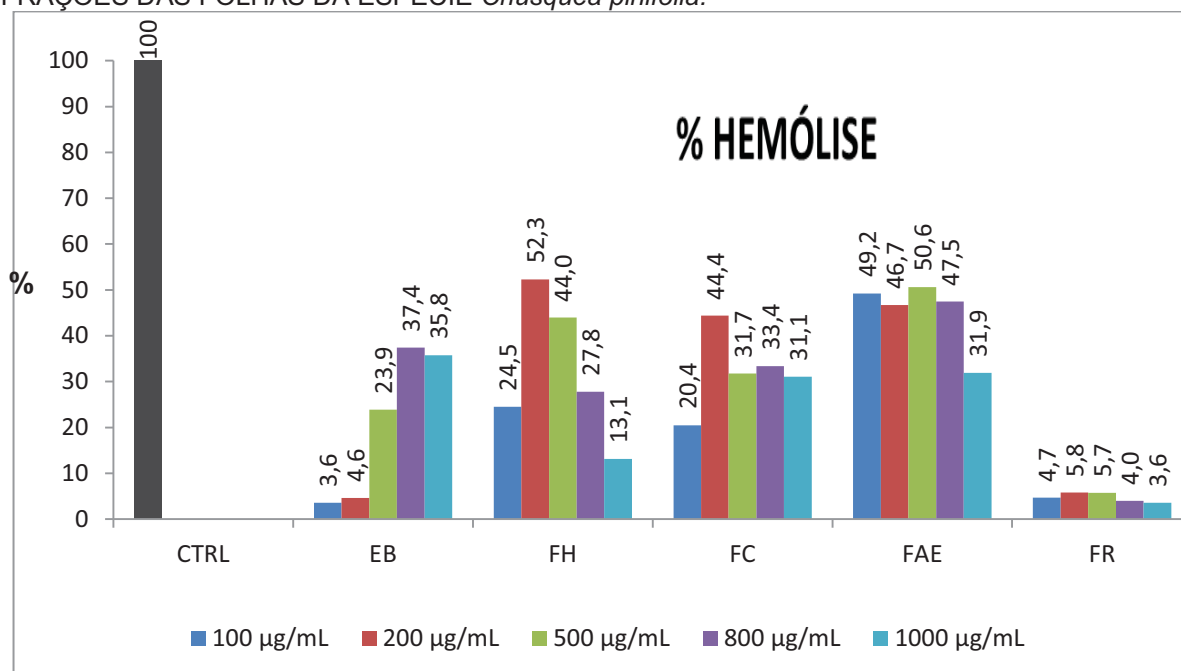
TABELA 15 - ENSAIO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DA ESPECIE *Chusquea pinifolia*

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA ( $\mu\text{g/mL}$ )	% HEMÓLISE	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT*			
EX. BRUTO	100	3,591			c	
	200	4,620			c	
	500	23,868		b		
	800	37,443	a			
	1000	35,767	a			
F. HEXANO	100	24,491		b		
	200	52,286	a			
	500	43,954	a			
	800	27,771	a			
	1000	13,119	a			
F. CLOROFÓRMIO	100	20,445	a			
	200	44,409	a			
	500	31,745	a			
	800	33,373	a			
	1000	31,050	a			
F. ACETATO DE ETILA	100	49,245	a			
	200	46,708	a			
	500	50,634	a			
	800	47,450	a			
	1000	31,888	a			
F. HIDROALCÓLICA	100	4,716	a			
	200	5,769	a			
	500	5,745	a			
	800	3,998	a			
	1000	3,567	a			
CONTROLE	-	100				

FONTE: O autor (2018).

(\*) - As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

GRÁFICO 2 - RESULTADOS DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA FRENTE AO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DA ESPÉCIE *Chusquea pinifolia*.



FONTE: O autor (2018).

#### 4.10. ATIVIDADES ANTIOXIDANTES

##### 4.10.1. Redução do radical DPPH

Para interpretação desta análise foi calculada a porcentagem de inibição do DPPH e por regressão linear foi possível calcular o IC<sub>50</sub> que é a concentração inibitória da amostra que reduz 50% da concentração inicial de DPPH. As amostras foram comparadas com os padrões Vitamina C e Rutina.

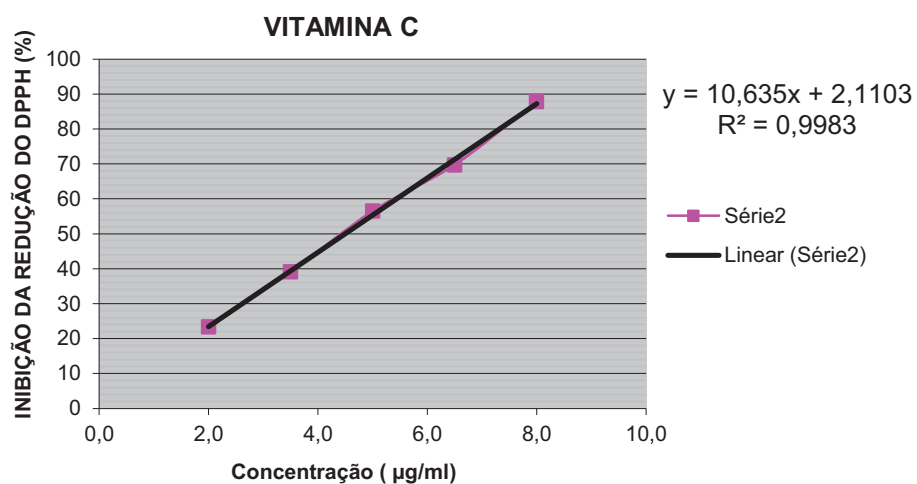
Os gráficos apresentam 5 pontos que se referem as concentrações utilizadas de cada amostra as quais também são expressas em porcentagem de inibição da redução do DPPH. O cálculo do IC<sub>50</sub> pode ser feito através de equação da reta que foi determinada pelos 5 pontos nos gráficos.

Os GRÁFICOS 3 e 4 se referem os padrões Vitamina C e Rutina, os GRÁFICOS 5 a 8 se referem ao extrato bruto e frações do caule e os gráficos 9 a 12 se designam ao extrato bruto e frações das folhas.

Os antioxidantes provenientes de fontes naturais podem ser utilizados na indústria alimentícia em substituição aos antioxidantes sintéticos, podem agregar

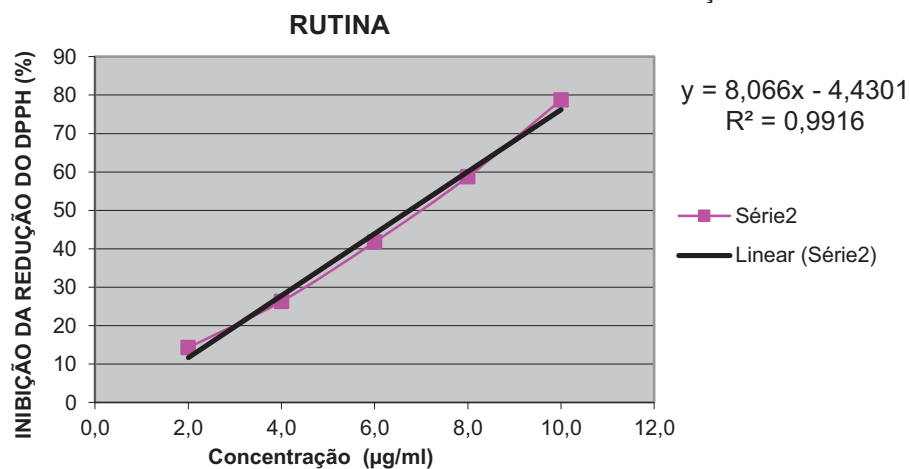
com novas possibilidades em tratamentos e prevenções de doenças (FAJEMIROYE et al., 2012).

GRÁFICO 3 - CURVA PADRÃO DA VITAMINA C PELA REDUÇÃO DO DPPH.



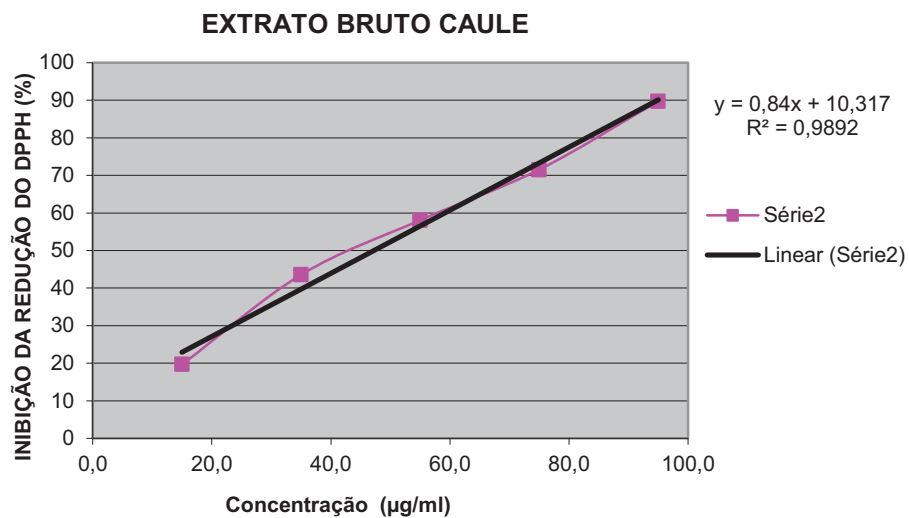
FONTE: O autor (2018).

GRÁFICO 4 - CURVA PADRÃO DA RUTINA PELA REDUÇÃO DO DPPH.



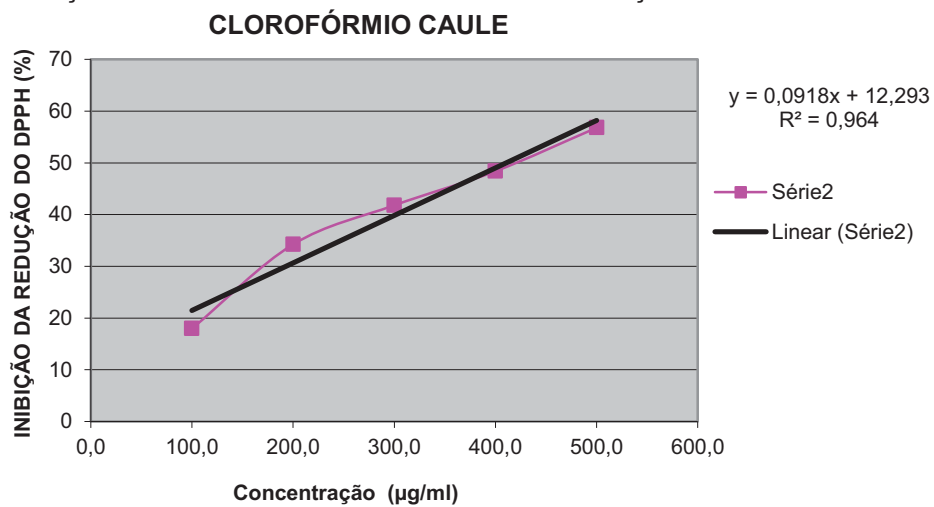
FONTE: O autor (2018).

GRÁFICO 5 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Chusquea pinifolia* DO EXTRATO BRUTO DO CAULE PELA REDUÇÃO DO DPPH.



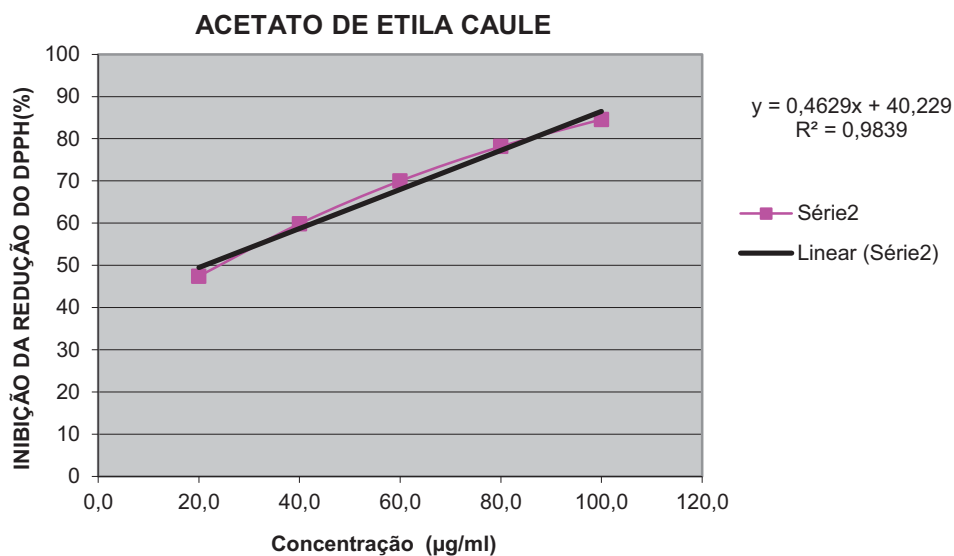
FONTE: O autor (2018).

GRÁFICO 6 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Chusquea pinifolia* DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DO CAULE PELA REDUÇÃO DO DPPH.



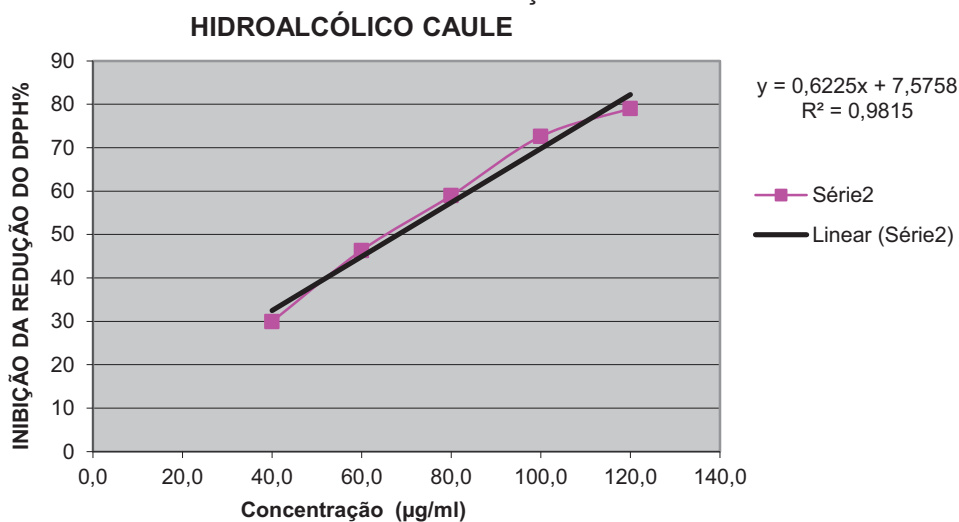
FONTE: O autor (2018).

GRÁFICO 7 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Chusquea pinifolia* DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DO CAULE PELA REDUÇÃO DO DPPH.



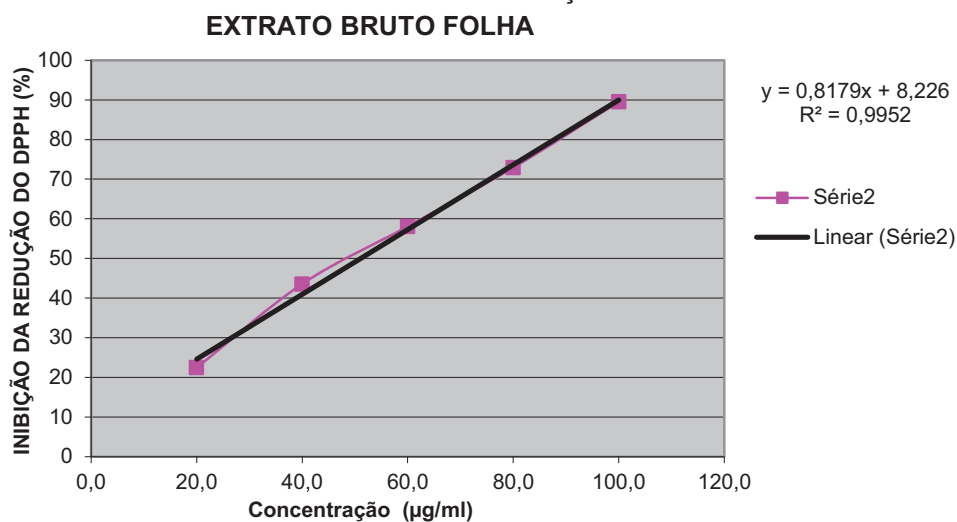
FONTE: O autor (2018).

GRÁFICO 8 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Chusquea pinifolia* DA FRAÇÃO HIDROALCÓLICA DO CAULE PELA REDUÇÃO DO DPPH.



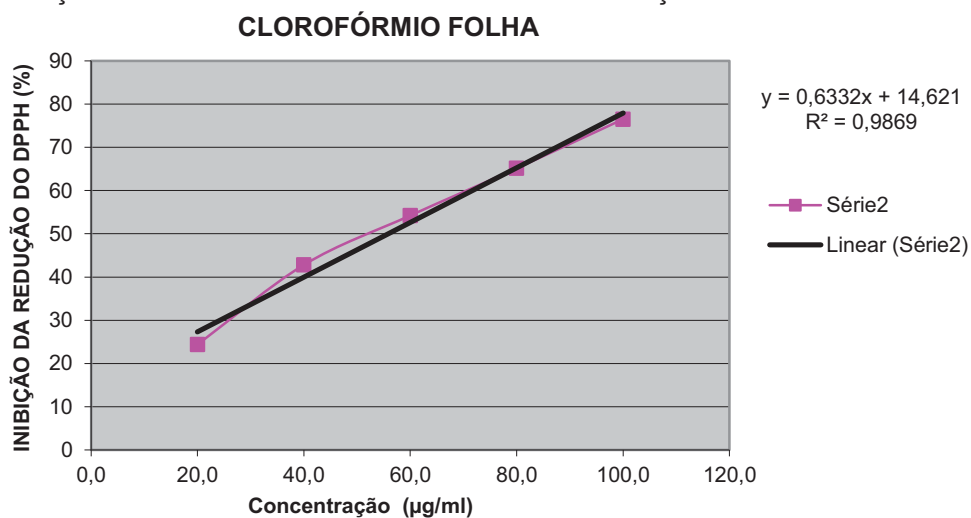
FONTE: O autor (2018).

GRÁFICO 9 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Chusquea pinifolia* DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS PELA REDUÇÃO DO DPPH.



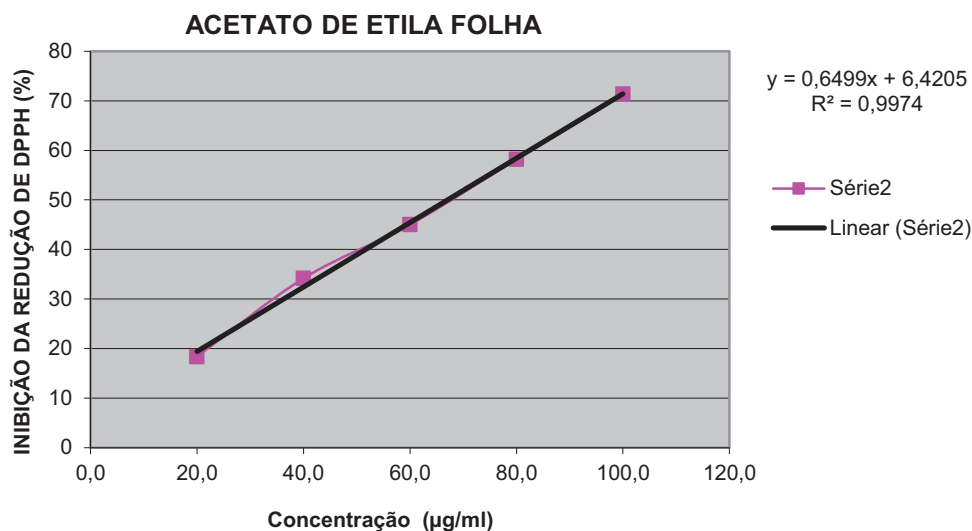
FONTE: O autor (2018).

GRÁFICO 10 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Chusquea pinifolia* DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DAS FOLHAS PELA REDUÇÃO DO DPPH.



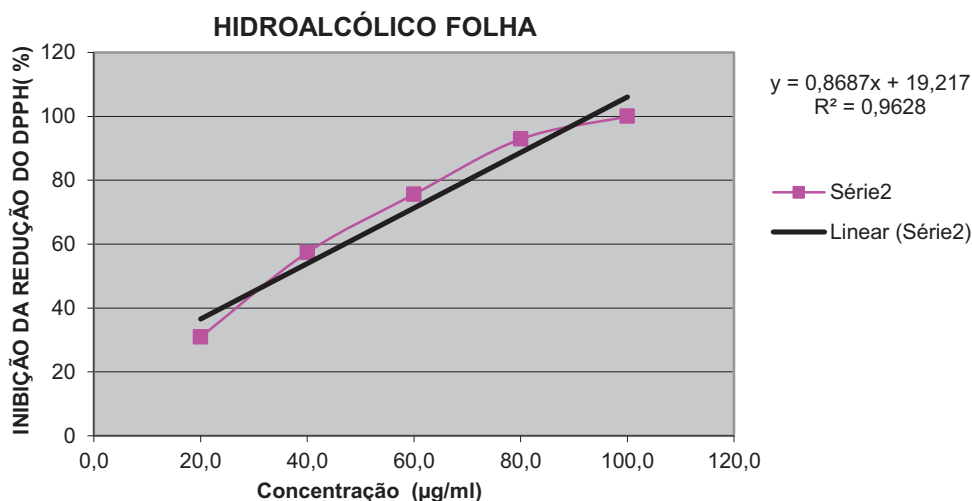
FONTE: O autor (2018).

GRÁFICO 11 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Chusquea pinifolia* DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS PELA REDUÇÃO DO DPPH.



FONTE: O autor (2018).

GRÁFICO 12 - CURVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Chusquea pinifolia* DA FRAÇÃO HIDROALCÓLICA DAS FOLHAS PELA REDUÇÃO DO DPPH.



FONTE: O autor (2018).

Os resultados de IC<sub>50</sub> estão expressos na TABELA 16 juntamente com a análise estatística a qual foi utilizada análise de variância – ANOVA para verificar a diferença estatística e Tukey (p<0,05) para localização das diferenças estatísticas.

Segundo Okonogi et al. (2007) os compostos ativos presentes nas plantas são responsáveis pela atividade antioxidantes, e a quantidade destes compostos em cada parte da planta é usualmente diferente.



TABELA 16 – RESULTADOS IC<sub>50</sub> E TUKEY DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS E DO CAULE DA ESPECIE *Chusquea pinifolia*.

	AMOSTRA	IC <sub>50</sub> (µg/mL)	CLASSIFICAÇÃO TESTE TUKEY								
			A	B	C	D	E	F	G	H	
CONTROLES	VIT C	4,46	A								
	RUTINA	5,64	A								
CAULE	EB	47,22				d					
	FH	-									
	FCL	82,31									h
	FAE	21,00		b							
	FHR	36,45			c						
	EB	51,07					e				
FOLHA	FH	-									
	FCL	55,87						f			
	FAE	67,05								g	
	FHR	36,45			c						
	EB	51,07					e				

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

FONTE: O autor (2018).

As frações remanescentes hidroalcólicas do caule e folhas tiveram as melhores atividades oxidantes, com exceção apenas da fração acetato de etila do caule. Existe uma maior solubilidade das substâncias antioxidantes em solventes polares, pois o ensaio de DPPH quantifica a capacidade das substâncias em doar hidrogênio radicalar a este radical, assim quanto mais hidroxilas presentes na amostra, maior será a polaridade e o potencial antioxidante (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

#### 4.10.2. Formação do Complexo Fosfomolibdênio

As atividades antioxidantes (TABELAS 17 e 18) foram avaliadas para os extratos brutos da folha e do caule juntamente com suas frações (hexano,

clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente). Considerando as atividades dos padrões vitamina C, rutina e BHT como 100%.

Constituintes fenólicos, flavonoides e taninos são compostos que possuem propriedades redutoras, sendo capazes de neutralizar radicais livres, complexar com metais de transição (manganês, ferro, cobre, vanádio, cobre, cálcio, alumínio) e interromper a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica (PODSEKEK, 2007; MIN e EBELER, 2008).

TABELA 17 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS FOLHAS DA ESPÉCIE *Chusquea pinifolia*.

AMOSTRA	ATIVIDADE	ATIVIDADE	ATIVIDADE
	ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO À VIT C AAR(%) ± DP	ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO À RUTINA AAR(%) ± DP	ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO À BHT AAR(%) ± DP
VIT C	100 a1	-	-
RUTINA	-	100 a1	-
BHT	-	-	100 a1
EB	14,89 ± 0,935 a3	56,01 ± 3,516a3	37,18 ± 2,334 a3
FH	10,68 ± 0,513 a4	40,15 ± 1,930 a4	26,65 ± 1,281 a4
FCL	18,23 ± 0,656 a2	68,64 ± 2,466 a2	45,50 ± 1,637 a2
FAE	7,21 ± 0,311 a5	27,11 ± 1,172 a5	17,99 ± 0,778 a5
FHR	10,20 ± 0,204 a4	38,36 ± 0,767 a4	25,46 ± 0,509 a4

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

FONTE: O autor (2018).

Analisando os resultados obtidos (TABELA 17), nota-se que os extratos e as frações de caule e folha da espécie *Chusquea pinifolia* apresentam atividade antioxidante por redução do complexo fosfomolibdênio.

TABELA 18 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELA REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DO CAULE DA ESPÉCIE *Chusquea pinifolia*.

AMOSTRA	ATIVIDADE	ATIVIDADE	ATIVIDADE
	ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO À VIT C AAR(%) ± DP	ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO À RUTINA AAR(%) ± DP	ANTIOXIDANTE EM RELAÇÃO À BHT AAR(%) ± DP
VIT C	100 a1	-	-
RUTINA	-	100 a2	-
BHT	-	-	100 a1
EB	11,90 ± 0,424 a5	44,75 ± 1,597 a4	29,71 ± 1,060 a4
FH	14,28 ± 0,539 a4	53,70 ± 2,030 a4	35,65 ± 1,347 a3
FCL	41,08 ± 0,424 a2	154,47 ± 1,597 a1	100,68 ± 4,272 a1
FAE	23,46 ± 0,935 a3	88,23 ± 3,516 a3	58,57 ± 2,334 a2
FHR	6,80 ± 0,424 a6	25,57 ± 1,597 a5	16,97 ± 1,060 a5

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

FONTE: O autor (2018).

Comparando as atividades expressas (TABELAS 17 e 18) com o padrão vitamina C, a maior atividade foi da fração clorofórmio tanto para folha quanto para caule obtendo respectivamente 18,23% e 41,08%.

## 5. CONCLUSÃO

A espécie *Chusquea pinifolia* é endêmica da região Sul e Suldeste do Brasil e pertence à família Poaceae. Na literatura apresentam-se poucos estudos até o presente momento, sendo nenhum deles sobre seu estudo fitoquímico. Foram realizados estudos das partes aéreas da espécie (caule e folhas), em screening fitoquímico preliminar pode-se notar a presença de alguns metabólitos secundários como: flavonoides, alcaloides, cumarinas, esteroides e/ou triterpenos, heterosídeos saponínicos e taninos condensados nas partes aéreas das plantas.

Foram isolados dois cristais distintos das frações hexano do caule e clorofórmio da folha respectivamente, identificados como: o triterpeno (Friedelina) e o flavonoide, 5,7 diidroxiflavona (Tricin).

Realizaram-se duas técnicas de doseamentos, sendo elas para flavonoides totais e polifenóis, confirma-se maior presença de flavonoides nas folhas comparada ao caule nos diferentes extratos e frações sendo o extrato bruto da folha foi o que obteve maior rendimento com (53,7 mg EQ g<sup>-1</sup>), e a presença de polifenóis destacou-se com melhor rendimento a fração clorofórmio da folha com (216,0 mg EG g<sup>-1</sup>).

Frente ao teste de toxicidade em *Artemia salina*, os extratos e as frações das partes aéreas foram comparados com o controle sulfato de quindina e mostrou-se não tóxicos contra os náuplios, devido aos testes apresentarem um valor de DL50 superior a 1000 µg/mL, sendo este um valor máximo para amostra ser considerada tóxica.

No ensaio de atividade hemolítica as amostras foram comparadas ao controle Triton X-100, sendo para extrato bruto e frações das folhas destaca-se a fração hexano que obteve 52,3% de taxa de hemólise e para o extrato bruto e frações do caule nota-se nas concentrações de 500, 800 e 1000 µg/mL da fração hexano valores de hemólise 60,9%, 65% e 65,9% respectivamente.

Para atividade antioxidante realizou-se o teste do radical DPPH no qual nenhum extrato ou fração se igualou estatisticamente aos padrões VIT C e Rutina, sendo a fração que mais se aproximou estatisticamente foi a de acetato de etila do caule com valor de IC50 21 µg/mL seguida das frações remanescente do caule e da folha com IC50 36,45 µg/mL. No ensaio do complexo fosfomolibdênio as atividades foram baixas comparadas aos padrões, sendo a fração clorofórmio tanto para o

caule quanto para folha que obteve melhores resultados, com 18,23% para fração clorofórmio folha e 41,08% para fração clorofórmio caule comparados ao padrão VIT C.

Sendo estes resultados inéditos sobre a espécie *Chusquea pinifolia* acrescenta a literatura informações para possíveis estudos futuros. A espécie é de grande importância, apresenta ausência de toxicidade *in vitro*, significativos resultados de atividade antioxidante e foram evidenciados metabólitos de interesse com atividades biológicas e farmacológicas promissoras. Tais resultados avaliados nas frações e extratos brutos se tornam alvo para estudos futuros *in vivo* para esta espécie.

## REFERÊNCIAS

- BANERJEE, A.; KUNWARB, A.; MISHRAB, B.; PRIYADARSINIB, K.I. Concentration dependent antioxidant/pro-oxidant activity of curcumin studies from AAPH induced hemolysis of RBCs. **Chemico-Biological Interactions**, v. 174, p. 134-139, 2008.
- BASER, K. H. C.; DEMIRCI, B. Studies on Betula essential oils. **ARKIVOC**, v.7, p.355-348, 2007.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n.2, p. 123-130, 2000.
- BUKOWSKA, B.; KOWALSKA, S. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. **Toxicology Letters**. 152: 73-84, 2004.
- BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**, volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010. 904p., 2v/il.
- CALDERÓN, C. E.; SODERSTROM, T. R.; The genera of Bambusoideae (*Poaceae*) of the American continent: keys and comments . **Smithsonian Contributions to Botany**, 44 (1980), pp. 1–27.
- CARVALHO, J. S. L.; CUNICO, M. M.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., BRASSICACEAE por sistema soxhlet modificado. **Química Nova**. Vol. 32, No. 4, 1031-1035, 2009.
- CARVALHO, E. B. et al. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 149-152, 2007.
- CARVALHO, J. L. S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico de *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2001.
- CHANG, C. C. et al. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. **Journal of Food and Drug Analysis**. 10: 178-182 p. 2002.
- Flora do Brasil 2020 under construction**. *Chusquea*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB13085>>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2018.
- CLAYTON, W. D.; RENVOIZE, S. A. (1986) Genera Graminum. **Grasses of the World**. Her Majesty's Stationery Office, London.

CLARK, L. G. Diversity, biogeography and evolution of *Chusquea*. ,in: G.P Chapman (Ed.), **The Bamboos, Linnean Society Symposium Series**, vol. 19, Academic Press, San Diego (1997), pp. 33–44.

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

CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. Triterpenoids. **Nat. Prod. Rep.** v.24, p.465, 2007.

CORDEIRO, P. J. M.; VILEGAS, J. H. Y.; LANCAS, F. M. HRGC-MS analysis of terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* ("espinheira santa"). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 10, n. 6, p. 523-526, 1999.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants Hormones**, Rockville: **American Society of Plant Physiologists**, 2000. CRUZ, J. C.; KARAM D.; MONTEIRO, M. A. R; MAGALHÃES, P. C. **A Cultura do Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. 517p.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; DOS SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, p. 446-452, 2006.

DEWICK, P. M. The mevalonate and methylerythritol phosphate pathways: terpenoids and steroids. In: **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 3 ed, Chichester: John Wiley e Sons, 2009. Cap. 5, p. 187-306.

DI STASI, L. C.; GOMES, J. C.; VILEGAS, W. Studies on anti-allergic constituents in the leaves and stems of *Anchientia salutaris* var. *martiana* (Violaceae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 6, p. 890-893, 1999.

DOWNES, R. W. 1969. Differences in transpiration rate between tropical and temperate grasses under controlled conditions. **Planta** 88:261-273.

DYSON, T. Population and food: global trends and future prospects. **Routledge, London** (1996), p. 227.

JUDZIEWICZ, E.J.; CLARK, L.G.; LONDOÑO, X.; STERN, M. J. **American Bamboos**, Smithsonian Institution Press, WASHINGTON, DC (1999).

FAO; **Summary of world food and agricultural statistics 2005** FAO, Rome (2005), p. 64.

FAJEMIROYE, J. O.; GALDINO P. M.; ALVES S. F. Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> in the anxiolytic-like effect of dichloromethane fraction of *Pimenta pseudocaryphyllus*. **Journal of Ethnopharmacology**, vol.3, pp.872-877, 2012.

FILGUEIRAS, T.S.; LONGHI-WAGNER, H. M.; VIANA, P. L.; ZANIN, A.; OLIVEIRA, R. C.; CANTO-DOROW, T. S.; SHIRASUNA, R. T.; VALLS, J. F. M.; OLIVEIRA, R.

P.; RODRIGUES, R. S.; SANTOS-GONÇALVES, A. P.; WELKER, C. A. D.; FERREIRA, F. M.; CARVALHO, M. L. S.; SILVA, A. S.; REIS, P. A.; DÓREA, M. C.; SILVA, C.; MOTA, A. C. *Poaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010.

FILGUEIRAS, T. S.; SANTOS-GONÇALVES, A. P. A checklist of the basal grasses and bamboo in Brazil (*Poaceae*). **The Journal of the American Bamboo Society** 18: 7-18, 2004.

GARCÍA, A. A., CARRIL, E. P-U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca** (Biologia). Serie Fisiologia Vegetal, Madrid, v.2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GOMES, R. V. R. S.; VILELA, V. L. R.; GOMES, E. N.; MAIA, A. J.; ATHAYDE, A. C. R. Análise Fitoquímica de Extratos Botânicos Utilizados no Tratamento de Helmintoses Gastrointestinais de Pequenos Ruminantes. **Revista Caatinga, Mossoró**, v. 24, n. 4, p. 172-177, 2011.

GONZÁLES, P.; NAVARRO, E.; TORRE, M I. L.; CANO, A. La Familia Poaceae del Distrito de Arahuyaya (Canta, Lima, Peru). **Rev. Peru. Biol.** v. 18, n. 2, p. 189-196, 2011.

HENNEBERG, R. Estudo do efeito antioxidante de polifenóis em eritrócitos de pacientes de hemoglobina S. 2013. 181 f. **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

KUNTH, C. S. **Journal de Physique, de Chimie, d'Histoire Nat** **Journal de Physique, de Chimie, d'Histoire Naturelle et des Arts** 95: 151. 1822 **Journal de Physique, de Chimie, d'Histoire Naturelle et des Arts** 95: 151. 1822.

LÜCKER, J., BOUWMEESTER, H. J., AHARAONI, A. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. In: VERPOORTE R.; ALFERMANN, A. W.; JOHNSON, T. S. (Eds.). **Applications of plant metabolic engineering**. Springer, p. 219–236, 2007

LI, M.; PU, Y.; YOO, C. G.; RAGAUSKAS, A. J.; The occurrence of tricetin and its derivatives in plants. **Green Chemistry**. p. 1439 – 1454, 2016.

MACIEL, M. A. M; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. J. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. London; New York York: Academic Press, 1982.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F.; LEITÃO, G.; REIS, A.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C.; LEITÃO, S. G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MERINO, J. Z. F. ESTUDOS FITOQUÍMICO, TOXICOLÓGICO *in vitro*, ANTIBACTERIANO, ALELOPÁTICO E ANTIOXIDANTE DA ESPÉCIE VEGETAL *Senecio westermanii* Dusén, ASTERACEAE. Dissertação (**Mestrado em Ciências**



**Farmacêuticas) – Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, 2014.**

CARVALHO, E.B. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 149-152, 2007.

MIGUEL, O. G. **Ensaio sistemático de análise fitoquímica. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR.** Curitiba, 2003.

MIN, K.; EBELER, S. E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n.1, p. 96-104, 2008.

MIRANDA, M. A. Solanum cernuum Vell: estudo fitoquímico, avaliação das atividades gastroprotetora, antimicrobiana, citotóxica e obtenção do extrato seco por spray dryer. **Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas**, Universidade de São Paulo, 2015.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH• assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, p. 1036-1043, 2012.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna farmacêutica**, v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

MUÑOZ, A. et al. Respuesta inicial de la regeneración arbórea luego de la floración y muerte de *Chusquea culeou* (Poaceae) en bosques andinos del centro-sur de Chile. **Universidad Austral de Chile. BOSQUE** 33(2): 153-162, 2012.

NEGRELLE, R. R; GOMES, E. C; *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf: chemical composition and biological activities [J]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, 9 (1), p. 80–97, 2007.

OKONOZI, S.; TACHAKITTIRUNGROD, S.; CHOWWANAPHOONPOHN, S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. **Food Chem.**, v. 103, p. 381-388, 2007.

PAULA, C. S.; CANTELI, V. C. D.; VERDAM, M. C. S.; KALEGARI, M.; CAMPOS, R.; HIROTA, B. C. K.; MIGUEL, O. G. M.; MIGUEL, M. D. Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 189-195, 2014.

PERES, L. E. P. Metabolismo secundário. **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, p.1-26.2004. Disponível em: <[http://docentes.esalq.usp.br/lazaropp/FisioVegGrad\\_Bio/MetSec.pdf](http://docentes.esalq.usp.br/lazaropp/FisioVegGrad_Bio/MetSec.pdf)>. Acesso em: 22 de fevereiro de 2018.

PETROBRAS. PETROBRÁS N-2588: Determinação da toxicidade aguda de agentes tóxicos em relação à *Artemia sp.* **CONTEC - Comissão de normas técnicas**, 1996.

PELKA, M.; DANZL, C.; DISTLER, W.; PETSCHERT, A. A new screening test for toxicity testing of dental materials. **J Dent.** v. 28, p. 341-345, 2000.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v.269, p.337-341, 1999.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants capacity of brassica vegetables: a review. **LWT: Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 40, p. 1-11, 2007.

RAMESH, N. et al. Phytochemical and antimicrobial studies of *Begonia malabarica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 1, p. 129-132, 2002.

RENATA, K. Isolamento e identificação de triterpenos friedelanos de *Maytenus robusta* Reis. **Dissertação (Mestrado em Química) – Curso de Pós Graduação em Química**, Universidade Federal de Santa Catarina, 122p, 1996.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997.

RODRÍGUEZ, G. R. C. Los bambúes nativos de México. México: **Laboratório de Botânica, Instituto Tecnológico de Chetumal**, 2005.

SAFFORD, H. D. Brazilian Paramos I. An introduction to the physical environment and vegetation of the campos de altitude. **Journal of Biogeography, Oxford**, v. 26, p. 693-712, 1999a.

SALEH N., NOZZOLILLO, C.; ALTOSAAR, I. **Flavonoid variations in Avena species**. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 16, p. 597-599, 1988.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. 4. ed. Tradução de Glenda M. de Souza. Barueri-SP: Editora Manole, 386 p, 2002.

SHIRAZUNA, R. T. OLIVEIRA, R. P. MOTA, A. C. **Chusquea in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB13111>>.

BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, v. 66, n. 4, p. 1085-1113, 2015.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: 6ªEd. UFRGS, p. 230, 237, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS/ Ed. UFSC, 833 p, 2001.

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. **American Journal of Enology and Viticulture** v. 28, n. 1, p. 49-55, 1977.

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre e Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999.

SOUSA, C.M.; SILVA, H.R.E.; VIEIRA-JR, G.M., AYRES, M.C.C., COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova** v. 30, p. 351-355, 2007.

TERRA, G. R. A. Aspectos da história de vida de *Guadua tagoara* (Nees) Kunth (Poaceae: Bambuseae) na Serra dos Órgãos, RJ. 2007. f. **Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, SP. 113p, 2007.**

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): p. 709-713, 2014.

TRAMUJAS, A. P. A vegetação dos campos de altitude na região do Ibitiraquire – Serra do Mar – Municípios de Antonina, Morretes e Campina Grande do Sul, Paraná. 2000. **Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.**

URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C.; LIMA, E ; GUIMARÃES, D. H. V. **A importância de não queimar a palha na cultura da Cana-de-açúcar** (Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária/ EMBRAPA/ CNPDS). Circular técnica nº 5, p. 1-6, 1991.

VEBLEN, T. T. Growth patterns of *Chusquea* bamboos in the understory of Chilean *Nothofagus* forests and their influences in forest dynamics; **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, 109, p. 474–487, 1982.

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: p. 1326-1336, 2008.

ZUANAZZI, J. A. S; MONTANA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ L.A.; PETROVICK, P.R.

**Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre: Editora UFRG, p. 577-614, 2004.

WATSON, L., DALLWITZ, M. J. Grass genera of the world: descriptions, illustrations, identification and information retrieval; including synonyms, morphology, anatomy, physiology, phytochemistry, cytology, classification, pathogens, world and local distribution, and references. 1992.

WELKER, C. A. D.; LONGHI-WAGNER, H. M. A família *Poaceae* no Morro Santana, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 4, 2007.

WU, Y.; ZHOU, K.; TOYOMASU, T.; SUGAWARA, C.; OKU, M.; ABE, S.; Functional characterization of wheat copalyl diphosphate synthases sheds light on the early evolution of labdane-related diterpenoid metabolism in the cereals; **Phytochemistry**, v. 84, p. 40–46, 2012.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
 MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE  
 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

**AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO  
 GENÉTICO REALIZADA DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO CGEN Nº35,  
 DE 27 DE ABRIL DE 2011  
 Nº 03/2014**

**O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS**, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 40, de 24 de setembro de 2003, para autorizar instituição nacional, pública ou privada, que exerça atividade de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, **autoriza** com amparo na Resolução CGEN nº 35, de 27 de abril de 2011, que dispõe sobre regularização de atividades de acesso ao patrimônio genético e/ou ao conhecimento tradicional associado e sua exploração econômica realizadas em desacordo com a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001 e demais normas, **as atividades de acesso ao patrimônio genético desenvolvidas pela:**


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**, CNPJ/MF nº. 75.095.679/0001-49, situada na Rua XV de Novembro, 1299, Curitiba-PR, CEP: 80060-000, e representada na pessoa do Reitor Zaki Akel Sobrinho, RG nº. 1.439.536-9 SSP/PR, CPF nº. 359.063.759-53, no âmbito das atividades do projeto de pesquisa "*Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais*".

**Objetivo da Autorização:** Avaliar sob aspecto morfoanatômico, químico e biológico das espécies acessadas constantes do projeto de pesquisa.

**Período das atividades: 2000 a 2019.**

**Validade da Autorização:** Cinco anos, contados da assinatura. Em razão da continuidade do projeto de pesquisa, a instituição detentora desta autorização deverá enviar ao Ibama, a partir da emissão da licença, relatório anual sobre a execução das atividades de pesquisa, nos termos do Decreto nº 4.946/2003 e Resolução CGEN nº 41/2013. Endereço para envio do relatório: IBAMA/DBFLO, SCEN L4 Norte, Bloco B, Brasília-DF, CEP: 70818-900.

Esta autorização das atividades de acesso está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do processo nº 02001.001165/2013-47.

  
 Volney Zanardi Junior  
 Presidente

Brasília, 17 de março de 2014.