

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica**

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE E ANTI-TIROSINASE EM EXTRATOS DE *Merostachys pluriflora*
MUNRO EX E.G. CAMUS (Poaceae: Bambusoideae)**

Matheus Martins Sobrinho

**Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.**

**Orientador:
Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno**

São Paulo

2022

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de abreviaturas	3
Resumo	4
1. INTRODUÇÃO	5
1.1 Bambu	5
1.2 Atividade Antioxidante	6
1.3 Atividade Anti-tirosinase	7
2. OBJETIVOS	8
2.1 Objetivo Geral	8
2.2 Objetivos Específicos	8
3. MATERIAIS E MÉTODOS	9
3.1 Extração	9
3.1.1 Material Vegetal	9
3.1.2 Preparação dos extratos	9
3.1.3 Secagem	9
3.1.4 Fracionamento do Extrato	9
3.2 Isolamento e Identificação dos Compostos Ativos	10
3.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	10
3.2.2 Filtração em Celite®	10
3.2.3 Cromatografia em Coluna	10
3.2.4 HPLC	11
3.3 Determinação de atividade antioxidante	11
3.5 Determinação de atividade anti-tirosinase	12
4. RESULTADOS	13
5. CONCLUSÃO	21
6. REFERÊNCIAS	22

Lista de abreviaturas

HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
UV/Vis	Ultravioleta/Visível
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
Rf	Fator de Retenção

Resumo

SOBRINHO, M.S. **ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-TIROSINASE EM EXTRATOS DE *Merostachys pluriflora* MUNRO EX E.G. CAMUS (Poaceae: Bambusoideae).** 2022. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Palavras-chave: Bambus, Antioxidantes, Tirosinase, Fenólicos

INTRODUÇÃO: Bambus são largamente utilizados em diversas áreas, como construção civil e na medicina, mas não existem estudos aprofundados sobre a composição química e atividade biológica das espécies americanas. A espécie *Merostachys pluriflora* Munro ex E.G. Camus já demonstrou atividade antioxidante e fotoprotetora. **OBJETIVO:** Este trabalho teve como objetivo determinar as substâncias responsáveis por essas atividades e da atividade anti-tirosinase. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram preparados extratos hidro etanólicos (60%) dos colmos em Soxhlet. O extrato bruto foi particionado e separado em frações hexânica, clorofórmica e de acetato de etila. A fração clorofórmica apresentou a maior atividade antioxidante e anti-tirosinase, mas continha uma grande quantidade de clorofila. A fração foi submetida à filtração em Celite[®]. A fração filtrada foi submetida a cromatografia em coluna, originando 5 subfrações. O perfil da composição dessas subfrações foi analisado por CCD e, após, agrupadas por semelhança. As subfrações foram analisadas por HPLC com detector por arranjo de diodo e sua composição determinada pela análise de absorção UV/Vis e tempos de retenção frente a um conjunto de padrões. **RESULTADOS:** A atividade antioxidante mais intensa foi encontrada nas subfrações 2, 3 e 4. O ácido *p*-cumárico foi o composto majoritário nas subfrações 2 e 3, e pode ser um dos principais responsáveis pela atividade antioxidante. A atividade anti-tirosinase foi mais intensa na subfração 4, onde foram detectados possíveis flavonóides de acordo com o espectro de absorção. Nessa subfração foram detectadas várias substâncias compatíveis com os espectros de flavonóides, que podem ser os responsáveis pela atividade anti-tirosinase. **CONCLUSÃO:** Estes resultados demonstram a capacidade deste bambu, oferecendo a possibilidade de aprofundamento nos estudos fitoquímicos e biológicos.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Bambu

Há muito tempo que bambus são usados no sudeste da Ásia como material de construção, móveis, encanamentos e de embalagem de alimentos para evitar a deterioração. Nessa região, a medicina tradicional emprega também as folhas de bambus em tratamentos de hipertensão, arteriosclerose, doenças cardiovasculares, e certas formas de câncer. Essas propriedades terapêuticas foram relacionadas com a atividade antioxidante dos bambus. Na China, uma preparação com folhas de bambus foi permitida pelo Ministério da Saúde local para ser usada como aditivo em alimentos devido a sua função antioxidante. O extrato contém flavonóides, lactonas e ácidos fenólicos, onde as flavonas C-glicosiladas costumam ser as mais abundantes, tais como: orientina, homo-orientina, vitexina e isovitexina (ZHANG et al. 2005).

Diversos estudos relacionados à atividade biológica de extratos de diversos bambus já foram realizados. O bambu *Sasa senanensis* (Franch. & Sav.) Rehder, originário do Japão, comprovou ser capaz de sequestrar radicais aniônicos de superóxido (KUROKAWA et al. 2010). O extrato da droga vegetal *Caulis bambusae*, obtido das aparas dos colmos de algumas espécies de bambu, foi verificado que este apresentava uma função antitumoral frente a quatro tipos diferentes de tumores graças à grande quantidade de triterpenos presentes nesse extrato (LU et al. 2006).

Existem poucos estudos sobre os compostos e a atividade bioquímica das espécies de bambu nativas do território brasileiro. Em comparação com a exploração de bambus asiáticos, o Brasil não desenvolveu grande interesse nessa subfamília das gramíneas (Bambusoideae), principalmente para aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica, apesar de sua grande diversidade. Observa-se que há aproximadamente 32,5% das espécies latino-americanas no território nacional, o que mostra o contraste entre a disponibilidade de matéria-prima e sua aplicação (LONDOÑO et al. 1998).

O potencial antioxidante de *Merostachys pluriflora* Munro ex E.G. Camus foi demonstrado anteriormente, apresentando um IC₅₀ de 174 µg/mg, isto é, a

concentração necessária do extrato de colmos para reduzir em 50% a concentração do radical DPPH (WRÓBLEWSKA et al. 2019). A capacidade de neutralizar radicais livres é um bom indicativo da presença de compostos antioxidantes. Em um estudo com outras espécies de Bambu foi demonstrado que a quantidade de compostos fenólicos é consideravelmente maior que a de flavonoides nos colmos, sendo até 25 vezes maior em massa. Esses compostos foram encontrados majoritariamente em partições do extrato bruto utilizando clorofórmio e acetato de etila (GAGLIANO et al. 2016).

1.2 Atividade Antioxidante

Antioxidantes são compostos que sofrem oxidação mais rapidamente que outras substâncias, ou seja, protegem uma célula ou os tecidos de reagir com radicais livres, formados principalmente como produtos do metabolismo. Os radicais livres têm grande importância no anabolismo e catabolismo, mas as grandes quantidades de radicais podem levar ao chamado “estresse oxidativo”, caracterizado pelo desbalanceamento entre pró-oxidantes e antioxidantes (VALKO et al., 2006; MANGIALASCHE et al., 2009; USORO & MOUSA, 2010; GÜLÇİN, 2012). O estresse oxidativo pode causar danos a diversas biomoléculas, incluindo o DNA, gerando mutações e prejudicando o funcionamento das células e tecidos do corpo.

Para determinar se uma substância possui potencial antioxidante, comumente usa-se o teste de sequestro de radicais com o radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila), substância que possui absorvância máxima em 515 nm, a qual diminui ao se oxidar (MAGALHÃES et al., 2008). As vantagens do método são: velocidade de execução; pouca amostra necessária para realização; fácil comparação com padrões de outros compostos com atividade antioxidante.

Os flavonoides são muito comuns no reino vegetal e, dependendo da espécie, têm formas e atividades diferentes, frequentemente ocorrendo como glicosídeos. Conforme a sua estrutura molecular, possuem um mecanismo de ação diferente, e além de serem bloqueadores de radiação UV, inibem os processos oxidativos nas células, modulando a indução de enzimas tais como peroxidase e redutase de glutathione, catalase e superóxido dismutase. A figura 1

mostra um exemplo de reação de flavonoides com radicais livres, mostrando como esses compostos podem ser usados como antioxidantes devido às suas hidroxilas em carbonos adjacentes (KUMAR ET AL. 2013):

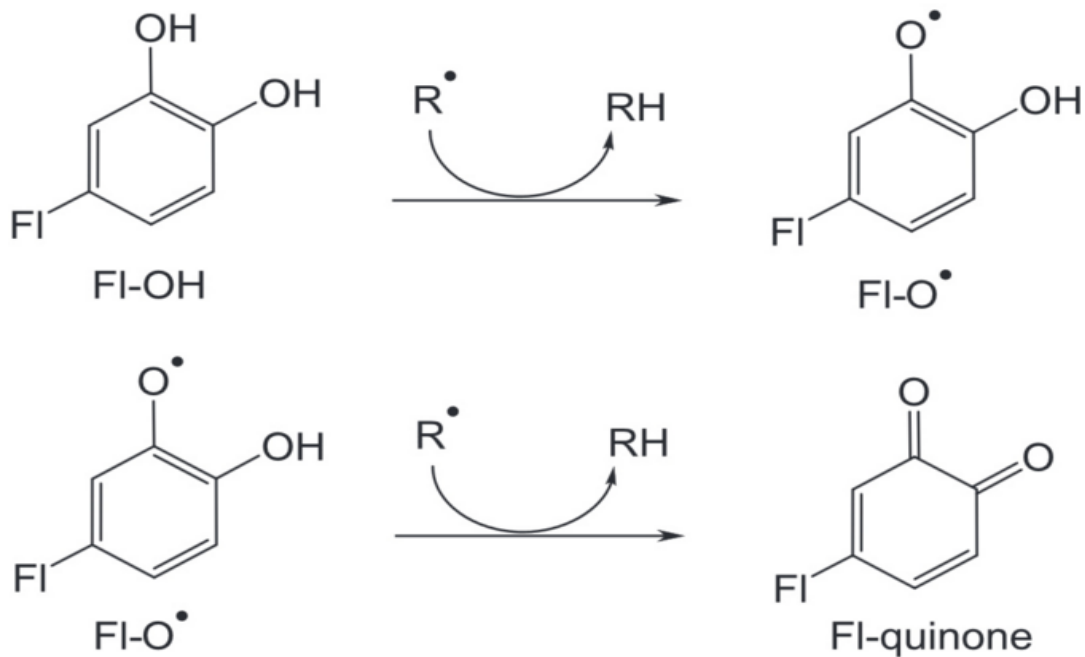


Figura 1: Exemplo de reação de um radical livre com flavonoide. (KUMAR et al. 2013)

1.3 Atividade Anti-tirosinase

A enzima tirosinase é encontrada tanto em humanos quanto em frutas e cogumelos. Sua principal função é a transformação do aminoácido tirosina em dopaquinona (Figura 2) por meio de uma reação de oxidação, começando a via de produção da melanina. Essa enzima é alvo de diversos estudos, já que as primeiras reações na melanogênese são limitantes da velocidade para a produção de melanina.

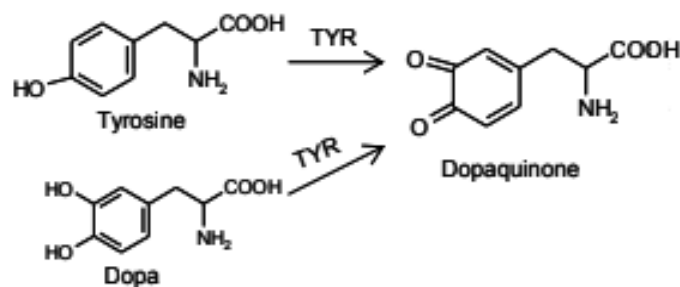


Figura 2: Representação do início da biossíntese de melanina pela enzima tirosinase. (CHANG, 2009)

Apesar da melanina desempenhar um papel importante na proteção contra raios UV e, conseqüentemente, danos moleculares, o excesso de melanina pode causar alguns problemas estéticos. Em frutas e cogumelos, por exemplo, a cor marrom que surge depois da colheita diminui o valor do produto durante a comercialização. (CHANG, 2009)

Monofenóis e difenóis são os principais substratos e inibidores da tirosinase (CHANG, 2009). Flavonóides, como por exemplo a quercetina, já demonstraram atividade inibitória desta enzima, demonstrando um potencial uso em cosméticos para o controle da hiperpigmentação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar e identificar compostos das frações com maior atividade antioxidante e anti-tirosinase presentes em *Merostachys pluriflora* Munro ex E.G. Camus.

2.2 Objetivos Específicos

- Particionar o extrato bruto em três frações, com solventes de polaridade crescente (*n*-hexano, clorofórmio e acetato de etila);
- Isolar os compostos presentes na fração clorofórmica por cromatografia em coluna e cromatografia em camada preparativa;
- Identificar quais das sub-frações possuem componentes com potencial atividade antioxidante;
- Caracterizar os compostos isolados através de Cromatografia de Alta Eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD)
- Avaliar a atividade anti-tirosinase das frações e analisar sua composição química

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Extração

3.1.1 Material Vegetal

Os colmos de *M. pluriflora* foram coletados no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), São Paulo-SP (23°38'08"-23°40'18"S e 46°36'48"-46°38'00"W), em maio de 2018 e identificados pelo Dr. Tarcísio Filgueiras do Instituto de Botânica de São Paulo. Uma amostra testemunha foi depositada no Herbário dessa instituição como Shirasuna, RT & Suzuki, R. 1580 (SP).

3.1.2 Preparação dos extratos

O material foi triturado em moinho de facas tipo te-580 (Tecnal, Brasil) até a obtenção do pó. O método escolhido para a extração de compostos do colmo da espécie *M. pluriflora* foi de extração contínua em aparelho de Soxhlet utilizando etanol 60%, que demonstrou ser o mais eficiente (WROBLEWSKA et al. 2019).

3.1.3 Secagem

Após o processo, o extrato obtido foi filtrado e o solvente eliminado sob pressão reduzida em evaporador rotatório, armazenados em freezer e posteriormente liofilizados.

3.1.4 Fracionamento do Extrato

Após a pesagem, todo o extrato bruto foi solubilizado em água e metanol (9:1) e particionado com uma série de solventes de polaridade crescente, hexano, clorofórmio e acetato de etila até a exaustão. Após as extrações, as fases orgânicas foram secadas com sulfato de sódio anidro, filtradas e os solventes eliminados sob pressão reduzida.

3.2 Isolamento e Identificação dos Compostos Ativos

3.2.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A CCD foi executada em placas de sílica gel 60 F254 (Merck). Para a visualização fração de acetato de etila e clorofórmio foram realizadas leituras em dois espectros de luz ultravioleta: 254 e 360 nm. Além disso, foram utilizados os reagentes de Follin, para identificação de compostos fenólicos nas placas de CCD. Os eluentes utilizados foram clorofórmio e uma mistura de clorofórmio:metanol (9:1 v/v), que demonstraram maior eficiência na eluição.

3.2.2 Filtração em Celite[®]

Para eliminar o excesso de clorofila na fração clorofórmica foi realizada uma filtração em Celite[®] utilizando funil sinterizado de volume 56 mL, aproximadamente. Nesse método foi utilizada uma massa de 500 mg de Celite[®] para cada 5 g de amostra. A amostra foi solubilizada em metanol (proporção de 1:30 (m/V) amostra:metanol), e uma solução de 0,1% (V/V) de HCl foi adicionada na solução da amostra até sua turvação. A solução resultante é filtrada em Celite[®] com três lavagens com 30 mL de metanol durante o processo. Após as lavagens, o filtrado é recolhido e particionado com clorofórmio (partição líquido-líquido).

3.2.3 Cromatografia em Coluna

Para a Cromatografia em Coluna, será utilizada como fase estacionária 30 g de sílica (polar), ocupando 50 mL de volume na coluna aproximadamente, coluna com vidro sinterizado de volume 150 mL aproximadamente (30 x 2,5 cm, altura x diâmetro), 500 mg de amostra, bomba de vácuo e os eluentes com gradiente de polaridade crescente. Cada eluente será adicionado em três porções de 50 mL, que corresponde ao volume de sílica, e separados em frações. Os eluentes utilizados serão: hexano:clorofórmio (1:1 v/v); clorofórmio; clorofórmio:metanol (95:5 v/v); clorofórmio:metanol (9:1 v/v); clorofórmio:metanol (8:2 v/v); clorofórmio:metanol (7:3 v/v); clorofórmio:metanol (1:1 v/v); metanol. A amostra foi misturada com 5 mg de sílica em almofariz, sendo adicionada ao topo

da coluna.

3.2.4 HPLC

As análises foram feitas em um cromatógrafo Agilent 1260 com detector de espectro ultravioleta por fotodiodos com células de fluxo de 60 mm. A fase estacionária foi uma coluna Zorbax Eclipse plus de fase reversa C18 (4,6 mm x 150 mm x 3,5 µm), e um fluxo de 1,0 mL/min. Os solventes utilizados foram ácido acético 0,1% e acetonitrila de modo gradiente, começando com 10% acetonitrila por 6 minutos, 10-15% de acetonitrila de 6-7 minutos, 15% acetonitrila de 7-22 minutos, 15-50% de acetonitrila de 22-32 minutos, 50-100% de acetonitrila de 32-42 minutos, 100% de acetonitrila de 42-50 minutos.

3.3 Determinação de atividade antioxidante

Para este teste foi usado o método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET. 1995). A solução de DPPH foi preparada utilizando-se 4 mg de DPPH solubilizado em 50 mL de metanol em balão volumétrico. A amostra foi solubilizada em metanol, em soluções de 1 mg/mL, 0,5 mg/mL e 0,4 mg/mL. Como branco da amostra foram utilizados apenas 150 µL de amostra e 50 µL de metanol, no controle foram utilizados 150 µL de DPPH e 50 µL de metanol, e o controle branco era apenas metanol 200 µL. As aplicações foram realizadas em triplicata, com 150 µL de amostra e 50 µL de DPPH em cada poço. A leitura foi realizada em leitor de microplacas SpectraMax M4, com comprimento de onda 515 nm. o cálculo de inibição foi feito de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Inibição \% DPPH} = \frac{(\text{Abs } c - \text{Abs } cb) - (\text{Abs } a - \text{Abs } ba)}{(\text{Abs } c - \text{Abs } cb)}$$

Abs c: Absorbância do controle. **Abs cb:** absorbância do controle branco. **Abs a:** absorbância da amostra. **Abs ba:** absorbância do branco da amostra.

3.5 Determinação de atividade anti-tirosinase

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

Os extratos brutos e frações das folhas e colmos foram avaliados na concentração final de 0,5 mg/mL. Para tanto, uma solução-mãe com 25 mg de amostra, 100 µL de Tween 20 e 900 µL de DMSO foi preparada. A solução final utilizada no ensaio foi preparada a partir de 100 µL de solução-mãe mais 900 µL de tampão fosfato pH 6,8. As amostras foram preparadas em dois passos para facilitar a dissolução dos extratos e para que o volume de DMSO e Tween não ultrapassasse 5% no poço da microplaca.

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

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

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

Protegida da luz, a placa sofreu agitação moderada e incubação por 10 minutos a temperatura ambiente. Passado este tempo, foi adicionado o substrato (40 µL de L-DOPA) em todos os poços. A placa foi agitada novamente e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader – Biotek) em comprimento de onda de 475 nm.

4. RESULTADOS

Um total de 2,73 Kg de colmos foram utilizados para extração, sendo que a massa total de extrato bruto obtida foi de 141,9 g, resultando no rendimento de 5,2% nesta etapa. O processo de particionamento resultou em três frações: hexânica, com rendimento de 2% em relação ao extrato bruto; clorofórmica, com rendimento de 6% em relação ao extrato bruto; acetato de etila, com rendimento de 3,5%. A fração clorofórmica foi a escolhida para prosseguir com os testes, pois apresenta maior atividade antioxidante em relação às outras (WROBLEWSKA et al. 2019).

A fração clorofórmica foi submetida a dois procedimentos: o primeiro foi a CCD em sílica gel 60 F254 (Merck) utilizando como eluente clorofórmio:metanol (9:1), a fim de analisar o padrão de eluição da fração; o segundo foi, após análise do padrão cromatográfico, a filtração com Celite[®], com o objetivo de retirar o máximo de clorofila possível. Os resultados das CCDs estão na figura 3, mostrando duas concentrações diferentes da fração clorofórmica diluída em clorofórmio (0,5 e 1 mg/mL) na figura 3A. Nessa figura pode se observar a excessiva quantidade de clorofila representada pelos rastros em vermelho, dificultando a visualização dos outros compostos pela sua distribuição ao longo da placa. Por esse motivo, foi realizada a etapa de filtração em Celite[®] com intuito de remover boa parte da clorofila presente na fração. A figura 3B mostra o resultado da CCD após a filtração.

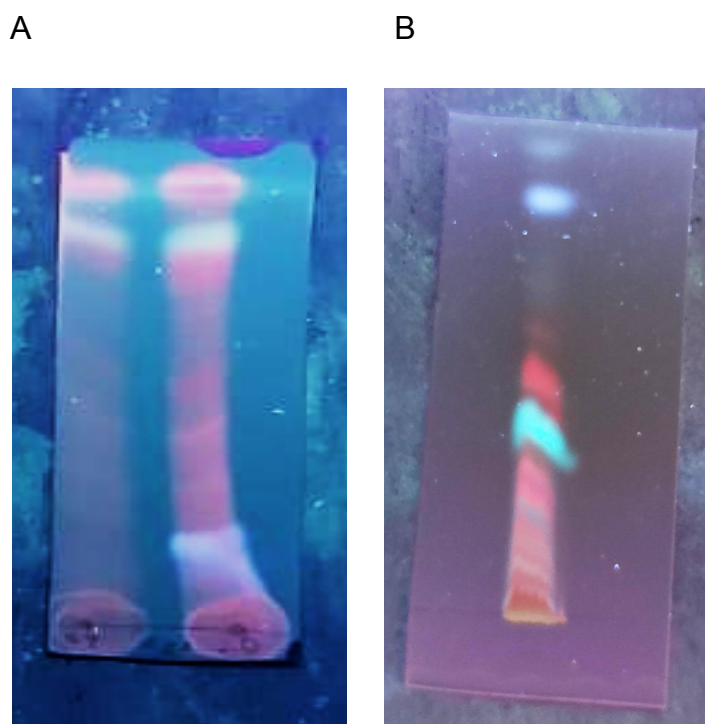


Figura 3. (A.) CCD da fração clorofórmica dos colmos de *Merostachys pluriflora*, da esquerda para direita: concentração de 0,5 e 1 mg/mL. Eluente clorofórmio:metanol (9:1). (B): CCD após a filtração por celite. Leitura em 366 nm. Eluente clorofórmio.

É possível ver a diferença entre as figuras, mostrando menor concentração de clorofila após a filtração, proporcionando melhor visualização de outros compostos na placa. Na figura 3B a clorofila encontra-se menos distribuída pela placa, concentrando-se na parte superior, com $R_f = 0,487$.

Um teste usando as frações clorofórmica e clorofórmica filtrada foi realizado para verificar a diferença de potencial antioxidante entre essas duas frações. Esse teste teve como objetivo averiguar se a clorofila presente na fração clorofórmica influenciava no potencial antioxidante da fração. O resultado demonstrou que não houve uma modificação expressiva na capacidade de sequestrar o radical DPPH após a remoção da clorofila, apresentando uma diminuição em 4% do potencial antioxidante. O teste foi realizado ao mesmo tempo. Na tabela 1 encontram-se os resultados da leitura da placa após o teste.

Tabela 1: Avaliação inibição do potencial antioxidante pela supressão do radical livre DPPH antes e após eliminação da clorofila da fração clorofórmio dos colmos de *Merostachys pluriflora*. Amostra utilizada com concentração 0,5 mg/mL.

	Inibição DPPH (%)
Clorofórmica	76,27 ± 3,87
Clorofórmica filtrada	72,15 ± 0,87

A fração clorofórmica filtrada foi submetida à cromatografia em coluna com a finalidade de separar seus constituintes. As frações obtidas foram posteriormente analisadas por CCD para observar o padrão de eluição de cada subfração. Subfrações 3, 4 e 5 foram aquelas com maior rendimento após a cromatografia. A figura 4 mostra o resultado da CCD utilizando como eluente clorofórmio:metanol (9:1).

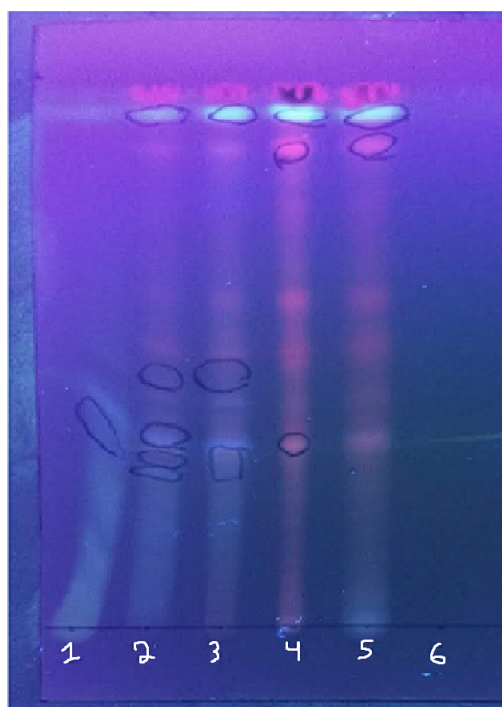


Figura 4: CCD das subfrações obtidas pela cromatografia em coluna da fração clorofórmica de *Merostachys pluriflora*, após a remoção do excesso de clorofila. Leitura em 366 nm. Eluente clorofórmio:metanol (9:1). **1:** subfração hexano:clorofórmio. **2:** subfração clorofórmio. **3:** subfração clorofórmio:metanol (95:5). **4:** subfração clorofórmio:metanol (9:1). **5:** subfração clorofórmio:metanol (8:1). **6:** subfração clorofórmio:metanol (7:3).

As subfrações 7 e 8 não obtiveram massa considerável para a realização da CCD, portanto não se encontram na figura 4. É possível observar a presença de clorofila nas frações de 2 a 5, indicando que a remoção não foi total. A subfração 1 não apresentou compostos de interesse, e as subfrações 2 e 3 número considerável de compostos diferentes com os seguintes fatores de retenção: $Rf_1 = 0,48$; $Rf_2 = 0,40$; $Rf_3 = 0,37$; $Rf_4 = 0,34$. A subfração 4 e 5 apresentaram um composto de coloração diferente das demais com $Rf = 0,38$. Pouco foi observado na subfração 6.

As subfrações foram submetidas ao teste de DPPH, somente para fins comparativos entre elas. As frações 2 e 3 apresentaram padrões de eluição na CCD muito parecidos, portanto foram reunidas. No teste de DPPH, as frações 2 e 3, 4 e 5 foram as que tiveram melhor resultado de inibição, sendo a subfração 4 com 86% de inibição, as subfrações 2 e 3 com 85% e a subfração 5 com 79%. O aumento do percentual de inibição das subfrações 2,3 e 4 em relação à fração clorofórmica deve-se ao aumento da concentração de compostos com potencial antioxidante. As subfrações 6, 7 e 8 resultaram nos seguintes percentuais de inibição do radical livre, respectivamente: 53%, 52% e 52% (Tabela 2). O resultado final deste ensaio pode ser visto na Figura 5, que mostra a aparência da microplaca após o período do ensaio.

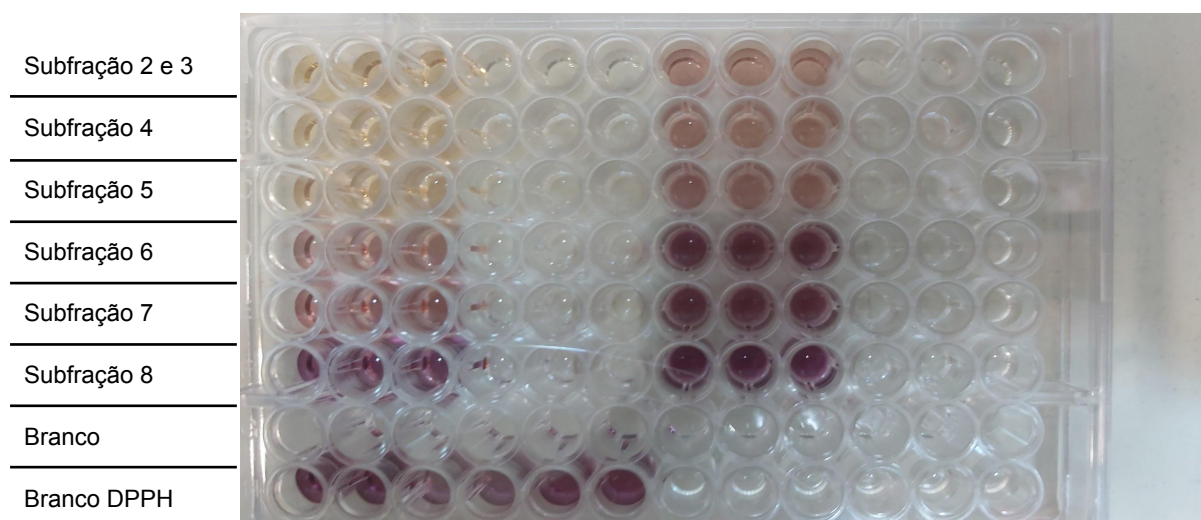


Figura 5: Visualização do resultado obtido na avaliação do potencial antioxidante pelo método da inibição do radical de DPPH com as subfrações obtidas a partir da fração clorofórmica dos colmos de *Merostachys pluriflora*. As seis colunas da esquerda representam as subfrações na concentração de 1 mg/mL, e as seis colunas da direita representam as subfrações na concentração de 0,4 mg/mL.

As porcentagens de inibição do radical DPPH podem ser vistos na tabela 2, para cada subfração.

Tabela 2: Resultados da avaliação do potencial antioxidante pelo método da inibição do radical de DPPH com as subfrações obtidas a partir da fração clorofórmica dos colmos de *Merostachys pluriflora*.

	Inibição DPPH (%)
Subfração 2 e 3	85,12 ± 3,87
Subfração 4	86,53 ± 1,97
Subfração 5	79,56 ± 0,85
Subfração 6	53,60 ± 1,22
Subfração 7	52,43 ± 5,16

As subfrações foram encaminhadas para análise em HPLC para possibilitar a caracterização das substâncias presentes. Nas amostras 2 e 3 só foi possível relacionar um composto com os padrões injetados, o ácido *p*-cumárico, com tempo de retenção similares (10,029 min na amostra e 10,428 min no padrão). Abaixo verificamos o padrão de eluição da amostra na figura 6, o espectro UV do padrão de ácido *p*-cumárico na figura 7 e os espectros de ácido *p*-cumárico identificados nas amostras na figura 8.

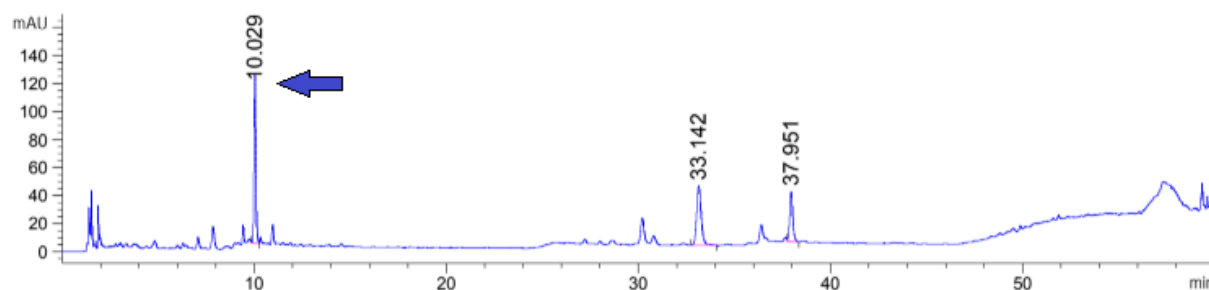


Figura 6: Cromatograma obtido para a subfração 2 da fração clorofórmio dos colmos de *M. pluriflora* através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa C18. Eluição no HPLC da amostra, mostrando o pico do ácido *p*-cumárico no tempo 10,029. Leitura em 280 nm.

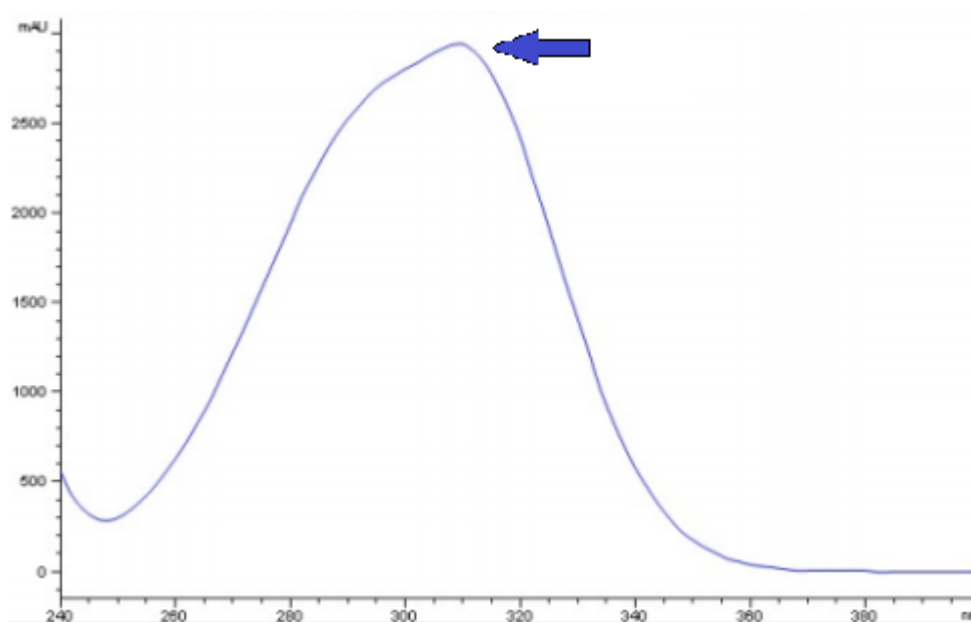


Figura 7: Espectro de absorção do padrão de ácido *p*-cumárico. A seta indica o comprimento de onda de maior absorção do ácido *p*-cumárico (aproximadamente 310 nm).

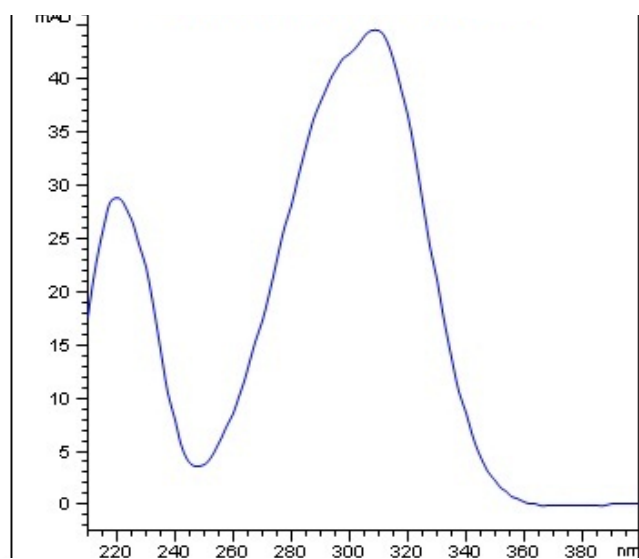


Figura 8. Espectro de absorção obtido para as subfrações 2 e 3, mostrando o mesmo padrão de absorção em relação ao ácido *p*-cumárico.

Estudos anteriores demonstraram a atividade antioxidante de ácido *p*-cumárico usando outros métodos, como o sistema lipídico através de Rancimat[®], método de Shall, e na oxidação do LDL (SOARES, 2002). Este último método mostrou grande atividade deste composto, com efeito sinérgico se misturado com outros compostos como ácido caféico (SOARES, 2002).

Na subfração 4 também foi possível detectar dois compostos majoritários um deles (RT=20,701 min) com espectro de absorção semelhante um derivados de ácido cinâmico e o segundo (RT=49,794) o espectro compatível com derivados de flavonóis, como quercetina ou canferol, mas os tempos de retenção não correspondiam a nenhum dos padrões disponíveis. Para sua identificação completa seriam necessários dados espectroscópicos complementares. Na figura 9 temos o cromatograma da subfração 4, com os compostos nos tempos de retenção 20,701 e 49,794 minutos, enquanto que na figura 10A o espectro de absorção do primeiro pico eluído e na figura 10B o espectro do segundo composto.

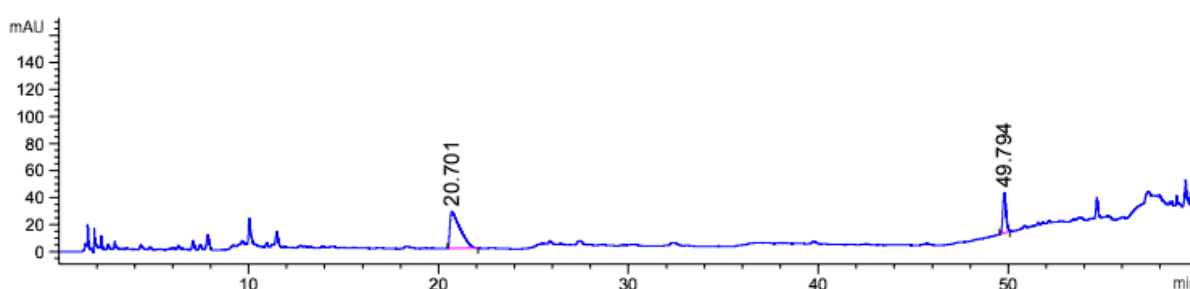


Figura 9: Cromatograma obtido para a subfração 4 da fração clorofórmio dos colmos de *M. pluriflora* através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa C18 em 2808. Eluição no HPLC da amostra, mostrando os picos nos tempos 20,701 e 49,794 minutos. Leitura em 280 nm.

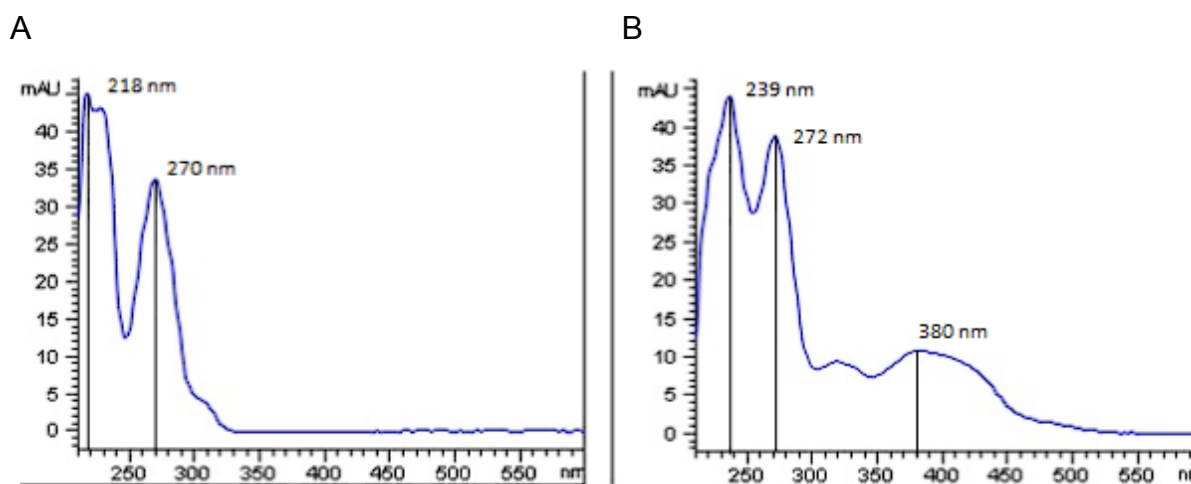


Figura 10: (A) Espectro de absorção obtido para o pico eluído em 20,701 min da subfração 4, mostrando os máximos de absorção em 218 nm e 270 nm. (B) Espectro de absorção obtido para o pico eluído em 49,794 min. da subfração 4, mostrando os máximos de absorção em 239 nm e 272 nm.

Os flavonóides majoritários encontrados em espécies asiáticas são flavonas C-glicosiladas, vitexina, isovitexina, orientina e iso-orientina.

(GROMBONE-GUARATINI et al., 2021). Nas subfrações analisadas de *M. pluriflora* não foi detectada a presença desses flavonóides encontrados nas espécies asiáticas. Os outros espectros de compostos minoritários foram analisados mesmo sem correspondência com os padrões, e os picos de absorção se encontravam nas regiões de 320 nm e 235 nm, como mostra o espectro a seguir. São, possivelmente, fenólicos simples ou derivados do ácido cinâmico, como o próprio ácido *p*-cumárico.

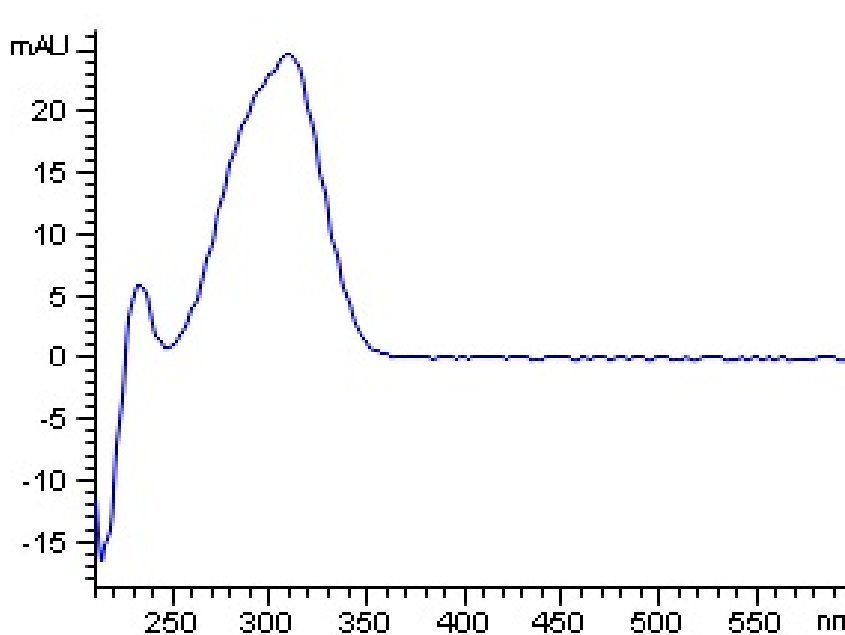


Figura 11: Exemplo de espectro de composto minoritário encontrado na subfração 4, com máximos de absorção em 320 nm e 235 nm. Tempo de retenção em aproximadamente 9 minutos.

A fração clorofórmica e sua subfração 4 apresentaram uma atividade inibitória para a enzima tirosinase. As amostras testadas foram as que demonstraram maior atividade antioxidante, ou seja, a fração clorofórmica sem clorofila e as subfrações 2, 3 e 4. A tabela a seguir mostra as porcentagens de inibição de cada amostra.

Tabela 3: Porcentagem de inibição de cada amostra testada. A concentração de amostra em cada poço foi de 0,5 mg/mL.

Fração clorofórmica	14%
Subfração 2	0%
Subfração 3	0%
Subfração 4	19%

Embora as subfrações 2 e 3 tenham apresentado as maiores atividades antioxidantes, elas não demonstraram inibição dessa enzima. Apesar de em estudos anteriores o ácido *p*-cumárico ter demonstrado inibitória da enzima tirosinase (ILHAM et.al. 2008), em nosso experimento as subfrações mais ricas nesse composto não apresentaram essa atividade (2 e 3).

A subfração 4 concentrou toda a atividade detectada para a fração clorofórmica total, cujos compostos majoritários eram um derivado de ácido cinâmico e um flavonol ainda não elucidados. Um estudo mostra quatro flavonas com atividade inibitória da tirosinase, evidenciando o potencial inibitório dos compostos desta classe (FREITAS, 2015).

5. CONCLUSÃO

A fração clorofórmica desta espécie possui alta atividade antioxidante, sendo possível relacionar com a presença de ácido *p*-cumárico. Como mostrado no estudo de Soares (2002) sobre ácidos fenólicos, essa substância possui boa capacidade antioxidante, principalmente quando em conjunto com outra substância (sinergismo). A atividade inibitória de enzima tirosinase mostrou-se relevante na subfração 4 considerando a concentração de amostra utilizada. Essa atividade pode ser atribuída ao derivado de ácido cinâmico ou ao flavonol encontrados, porém mais estudos sobre esses compostos são necessários. Também verificaram-se diferenças entre as espécies de bambu brasileiras e asiáticas quanto aos tipos de flavonóides, demonstrando a necessidade de conhecer ainda mais as espécies brasileiras.

6. REFERÊNCIAS

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

CHANG, T. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *International journal of Molecular Sciences*. Department of Biological Science and Technology, National University of Tainan. p. 2440-2475. 2009

FREITAS, M. M. Obtenção de extratos padronizados em ácido clorogênico, rutina e isoquercitrina a partir das folhas de *Morus nigra* L. : inibição de tirosinase e citotoxicidade. 2015. 136 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2015. DOI 10.26512/2015.12.D.19700. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/19700>. Acesso em: 13 set. 2021.

GÜLÇİN, İ.; Antioxidant activity of food constituents: an overview; *Archives of Toxicology*. v.86, p.345 – 391, 2012.

GAGLIANO, J.; Análise do potencial farmacológico de *Merostachys pluriflora* Munro ex. E.G. Camus, uma espécie de bamboo nativa da mata Atlântica. São Paulo. 2016. p.114. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo.

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

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

KUMAR, S.; PANDEY, A.K.; Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*. v.2013. p.1-16. 2013

KUROKAWA, T.; ITAGAKI, S.; YAMAGI, T.; NAKATA, C.; NODA, T.; HIRANO, T.; ISEKI, K.; Antioxidant Activity of a novel extract from bamboo grass (AHSS) against Ischemia-Reperfusion Injury in rat small intestine. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. v.29. n.11. p.2301-2303. 2006

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

LEHUÉDÉ J.; FAUCOUNNEAU B.; BARRIER L.; OURAKOW M.; PIRIOU A.; VIERFOND J.M.; Synthesis and antioxidant activity of new tetraarylpyrroles. *European Journal of Medicinal Chemistry*. v.34, 991. 1999.

LONDOÑO, X.; Evaluation of bamboo resources in Latin América. *International Network of Bamboo and Rattan*. Cali. 2001. 30p

MABRY, T.J.; MARKHAM, K.R.; THOMAS, M.B. *The systematic identification of flavonoids*. New York-Heidelberg-Berlin: Springer-Verlag, 1970. p.41-59, 119-131.

MAGALHÃES, L.M.; SEGUNDO, M.A.; REIS, S.; LIMA, J.L.F.C.; Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613, 1-19. 2008.

MANGIALASCHE, F., POLIDORI, M.C., MONASTERO, R., ERCOLANI, S., CAMARDA, C., CECCHETTI, R., MECOCCI, P., Biomarkers of oxidative and nitrosative damage in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Ageing Research Reviews*. v.8, p 285 – 305. 2009

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

Vinícius-Silva, R.; Clark, L.G.; Shirasuna, R.T.; Gonçalves, A.P.S.; Filgueiras, T.S. (in memoriam) *Merostachys* in *Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro*. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB13343>. Acesso em: 19 out. 2022

OLIVEIRA, D. C. S.; GUARATINI, M. T. G.; MORENO, P. R. H. *Composição química e atividades biológicas de extratos de Guadua angustifolia Kunth. Anais*. São Paulo: Centro Brasileiro de Informações Sobre Drogas Psicotrópicas/CEBRID/UNIFESP, 2018. Disponível em: http://www.eventus.com.br/plantasmedicinais2018/anais_xxv_simposio_plantas_mediciniais_2018.pdf .

OMOTOYINBO, O.V., AWOJULU, E.O., SANNI D.M. Phytochemical screening, antioxidant and tyrosinase inhibitory studies of methanol leaf extracts of two tomato varieties. Nigeria, *Highlights in BioScience*. v. 3. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/bf53/43ecbf6396df171e4129a04e6c9dc92406ac.pdf> Acesso em: 13 setembro 2021. Article ID 20216. doi:10.36462/H.BioSci.20216

SOARES, Sergio Eduardo. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista de Nutrição*, Campinas , v. 15, n. 1, p. 71-81, Jan. 2002 . disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732002000100008&lng=en&nrm=iso. acesso em: 17 Junho 2020. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732002000100008>.

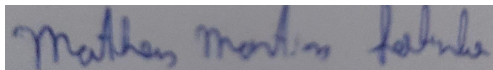
USORO, O.B.; MOUSA, S.A.; Vitamin E forms in Alzheimer's disease: A review of controversial and clinical experiences; *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.50, p 414 – 419. 2010

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer; *Chemico-Biological Interactions*. v.160, p 1 – 40. 2006


WRÓBLEWSKA, K. B. ; BABY, A. R. ; GROMBONE, M. T. ; MORENO, P. R. H. In vitro antioxidant and photoprotective activity of five native Brazilian bamboo species. *Industrial Crops and Products* , v. 130, p. 208-215, 2019.

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

ZHANG, Y.; YAO, X.; BAO, B.; Anti-fatigue Activity of a Triterpenoid-rich Extract from Chinese Bamboo Shavings (*Caulis bambusae in taeniam*); *Phytotherapy Research*, v.20. p.872 – 876. 2005



Assinatura do aluno (20/10/2022)



Assinatura do orientador (20/10/2022)