

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

Matheus M. Sobrinho¹, Paulo R. H. Moreno²

¹ – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

² – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

mmsobrinho@usp.br

Resumo: 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. Este trabalho teve como objetivo determinar as substâncias responsáveis por essas atividades e da atividade anti-tirosinase. Foram preparados extratos hidro-etanólicos (60%) dos colmos em Soxhlet. O extrato bruto seco foi dissolvido em metanol:água (9:1) e particionado 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, que foi removida por 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. 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 subfração 4 foi a única que apresentou atividade anti-tirosinase, onde foram detectados como componentes principais flavonoides e fenilpropanóides, de acordo com o espectro de absorção, que podem ser os responsáveis pela atividade anti-tirosinase. Estes resultados demonstram o potencial deste bambu como um agente antioxidante, indicando a necessidade de aprofundamento nos estudos fitoquímicos e biológicos dos bambus americanos.

Palavras-chave: Bambu, fenólicos, Atividade antioxidante, Atividade anti-tirosinase, *Merostachys pluriflora*

Isolation and identification of antioxidants and antityrosinase compounds from Merostachys pluriflora Munro ex E.G. Camus (Poaceae: Bambusoideae) extracts

Abstract: Bamboos are widely used for many purposes, such as construction, food, and medicine, however there is almost no knowledge about the chemical and biological properties of American species. Previously, one of those species, *Merostachys pluriflora* Munro ex E.G. Camus showed antioxidant and photoprotective activities. For this reason, the main goal of this work was to identify the substances responsible for the antioxidant activity of *M. pluriflora*, and to evaluate their antioxidant and anti-tyrosinase activity. The bamboo culms were extracted with a hydro-ethanolic (60%) solution in a Soxhlet apparatus. The crude extract was dissolved in methanol:water (9:1) and partitioned into hexanic, chloroform and ethyl acetate fractions. The chloroform fraction had the highest antioxidant and anti-tyrosinase activity, but with large amounts of chlorophyll, which was eliminated by filtration through Celite[®]. After that, this fraction was submitted to column chromatography affording 5 subfractions. Subfractions 2, 3 and 4 presented the highest antioxidant activity, but only subfraction 4 showed anti-tyrosinase activity. Those subfractions were analyzed by HPLC-DAD, and its composition was determined by comparing the retention times and UV/Vis absorption with a series of standard compounds. *p*-Coumaric acid was the major compound found in subfractions 2 and 3, indicating that it can be the main responsible for antioxidant activity. The major compounds from subfraction 4 were flavonoids and phenylpropanoids which can be responsible for the antityrosinase activity. These results demonstrate the potential of this bamboo, offering the possibility of deepening phytochemical and biological studies.

Keywords: Bamboo, Phenolics, Antioxidant activity, Antityrosinase activity, *Merostachys pluriflora*.

Introdução

Há muito tempo que bambus são usados no sudeste da Ásia como material de construção, móveis, encaunamentos e de embalagem de alimentos para evitar a deterioração. Nessa região, a medicina tradicional emprega também as folhas de bambu em tratamentos de hipertensão, arteriosclerose, doença cardiovascular, e certas formas de câncer. Essas propriedades terapêuticas foram relacionadas com a atividade antioxidante dos bambus. Na China, um preparado das folhas de bambu foi permitido pelo Ministério da Saúde local para ser usado como aditivo em alimentos devido a sua função antioxidante. Os extratos de bambu são compostos por flavonoides, lactonas e ácidos fenólicos, onde as flavonas C-glicosiladas costumam ser os compostos mais abundantes, tais como: orientina, homo-orientina, vitexina e isovitexina¹.

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 superóxido². O extrato da droga vegetal *Caulis bambusae*, obtido das aparas dos colmos de algumas espécies de bambu, apresentou uma função antitumoral frente a quatro tipos diferentes de tumores graças à grande quantidade de triterpenos presentes nesse extrato³.

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 possuir uma grande diversidade de espécies. 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 aplicação⁴.

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 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)⁵. 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 etila⁶.

Em virtude desses estudos, o objetivo deste trabalho é identificar os principais compostos responsáveis pelas atividades antioxidante e anti-tirosinase em frações e subfrações de *M. pluriflora*.

Experimental

Coleta e extração

Os colmos de *M. pluriflora* foram coletados no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), em São Paulo-SP (05/2018) e identificados pelo Dr. Tarcísio Filgueiras do Instituto de Botânica de São Paulo.

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 eficiente⁵. Após o processo, o extrato obtido foi filtrado e o solvente eliminado sob pressão reduzida em evaporador rotatório, armazenados em freezer e posteriormente liofilizados.

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.

Isolamento e Identificação dos Compostos Ativos

Para a cromatografia em coluna, 500 mg da fração clorofórmica foram aplicadas em uma coluna, com volume 150 mL, contendo 30 g de sílica gel 60 (Merck) como fase estacionária. Como eluentes foram utilizados três porções de 50 mL de 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 (100%). As subfrações geradas a partir desta etapa foram numeradas de 1 a 8 de acordo com a ordem dos efluentes utilizados.

Para as análises em HPLC, foi utilizado 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 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 em 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.

Determinação da atividade antioxidante

Para este teste foi usado o método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)⁷. A leitura foi realizada em leitor de microplacas, com comprimento de onda 515 nm.

Determinação de atividade anti-tirosinase

Para a avaliação da atividade inibidora da enzima tirosinase foi empregado um método enzimático utilizando *L*-Dopa como substrato^{8,9}. Foi realizada a leitura em espectrofotômetro em $\lambda=475$ nm.

Resultados e Discussões

As frações 2 e 3 apresentaram padrões de eluição na CCD muito parecidos, portanto foram reunidas. No teste de DPPH, as frações 2/3, 4 e 5 foram as que tiveram melhor resultado de inibição, sendo a subfração 4 com 86% de inibição, as subfrações 2/3 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 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 2/3	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

Na subfração 2/3 só foi possível relacionar um composto com os padrões injetados, o ácido *p*-cumárico, com tempo de retenção similar (10,029 min na amostra e 10,428 min no padrão). A Figura 1 apresenta o perfil de eluição da subfração 2 da fração clorofórmio. As Figuras 2A e 2B apresentam os espectros UV do padrão de ácido *p*-cumárico e o espectro do ácido *p*-cumárico identificado na amostra, respectivamente.

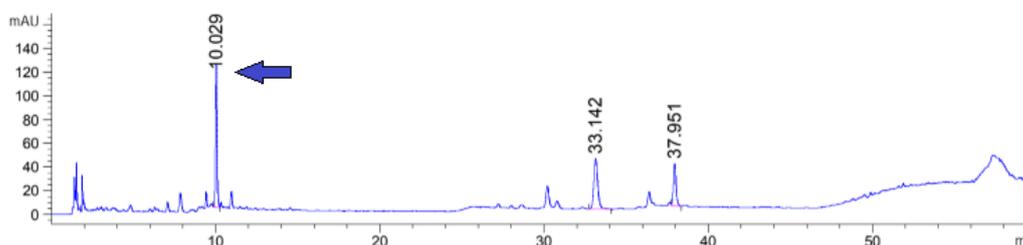


Figura 1: Cromatograma obtido para a subfração 2 da fração clorofórmio dos colmos de *M. pluriflora* através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa C18. Eluição no HPLC da amostra, mostrando o pico do ácido *p*-cumárico no tempo 10,029. Leitura em 280 nm.

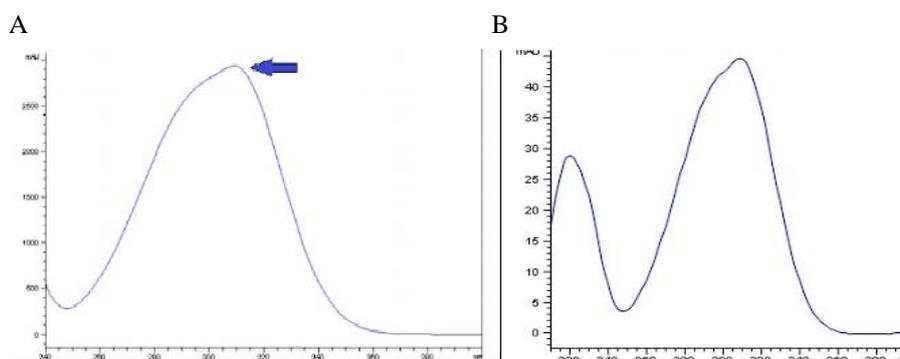


Figura 2: Comparação dos espectros de absorção no UV/VIS do composto majoritário da subfração 2 da fração clorofórmio dos colmos de *M. pluriflora*. (A) Espectro de absorção do padrão de ácido *p*-cumárico. A seta indica o comprimento de onda de maior absorção do ácido *p*-cumárico (aproximadamente 310 nm). (B) Espectro de absorção obtido para a subfração 2/3, mostrando o mesmo padrão de absorção em relação ao ácido *p*-cumárico.

Na subfração 4 também foi possível detectar dois compostos majoritários (Fig. 3), sendo o primeiro (RT=20,701 min) com espectro de absorção semelhante a derivados de ácido cinâmico (Fig. 4A) e o segundo (RT=49,794) com espectro compatível com derivados de flavonóis (Fig. 4B), como quercetina ou canferol, mas os tempos de retenção não corresponderam a nenhum dos padrões disponíveis.

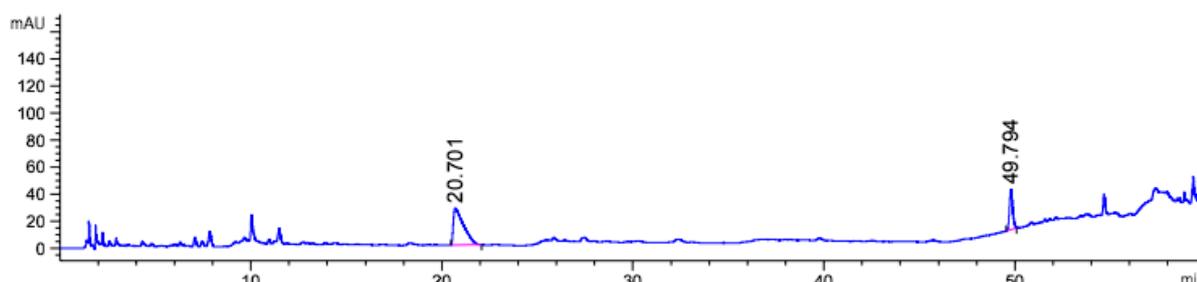


Figura 3: Cromatograma obtido para a subfração 4 da fração clorofórmio dos colmos de *M. pluriflora* através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa C18 em 2808. Eluição no HPLC da amostra, mostrando os picos nos tempos 20,701 e 49,794 minutos. Leitura em 280 nm.

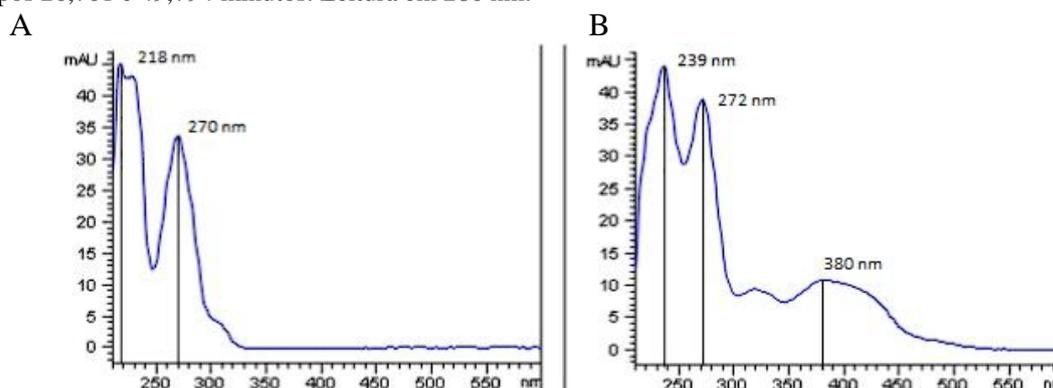


Figura 4: Espectros de absorção no UV/VIS dos compostos majoritários na subfração 4 da fração clorofórmio dos colmos de *M. pluriflora*. (A) Espectro de absorção obtido para o pico eluído em 20,701 min da subfração 4, mostrando os máximos de absorção em 218 nm e 270 nm. (B) Espectro de absorção obtido para o pico eluído em 49,794 min da subfração 4, mostrando os máximos de absorção em 239 nm e 272 nm.

Os flavonoides majoritários encontrados em espécies asiáticas são flavonas C-glicosiladas, vitexina, isovitexina, orientina e iso-orientina¹⁰. Nas subfrações analisadas de *M. pluriflora* não foi detectada a presença desses flavonoides 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 (Fig. 5). Devido ao seu espectro de absorção no UV/Vis, estes compostos podem ser fenólicos simples ou derivados do ácido cinâmico, como o próprio ácido *p*-cumárico.

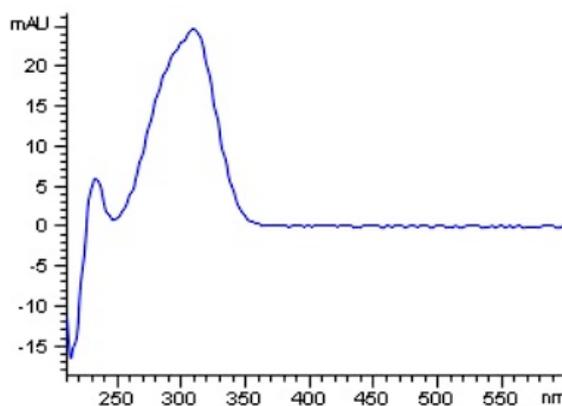


Figura 5: Exemplo de espectro de um dos compostos minoritários encontrado na subfração 4 da fração clorofórmica dos colmos de *M. pluriflora*, com máximos de absorção em 320 nm e 235 nm. Tempo de retenção de aproximadamente 9 min.

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 da enzima tirosinase pela fração clorofórmica de e suas subfrações. 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 tirosinase¹¹, 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 anterior mostra quatro flavonas com atividade inibitória da tirosinase, evidenciando o potencial inibitório dos compostos desta classe¹².

Conclusões

A fração clorofórmica desta espécie possui alta atividade antioxidante, sendo possível relacionar com a presença de ácido *p*-cumárico. Como mostrado em outros estudos sobre ácidos fenólicos¹³, 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 presentes na subfração, porém mais estudos sobre esses compostos são necessários. Também foram verificadas diferenças entre as espécies de bambu brasileiras e asiáticas quanto aos tipos de flavonoides, demonstrando a necessidade de conhecer ainda mais as espécies brasileiras.

Referências

1. Zhang, Y.; Yao, X.; Bao, B.; *Phytother. Res.* **2005**, *20*, 872. [<https://doi.org/10.1002/ptr.1965>]
2. Kurokawa, T.; Itagaki, S.; Yamagi, T.; Nakata, C.; Noda, T.; Hirano, T.; Iseki, K.; *Biol. Pharm. Bull.* **2010**, *29*, 2301. [<https://doi.org/10.1248/bpb.29.2301>]
3. Lu, B.; Liu, L.; Zhen, X.; Wu, X.; Zhang, Y.; *Afr. J. Biotechnol.* **2006**, *9*, 6430. [<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/92284/81737>]
4. International Bamboo and Rattan Organization, https://www.inbar.int/resources/inbar_publications/evaluation-of-bamboo-resources-in-latin-america/, acessado em novembro de 2022.
5. Wróblewska, K. B.; Baby, A. R.; Grombone, M. T.; Moreno, P. R. H.; *Ind. Crops. Prod.* **2019**, *130*, 208. [<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.081>]
6. Gagliano, J.: *Análise do potencial farmacológico de Merostachys pluriflora Munro ex. E.G. Camus, uma espécie de bamboo nativa da mata Atlântica*; Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 2016. [<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41132/tde-30112016-112013/en.php>]
7. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C.; *Lebensm Wiss Technol.* **1995**, *28*, 25. [[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)]
8. Masuda, T.; Yamashita, D.; Takeda, Y.; Yonemori, S.; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*, 197. [<https://doi.org/10.1271/bbb.69.197>]
9. Hubert, J.; *Planta Med.* **2016**, *82*, 1351. [<https://doi.org/10.1055/s-0042-110180>]
10. Grombone-Guaratini, M. T.; Furlan, C. M.; Lopes, P. S.; Barsalobra, K.P.; Leite e Silva, V. R.; Moreno, P. R. H. In: *Plant Antioxidants and Health. Reference Series in Phytochemistry*; Ekiert, H.M., Ramawat, K. G., Arora, J., eds; Springer: Cham, Switzerland, 2021, p. 231, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-78160-6_33]
11. Mohd Ilham, A.; Vimala, S.; Abdull Rashih, A.; Rohana, S.; Jamaluddin, M.; Juliza, M.; *J. Trop. For. Sci.* **2008**, *20*, 123. [<https://www.jstor.org/stable/23616548>]
12. 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*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, 2015. [<http://dx.doi.org/10.26512/2015.12.D.19700>].
13. Soares, S. E.; *Rev. de Nutr.* **2002**, *71*. [<https://doi.org/10.1590/S1415-52732002000100008>].