

Atividade antioxidante e anti-tirosinase nas folhas de *Guadua angustifolia*

var. *bicolor* Lodoño (Bambusoideae:Poaceae)

João Kazlauckas C. Corrêa^{1*}, Paulo Roberto H. Moreno^{2*}

1-Graduação em Farmácia-Bioquímica - Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

joaokazlauckas@usp.br

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

prmoreno@iq.usp.br

Resumo: *Guadua angustifolia* var. *bicolor* Lodoño é uma das duas variedades da espécie *Guadua angustifolia*, uma espécie Colombiana introduzida no Brasil cuja composição fitoquímica ainda não foi estudada. Este estudo visa identificar substâncias presentes nessa variedade com atividade antioxidante e anti-tirosinase. Folhas de *G. angustifolia* var. *bicolor* foram extraídas com etanol (70%) em aparelho de Soxhlet. Os extratos foram concentrados utilizando rota- evaporador sob pressão reduzida e submetidos a uma partição sólido-líquido com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol). As frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol foram empregadas nas análises. A fração de *n*-butanol demonstrou maior atividade antioxidante e as maiores quantidades de fenólicos. Na sequência, as frações foram submetidas à cromatografia em coluna fornecendo nove sub-frações cada uma. As subfrações diclorometano (C, D, E), acetato de Etila (G) e *n*-butanol (B, C, D) apresentaram as maiores inibições da tirosinase, sendo 40,66 % para diclorometano C e 39,78% para diclorometano E. A subfração diclorometano C não apresentou flavonóides de acordo com os resultados obtidos, apenas compostos fenólicos. A subfração *n*-butanol B demonstrou maior atividade antioxidante com 86,39%. Os resultados obtidos indicam que *G. angustifolia* var. *bicolor* possui compostos com potencial atividade antioxidante e inibidora da tirosinase.

Palavras-chave: *Guadua angustifolia* var. *bicolor*; atividade antioxidante; atividade anti tirosinase.

Antioxidant and anti-tyrosinase activity in *Guadua angustifolia* var. *bicolor* Lodoño leaves (Bambusoideae:Poaceae)

Abstract: *Guadua angustifolia* var. *bicolor* Lodoño is one of the two varieties of *Guadua angustifolia*, a Colombian species introduced in Brazil, whose phytochemical composition has not yet been studied. This study aims to identify substances present in the species with antioxidant and anti-tyrosinase activity. *G. angustifolia* var. *bicolor* leaves were extracted with ethanol (70%) in a Soxhlet apparatus. The extracts were concentrated using a rotary evaporator under reduced pressure and subjected to solid-liquid partition with solvents of increasing polarity (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol). The dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol fractions were used in the analyses. The *n*-butanol fraction showed the highest amounts of phenolics and antioxidant activity. Subsequently, the fractions were subjected to column chromatography providing nine sub-fractions each. The dichloromethane (C, D, E), Ethyl Acetate (G) and *n*-butanol (B, C, D) subfractions afforded the highest tyrosinase inhibitions, with 40.66% for dichloromethane C and 39.78% for dichloromethane E. Subfraction dichloromethane C did not contain flavonoids, only phenolic compounds. The *n*-butanol B subfraction showed the highest antioxidant activity with 86.39%. The results obtained indicate that *G. angustifolia* var. *bicolor* has compounds with potential antioxidant and tyrosinase inhibitory activity.

Keywords: *Guadua angustifolia* var. *bicolor*; antioxidant activity; anti-tyrosinase. activity.

Introdução

Desde os primórdios da civilização, o homem busca soluções e respostas na natureza para resolver suas dificuldades de sobrevivência. Assim, o uso de plantas para fins medicinais é recorrente desde os tempos remotos até os dias atuais. Um exemplo disso é o emprego de fármacos da classe dos opióides, originados da morfina, encontrada originalmente na espécie *Papaver somniferum* L., cujo uso documentado data de 5000 A.C.¹. Nesse contexto, a exploração de produtos do metabolismo secundário vegetal contribui para o desenvolvimento não só de novos medicamentos, como também pode ser expandido para aplicações na indústria alimentícia, cosmética e de higiene pessoal baseado em suas propriedades físicas, químicas e biológicas².

Bambus são nativos de todos os continentes, exceto Europa e Antártica e apresentam distribuição desde o nível do mar até altitudes de 4300m. Seus colmos são utilizados comumente para fins de construção, devido à sua resistência, e ainda, em países de origem asiática, suas folhas são utilizadas para revestir alimentos permitindo sua conservação³. Além disso, na Medicina Tradicional Chinesa os bambus são citados como fontes de compostos capazes de reduzir o risco de desenvolvimento de câncer e doenças cardíacas, como também auxiliam na desintoxicação do organismo, estudos apontam que fenólicos, flavonóides^{4,5}, lactonas e glicosídeos^{6,7} são as classes de substâncias presentes na espécie vegetal responsáveis por essas atividades biológicas. *Guadua* Kunth é um dos gêneros mais importantes que cresce na América Central e do Sul; suas espécies são mais altas e mais espessas do que as espécies de bambu asiáticas⁸. Estudos fitoquímicos com o gênero *Guadua* foram realizados com as espécies *G. angustifolia* Kuth⁹ e *G. chacoensis*¹⁰, mostrando que tais espécies apresentam atividade biológica antioxidante e anti-tirosinase, bem como semelhanças em suas composições químicas. *G. angustifolia* var. *bicolor* é classificada como uma das duas variedades de *G. angustifolia* sendo identificada pela primeira vez na em bosques tropicais úmidos na Colômbia¹¹. A variedade bicolor apresenta como característica muito marcante a presença de colmos verdes com listras amarelas e nós esbranquiçados. Contudo existem dificuldades taxonômicas na identificação de de outras espécies próximas do grupo *Guadua* que poderão ser minimizadas com estudos taxonômicos e fitoquímicos.

Antioxidantes são frequentemente utilizados na indústria alimentícia para retardar a degradação de alimentos. Também inibem o ataque de radicais livres em estruturas de DNA, RNA e proteínas nas células. Eles reagem com os radicais livres no meio formando estruturas de ressonância mais estáveis e pouco reativas devido à presença de elétrons π e/ou elétrons livres conjugados em suas estruturas, assim impedindo que as demais moléculas sejam afetadas¹². Nos bambus, as principais substâncias antioxidantes são os compostos fenólicos e os flavonóides.

A tirosinase é uma enzima presente nos melanócitos que promove a biossíntese da melanina, substância que dá cor à pele. A biossíntese da melanina inicia-se com a conversão da tirosina em dopamina, seguindo-se uma série de etapas oxidativas. A produção em excesso de melanina causa distúrbios dermatológicos, que levam ao surgimento de melasmas, podendo evoluir para um melanoma, isto é, um câncer de pele. Desse modo, a atividade anti-tirosinase visa a inibição da enzima para retardar o crescimento de um melasma, ou auxiliar no tratamento de um melanoma¹³.

Tendo em vista a importância dessas atividades e a falta de informações sobre a composição química e atividades biológicas dos bambus americanos, o principal objetivo deste trabalho foi a avaliação fitoquímica de *G. angustifolia* var. *bicolor*, a fim de comparar esta variedade com as demais do grupo. Adicionalmente, foi estudado o seu potencial antioxidante e anti-tirosinase.

Experimental

Preparo dos Extratos

As folhas de *G. angustifolia* var. *bicolor* foram coletadas no Laboratório de Experimentação com Bambu da Universidade Estadual Paulista, Campus Bauru. Após a secagem em estufa 40°C, as folhas picotadas (36,4 g) e extraídas em aparelho de Soxhlet com álcool etílico à 70%, até a total exaustão do material. Finalizado o processo, o solvente foi eliminado em um evaporador rotatório sob pressão reduzida. O extrato vegetal seco foi fracionado da seguinte por extração sólido-líquido com 4 porções de 100 mL de cada solvente de polaridade crescente, *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol, por 10 minutos em um agitador magnético. Posteriormente os solventes foram eliminados sob pressão reduzida com um evaporador rotatório, resultando em quatro frações diferentes.

Fracionamento das amostras

As frações de diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol foram fracionadas por cromatografia em coluna, usando de sílica gel como fase estacionária. Para tanto, 40 g de sílica gel foram colocadas em uma coluna de vidro com diâmetro de 4 cm até a altura de 5 cm, ocupando um volume de aproximadamente 63 mL. As amostras foram aplicadas após a mistura com 1 g de sílica para amostra, 500 mg da fração de diclorometano, 487 mg da fração de acetato de etila e 279,6 mg da fração de *n*-butanol. A eluição foi realizada com três porções de 90 mL de cada uma das polaridades, totalizando 270 mL da mistura de solventes em cada subfração. A composição das fases móveis utilizadas na separação de cada fração estão organizadas no Quadro 1. Cada fração deu origem a nove subfrações, das quais foram nomeadas de acordo com sua fração de origem, sendo diferenciadas por letras de A até I de acordo com a ordem de saída da coluna.

Quantificação dos Compostos Fenólicos Totais

Os fenólicos totais foram quantificados pelo método colorimétrico com o reagente de Folin-Ciocalteu^{10,11}. As amostras utilizadas foram solubilizadas em metanol:água (8:2 v/v) com concentrações entre 5-6 mg/mL e aplicadas em uma placa de 96 poços, para posteriormente, realizar a leitura de sua absorvância em 760 nm, após duas horas de reação. Os resultados foram expressos em µg equivalentes de ácido gálico por mg de extrato (µg EAG/mg).

Quantificação dos Flavonoides Totais

A quantificação de flavonoides foi feita pelo método de complexação com o reagente AlCl₃ à 1% em metanol (m/v)^{10,11}. As amostras utilizadas foram solubilizadas também em metanol:água (8:2 v/v) com concentrações entre 5-6 mg/mL. Os resultados foram expressos em µg equivalentes de quercetina por mg de extrato (µg EQ/mg)

Quadro 1-Sequência de polaridade dos eluentes utilizados na cromatografia em coluna com as frações de diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol de *G. angustifolia* var. *bicolor*.

Fração diclorometano (v/v)	Fração acetato de etila (v/v)	Fração <i>n</i> -butanol (v/v)
CHCl ₃ :hexano (50%)	CHCl ₃ :acetato de etila (50%)	Clorofórmio
CHCl ₃	Acetato de etila	Clorofórmio:metanol (90%)
CHCl ₃ :metanol (95%)	Acetato de etila:metanol (95%)	Clorofórmio:metanol (90%)
CHCl ₃ :metanol (90%)	Acetato de etila:metanol (90%)	Clorofórmio:metanol (70%)
CHCl ₃ :metanol (80%)	Acetato de etila:metanol (80%)	Clorofórmio:metanol (50%)
CHCl ₃ :metanol (70%)	Acetato de etila:metanol (70%)	Clorofórmio:metanol (30%)
CHCl ₃ :metanol (50%)	Acetato de etila:metanol (50%)	Clorofórmio:metanol (10%)
metanol	metanol	metanol
metanol:H ₂ O (50%)	metanol:H ₂ O (50%)	metanol:H ₂ O (99%)

Potencial antioxidante

O teste colorimétrico com o radical estável difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)^{10,11}, foi utilizado para determinar o potencial antioxidante das frações e subfrações. Para a realização do teste foi preparada uma solução de 0,02% de DPPH em metanol. As concentrações das amostras utilizadas foram variadas. Após o tempo do ensaio, as microplacas tiveram sua absorbância determinada em 517 nm.

Atividade anti-tirosinase

Para a determinação da atividade anti-tirosinase foi feito o teste colorimétrico com a enzima tirosinase, utilizando *L*-Dopa (3,4-di-hidroxi-*L*-fenilalanina) como substrato¹². As subfrações foram dissolvidas em diferentes soluções contendo 18 % DMSO, 2 % Tween 20 e 80 % tampão fosfato pH 6,8, de maneira que a concentração das amostras ficassem entre 0,9-1,1 mg/mL. Após o tempo de incubação, as microplacas tiveram sua absorbância determinada em 495 nm.

Resultados e Discussão

Quantificação dos Compostos Fenólicos e Flavonoides Totais

Na análise das frações de folhas de *G. angustifolia* var. *bicolor* foi possível notar a presença de compostos fenólicos em todas, sendo mais abundante na fração *n*-butanólica (Fig.1). Com relação aos flavonóides, todas as frações apresentaram valores semelhantes (Fig.1). Em comparação com *G. chacoensis*¹¹, o teor de fenólicos na espécie em estudo foi menor, Contudo, os teores de fenólicos foram similares aos reportados para *G. angustifolia* var. *angustifolia* Kunth¹⁰, com teores de flavonóides superiores. aos encontrados nessas duas espécies.

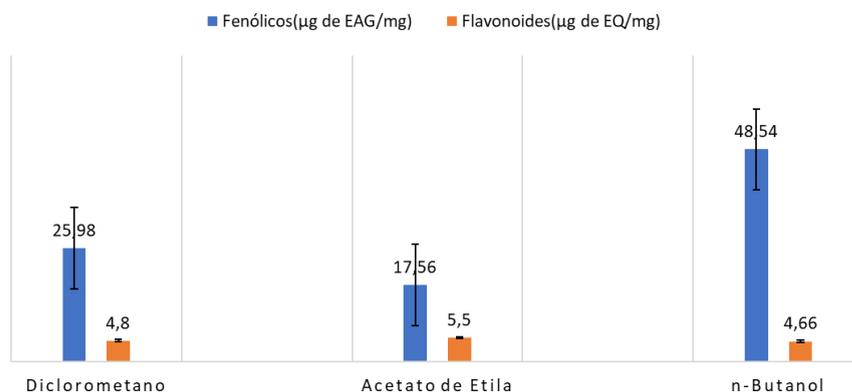


Figura 1- Determinação de compostos fenólicos e flavonóides nas frações de diclorometano, acetato de etila, e *n*-butanol das folhas de *G. angustifolia* var. *bicolor*, expressos, respectivamente, microgramas equivalentes de ácido gálico por miligrama de amostra ((µg EAG/mg) e microgramas equivalentes de quercetina por miligrama de amostra ((µg EQ/mg)

Após a separação em coluna, cada fração deu origem a nove subfrações que foram triadas para as atividades antioxidante e anti-tirosinase, aquelas com maior atividade, diclorometano (Di. C, D e E), acetato de etila (Ac. Et. G), e *n*-butanol (nBut. B, C e D), tiveram os teores de fenólicos totais e flavonoides determinados. Os resultados de suas quantificações quanto às classes químicas anteriormente citadas estão ilustradas na Fig.2, onde é possível notar a ausência de flavonóides em Di.C em relação aos demais, cujos valores são próximos entre si.

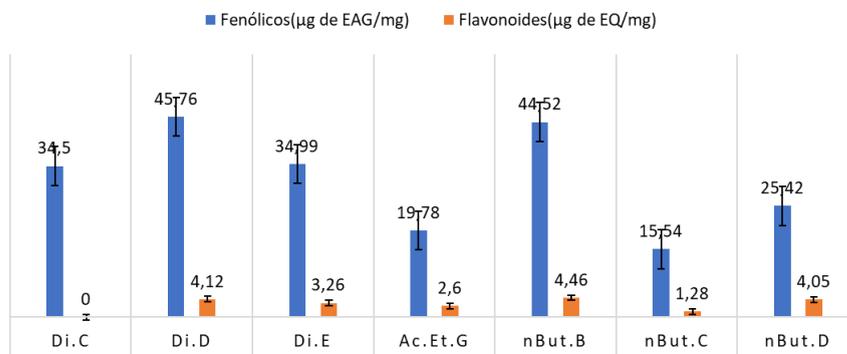


Figura 2- Determinação de compostos fenólicos e flavonóides nas subfrações de diclorometano (Di.C, D, E), acetato de etila (Ac. Et.G), e *n*-butanol (nBut. B, C, D) das folhas de *G. angustifolia* var. *bicolor*, expressos, respectivamente, microgramas equivalentes de ácido gálico por miligrama de amostra (µg EAG/mg) e microgramas equivalentes de quercetina por miligrama de amostra (µg EQ/mg)

Atividade Anti-tirosinase

Dentre as subfrações, as de diclorometano C (Di. C) e E (Di. E) demonstraram a maior atividade com a menor quantidade de amostra (Fig.3). Tendo em vista os resultados apresentados na Fig.2, a atividade de Di. C está muito provavelmente associada com presença de compostos fenólicos simples ou fenilpropanóides, uma vez que não foram detectados flavonoides nessa subfração.

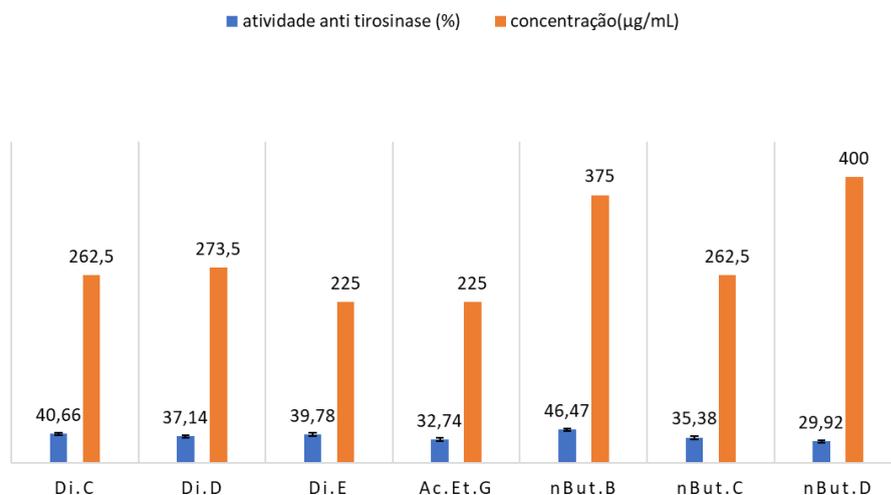


Figura 3- Atividade anti-tirosinase com as subfrações de diclorometano (Di. C, D e E), acetato de etila (Ac. Et. G), e *n*-butanol (nBut. B, C e D), expressos em porcentagem (%) em função da concentração de amostra utilizada nos poços da placa. (µg/mL).

Atividade Antioxidante

As frações de diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol foram quantificadas com relação ao seu potencial antioxidante, sendo expressas na forma de IC₅₀ (Fig.4), isto é, a concentração necessária para se neutralizar 50% do radical DPPH. As frações de diclorometano e acetato de etila apresentaram valores muito próximos, enquanto que a fração de *n*-butanol se destacou ao obter a mesma atividade em relação às demais com uma concentração bem mais baixa. Essa diferença de atividade pode estar relacionada com a quantidade superior de compostos fenólicos vista na Fig. 1 em comparação às demais.

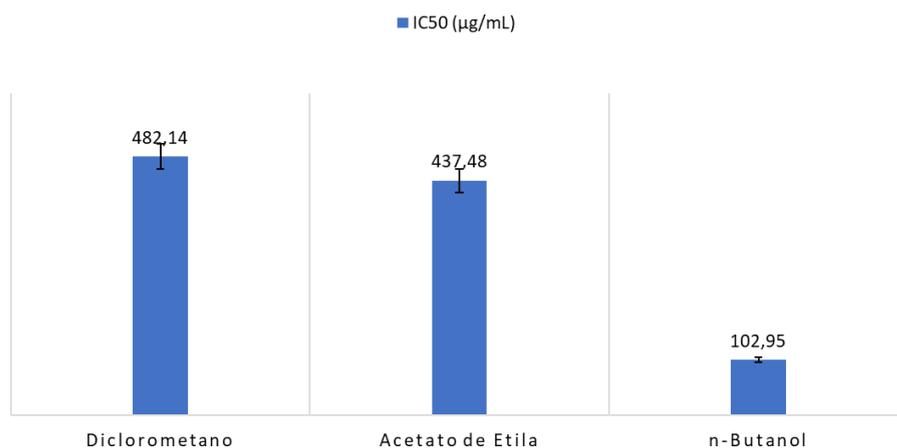


Figura 4- Atividade antioxidante das frações de diclorometano, acetato de etila, e *n*-butanol das folhas de *G. angustifolia* var. *bicolor*, expressos em função dos seus IC₅₀ (µg/mL).

Todas as subfrações, apresentaram atividade antioxidante (Fig.5), porém com diferentes valores em relação a quantidade de amostra utilizada. A subfração Ac.Et. G foi a menos potente para essa atividade, sendo a mais ativa a subfração Di. E, a qual também apresentou os melhores resultados para a inibição da tirosinase.

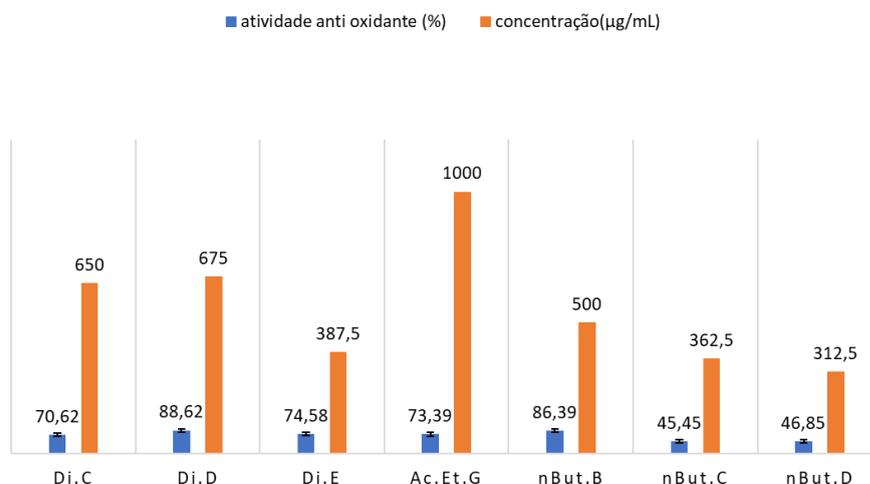


Figura 5- Atividade antioxidante das subfrações de diclorometano (Di.C, D e E), acetato de etila (Ac. Et. G), e *n*-butanol (nBut. B, C e D) das folhas de *G. angustifolia* var. *bicolor*, expressa em porcentagem (%) de inibição do radical DPPH para cada concentração de amostra analisada.

Conclusões

Os resultados obtidos indicam que *G. angustifolia* var. *bicolor* possui compostos com potencial atividade antioxidante e inibidora da tirosinase. Contudo, ainda são necessários estudos complementares para determinar a estrutura dos compostos com essas atividades, mas podem estar relacionados com a presença de compostos fenólicos e flavonoides. A análise dessas subfrações com técnicas hífenadas como cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas (LC-MS) e cromatografia à gás acoplada com espectrometria de massas (CG-MS) pode auxiliar a elucidação dessas estruturas química.

Agradecimentos

CNPq, Instituto de Química da USP.

Referências bibliográficas

- 1- Pinto, A. C.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; Epifanio, R. A.. *Quím. Nova*, **2002**, 25, 45. [https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000800009]
- 2- Phillipson, J.David; Anderson, Linda A.; *J. Ethnopharmacol.*, **1989**, 25, 61. [https://doi.org/10.1016/0378-8741(89)90045-7]
- 3- Hsiung, W., *J. Amer. Bamboo Soc.*, **1991**, 8, 168. [https://bamboo.org/_uploads/pdfs/JABSv08_1991_OCR.pdf]
- 4- Afifi, F.; Shervington, A.; Darwish, R. M; *Acta Technologiae et Legis Medicamenti*, **1997**, 8, 105. [doi:10.4103/0973-1296.204551]
- 5- Lu, B.; Wu, X.; Tie, X.; Zhang, Y; *Food Chem. Toxicol.*, **2005**, 43, 783. [https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.01.019]

- 6- Wróblewska, K. B: *Atividade antioxidante e fotoprotetora de bambus nativos do Sudeste brasileiro*; PhD Thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 2019.
[<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9138/tde-07052019-151812/pt-br.php>]
- 7- Londoño, X. In *Catalogue of New World Grasses (Poaceae): I. Subfamilies Anomochlooideae, Bambusoideae, Ehrhartoideae, and Pharoideae, Contr. U.S. Natl. Herb*; Judziewicz, E. J.; Soreng, R. J.; Davidse, G.; Peterson, P. M.; Filgueiras, T. S; Zuloaga, F. O., eds.; Smithsonian Institution: Washington, D.C. USA, 2000, vol. 39.
- 8- Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M.; *Chem. Biol. Interact.*, **2006**, *160*, 1. [7241].
[<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>]
- 9- Mukherjee, P. K.; Biswas, R.; Sharma, A.; Banerjee, S.; Biswas, S.; Katiyar, C.K.; *J. Herb. Med.*, **2018**, *14*, 1. [<https://doi.org/10.1016/j.hermed.2018.09.002>]
- 10- Oliveira, D. C. S.: *Composição química e atividades biológicas de extratos de Guadua angustifolia Kunth*; MSc Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 2019.
[<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9138/tde-22122021-132604/pt-br.php>]
- 11- Nunes, F. A.: *Composição química e atividades biológicas de extratos e frações de Guadua chacoensis (Rojas) Londoño & P.M. Peterson*; Msc Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 2020.
[<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46136/tde-28042022-141652/pt-br.php>]
- 12- Hwang J.H.; Lee B.M.; *J. Toxicol. Environ. Health A.*, **2007**, *70*, 393.
[<https://doi.org/10.1080/10937400600882871>. PMID: 17454565]