

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

ANA CAROLINE CATARIM TRIZÓLIO

**DETECÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS
EXTRATOS DE *Bambusa textilis* POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
(CLAE) E ESPECTRO ULTRAVIOLETA (UV)**

BAURU
2015

ANA CAROLINE CATARIM TRIZÓLIO

**DETECÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS
EXTRATOS DE *Bambusa textilis* POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
(CLAE) E ESPECTRO ULTRAVIOLETA (UV)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação da Profa. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino.

BAURU
2015

T842d

Trizólio, Ana Caroline Catarim

Detecção de constituintes químicos dos extratos de *Bambusa textilis* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectro ultravioleta (UV) / Ana Caroline Catarim Trizólio. -- 2015.

43f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Dulce Helena Jardim Constantino.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. *Bambusa textilis*. 2. CLAE. 3. Flavonóides. 4. UV. I. Constantino, Dulce Helena Jardim. II. Título.

ANA CAROLINE CATARIM TRIZÓLIO

**DETECÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS EXTRATOS DE
Bambusa textilis POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA (CLAE) E ESPECTRO ULTRAVIOLETA (UV)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, sob orientação do Profa. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Dulce Helena Jardim Constantino
Universidade do Sagrado Coração

Prof. Dr. Marcelo Telascrea
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 04 de dezembro de 2015.

Dedico este trabalho a minha avó Zenaide Joana Martucci Trizólio por todo incentivo e carinho durante toda esta trajetória.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força concebida para que pudesse superar meus próprios limites durante esta longa jornada.

Agradeço imensamente a minha família, em especial ao meu pai João Geraldo Trizólio e a minha avó Zenaide Joana Martucci Trizólio, pelo total apoio durante o período da graduação, e incentivo durante os períodos difíceis.

A Dulce, orientadora e querida amiga, meus mais sinceros agradecimentos por todo ensinamento passado ao longo desses anos. Obrigada por todo carinho e dedicação, você é um exemplo de profissional e de pessoa para mim.

Ao Dr. Alberto José Cavalheiro por co-orientar este projeto e disponibilizar o Laboratório do NuBBE para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Marco Antonio dos Reis Pereira por ceder gentilmente às amostras da *Bambusa textilis*.

Aos técnicos, Juliana e João, do laboratório do NuBBE por toda paciência e auxílio na realização das técnicas empregadas neste estudo. Sem vocês não seria possível à realização deste trabalho.

Ao Prof. Me. Dorival Coral pelo auxílio na identificação desta espécie vegetal.

Ao técnico do Laboratório de Química, Mateus, pelo auxílio na disponibilização do laboratório e equipamentos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Telascreea por toda disponibilidade e pela assessoria deste trabalho. Obrigada por toda dedicação, atenção e incentivo.

A Profa. Ma. Marcia Clélia Leite Marcelino, querida amiga, por todo carinho e por acreditar em meu potencial.

Aos meus preciosos amigos William, Bruna, Soll e Paula, meu imenso agradecimento a vocês por todo incentivo e apoio.

A minha querida irmã e meu namorado, Ana Beatriz e Jean, por cada palavra de carinho e compreensão nos momentos em que me ausentei.

“Leva-se tempo para se ter sucesso,
porque o sucesso é meramente a
recompensa natural de se usar o tempo
para se fazer bem qualquer coisa”.
(Joseph Ross)

RESUMO

Flavonóides têm atraído considerável interesse científico ao longo das décadas em virtude de seus efeitos benéficos à saúde, sendo comprovada sua eficácia em diferentes atividades biológicas. Tais propriedades dependem do arranjo dos anéis aromático e heterocíclico que compõe seu esqueleto. Estes compostos são encontrados em uma grande variedade de extratos vegetais e, largamente empregados em terapias alternativas em diferentes processos patológicos. Desde 2003, o Ministério da Saúde da China, citado por Zhang e colaboradores (2005), permite a utilização de bambus como aditivo alimentar devido à ação benéfica promovida por estes compostos encontrados nas folhas destas plantas. Devido a essa medida do Ministério da Saúde da China, diversos estudos com o intuito de quantificar os componentes responsáveis por essas ações e aprimorar técnicas já existentes, têm sido realizados atualmente análises através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) podendo ser associadas às técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN), ultravioleta (UV) e/ou espectrometria de massas (MS). O presente trabalho se propôs a detectar os compostos químicos presentes nas folhas da espécie de bambu *Bambusa textilis* através de CLAE analisando juntamente os espectros de UV. No procedimento de extração, foi obtido três frações distintas: aquosa, hexânica e de acetato de etila. A partir dos picos cromatográficos, foram analisados os espectros de UV de cada amostra. Os dados obtidos através dos espectros de UV dos picos cromatográficos revelaram bandas de absorção máxima em 270 e 330 nm, sugerindo que os compostos principais desta planta sejam polifenóis do grupo dos flavonóides.

Palavras-chave: *Bambusa textilis*. CLAE. Flavonóides. UV.

ABSTRACT

Flavonoids have attracted considerable scientific interest over the decades because of its beneficial effects on health, and proven its effectiveness in different biological activities. These properties depend on the arrangement of the aromatic and heterocyclic rings that make up your skeleton. These compounds are found in a wide variety of plant extracts and, in alternative therapies widely employed in different pathological processes. Since 2003, the Ministry of Health of China, quoted by Zhang and colleagues (2005), allows the use of bamboo as a food additive because of the beneficial action promoted by these compounds found in the leaves of these plants. Due to this measure the Ministry of Health of China, several studies in order to quantify the components responsible for these actions and improve existing techniques, have now been carried out analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC) can be associated with technical Nuclear magnetic resonance (NMR), ultraviolet (UV) and / or mass spectrometry (MS). This study aimed to detect the chemical compounds present in the leaves of the species of bamboo *Bambusa textilis* by HPLC analyzing along the UV spectra. In the extraction procedure, it was obtained in three distinct fractions: water, hexane and ethyl acetate. From the chromatographic peaks, the UV spectra of each sample were analyzed. The data obtained from the UV spectra of the chromatographic peaks showed maximum absorption bands at 270 and 330 nm, suggesting that the major compounds of this plant are polyphenols from the group of flavonoids.

Keywords: *Bambusa textilis*. HPLC. Flavonoids. UV.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA	10
3	OBJETIVOS	14
3.1	OBJETIVO GERAL.....	14
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
4	MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	15
4.2	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	15
4.3	REAGENTES	16
4.4	EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO	16
4.5	PARTIÇÃO DA FRAÇÃO EM COLUNA ABERTA.....	17
4.6	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA CLAE	17
4.7	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA CLAE-DAD	17
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
6	CONCLUSÕES	34
	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

No reino vegetal há uma vasta variedade de compostos químicos promotores de importantes ações biológicas. Entre estes compostos, existem os flavonóides que compõe um grande grupo de compostos polifenólicos e são ubíquos em plantas.

Devido a sua ubiquidade, estão presentes na dieta humana e assim como nas plantas, eles possuem atividades biológicas de interesse farmacológico podendo promover diversas ações, sendo a principal a ação antioxidante.

Através de processos oxidativos pode ocorrer a formação de radicais livres a partir de compostos endógenos ou em circunstâncias patológicas incluindo envelhecimento, reações inflamatórias, câncer, entre outras circunstâncias que acarretam severas consequências para o organismo. A ação antioxidante desses compostos pode retardar ou inibir a oxidação de moléculas.

A diversidade de subgrupos de flavonóides é resultante da infinidade de possibilidades de substituições dos anéis que compõem sua estrutura química, consequentemente a variedade de efeitos biológicos está atribuída a estas substituições estruturais e ao subgrupo em questão.

Por serem onipresentes no reino vegetal, os flavonóides também se encontram abundantemente em bambus, em maior concentração nas folhas. Este vegetal, assim como outros, está presente no cotidiano do ocidente há milênios, sendo empregados principalmente em construções, aditivos alimentares e fármacos.

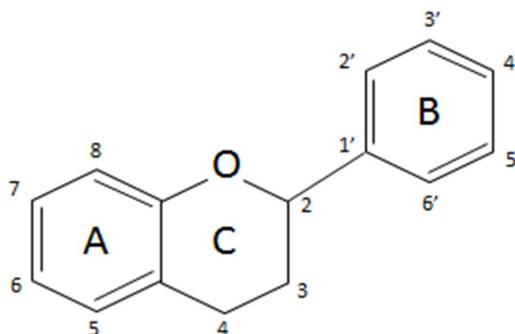
Em relação à utilização dos bambus como aditivos alimentares, há a necessidade de estudos que quantifiquem o teor de flavonóides presentes. Métodos cromatográficos veem sendo utilizados com esse intuito.

Ao longo das décadas diversos estudos têm reforçado a importância das atividades promovidas pelos flavonóides em relação à prevenção e/ou inibição de doenças, para melhor elucidação da interação destes compostos com o organismo. A aplicabilidade dos flavonóides encontrados em diferentes espécies de bambu deve ser explorada, levando-se em conta a fácil acessibilidade deste vegetal e ao seu desenvolvimento rápido. Havendo necessidade também de aprimoramento de técnicas quantitativas deste composto em questão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Os flavonóides compõem um grande grupo de compostos polifenólicos e são ubíquos no reino vegetal, sendo biossintetizados via rota dos fenilpropanóides. Quimicamente os flavonóides possuem um esqueleto C₁₅ (C₆-C₃-C₆), constituído por dois anéis aromáticos (A e B) ligados a um anel heterocíclico (C) (Figura 1). Devido à estrutura química básica dos flavonóides há uma infinidade de possibilidades de substituições dos anéis A, B e C, resultando em diversos subgrupos. De acordo com a posição de ligação do anel heterocíclico e seus níveis de oxidação, eles podem ser divididos em diferentes classes, sendo as principais: antocianina, flavanas, flavononas, flavonas, flavonóis e isoflavonóides (BORS et al., 1990; GROTEROLD, 2006; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA 1996).

Figura 1- Estrutura Química Básica dos Flavonóides



Fonte: Elaborada pela autora.

Em relação aos espectros de UV, os flavonóides podem ser caracterizados por um espectro no UV contendo dois máximos de absorbância, sendo um em 330-370 nm (Banda I) e outro em 240-280 nm (Banda II). As diferenças entre as subclasses de flavonóides podem ser distinguidas através das razões entre as absorções máximas M₁ (264 nm) e M₂ (340 nm) que são típicas e diferentes para cada subclasse. A análise dos espectros no UV baseados na região de absorção de 300-400 nm (Banda I) permite identificar as insaturações entre os carbonos C₂ e C₃. Saturações entre esses (dihidroflavonol) causam o desaparecimento da banda de absorção máxima em 350 nm. Por outro lado, a presença da dupla ligação causa um máximo de absorção nessa mesma banda (ANDERSEN; FOSSEN, 2006). As

agliconas diferentes pertencentes a uma mesma subclasse de flavonóides podem ser diferenciadas por comparação dos dados no UV na região 250-290 nm (Banda II), onde a forma da banda de absorção máxima esta relacionada com o padrão de substituição. Em relação ao açúcar, a intensidade de absorção em 350 nm esta relacionada com a natureza do carboidrato e sua posição de ligação com relação à aglicona (ANDERSEN; FOSSEN, 2006; CAVALHEIRO; YOSHIDA, 2000; TELASCREA, 2006).

Os efeitos biológicos dos flavonóides dependem da estrutura química, classe, grau de hidroxilação e outras substituições e conjugações (HARBONE; MABRY, 1982). Eles exercem importante papel no mecanismo de defesa de plantas, protegendo contra radiação ultravioleta, participando na fotossíntese e atuando em outros mecanismos de defesa (MIDDLETON et al., 1998).

Por serem encontrados abundantemente em diferentes partes de plantas, os flavonóides estão presentes na alimentação humana, sendo encontrados, por exemplo, em frutas, verduras, chás e vinho. A biodisponibilidade destes compostos está diretamente relacionada com a variação sazonal, temporal, espécie de planta e no preparo e processamento dos alimentos (AHERNE; O'BRIEN, 2002; COOK; SAMMAN, 1996; HERTONG; HOLLMAN; KAHN, 1992).

Os flavonóides têm atraído considerável interesse ao longo das décadas devido seus efeitos benéficos à saúde, sendo comprovada a eficácia de diferentes atividades como ação antibacteriana, hepatoprotetora (LEE et al., 2003), anti-inflamatória (FRIESENECKER et al., 1995), anticancerígena (BIRT et al., 2001; FRANKE et al., 1998), antiviral, cardioprotetora, inibição da peroxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (KUMAR; PANDEY, 2013; RANKIN et al., 1993), inibição enzimática (HOYWEGHEN et al., 2014) quelação de íons metálicos, sequestro de radicais livres, atividade pró e antioxidante (BORS et al., 1990; CAO et al., 1997; MIDDLETON, 1998; NARAYANA et al., 2001).

A atividade antioxidante desses compostos depende do arranjo dos grupos funcionais sobre a estrutura nuclear e tem sido atribuída a capacidade de eliminar radicais livres e/ou quelantes de íons metálicos, podendo variar de acordo com a classe (BORS, 1990; BROWN et al., 1995; HONDNICK et al., 1988; KUMAR; PANDEY, 2013; LEOPOLDINI et al., 2006). Através da atividade antioxidante, os flavonóides, são capazes de imunoestimular a defesa do organismo (SEKI et al., 2008), inibir sistemas enzimáticos (ciclooxigenase, lipoxigenase, óxido nítrico sintase-

indutível) (HOYWEGHEN et al., 2014; TUNON et al., 2009), entre outros mecanismos de ação.

Mutoh et al. (2000) sugerem em seu trabalho que o número de grupos hidroxila no anel B e a presença de um grupo oxo na posição 4 do anel C, juntamente com baixa densidade de elétrons do átomo de oxigênio do grupo hidroxila do anel A, são requisitos estruturais importantes de flavonóides capazes de inibir a cicloxigenase-2 (COX-2). Enquanto a modulação por flavonóides da COX-2 e da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), *in vitro*, constatada por Raso et al. (2001), sugere atuação anti-inflamatória dos flavonóides.

Desde 2003 o Ministério da Saúde da China, citado por Zhang et al. 2005, permite a utilização de bambus como aditivo alimentar devido à ação antioxidante e quelante de íons metálicos encontrados nas folhas destas plantas. Esses compostos são encontrados em várias espécies de bambu, destacando-se os gêneros *Phyllostachys*, *Sasa* e *Bambusa* (LEE et al.,2010; MU et al., 2004; NI et al., 2012; SEKI et al., 2008; WANG et al., 2012a) .

Historicamente o bambu é presente no cotidiano ocidental há milênios, sendo designados em construções, ornamentos e atualmente além de serem utilizadas para tal finalidade são utilizados também como aditivos alimentar devido à ação antioxidante dos flavonóides encontrados nas folhas (GONG et al., 2014; PEREIRA; BERALDO, 2008;). Na literatura há relatos de diversos benefícios promovidos por flavonóides encontrados nas folhas que corroboram para o considerável interesse recente em diversos estudos.

Lee et al. (2010) relatam em seu trabalho o efeito neuroprotetor proveniente da atividade antioxidante, especialmente da luteolina 6-C-(6"-O-trans-cafeoilglucosideo), a partir do extrato de *Phyllostachys nigra*. Além da atividade antioxidante (GONG et al., 2014; HASEGAWA et al., 2008; MU et al., 2004), são descritos demais efeitos medicinais das folhas do bambu como atividade imunoestimulante em camundongos portadores de tumor S180 e C38 e estímulo da atividade citotóxica dos linfócitos natural killer (NK) e macrófagos (SEKI et al., 2008), efeito antimetastático em células tumorais HT1080 e diminuição do número de metastases em camundongos portadores de tumor B16F10, inibição de NF- κ B e cicloxigenase (HOYWEGHEN et al., 2014).

Os principais componentes funcionais encontrados nos extratos das folhas são glicosídeos de flavona-C, incluindo isoorientina, isovitexina, orientina, vitexina,

que têm sido utilizados como marcadores na determinação de produtos comerciais (WANG et al., 2012b). Para a identificação desses componentes, os principais métodos analíticos que apresentam sensibilidade para a identificação de glicosídeos de flavona-C são cromatografia em camada delgada (TLC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) podendo ser associadas às técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN), ultravioleta (UV) e/ou espectrometria de massas (MS) (MABRY; THOMAS, 1970; WANG et al., 2012b; ZHANG et al., 2005).

Gong et al. (2014) em seu estudo relata a presença de compostos característicos como ácidos fenólicos e flavonóides C-glicosídeos, sendo encontrados: ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, orientina, homoorientina, vitexina e isovitexina em três extratos diferentes obtidos de bambu da espécie *Phyllostachys nigra*.

Através de cromatografia em camada fina, a espécie *Bambusa textilis* demonstrou possuir a maior atividade antioxidante no extrato das folhas em comparação com as demais estudadas por Wang et al. (2012a). Desta espécie foram identificados três compostos antioxidantes como isoorientin 4'' -O- β -D-xilopyranoside, isorientin 2''-O- α -L - rhamnoside e isoorientin de acordo com avaliação por UV, MS e RMN. Em estudo anterior, Wang et al. (2012b) ainda constatou que os principais componentes funcionais das folhas desta espécie são isoorientin e orientina. A hipótese desse estudo é que a sazonalidade tenha interferência na síntese desses compostos.

Compostos absorvidos na corrente sanguínea têm grande probabilidade de serem constituintes eficazes e de interesse farmacológico. Wang et al. (2012c) detectou três compostos potencialmente bioativos a partir de extratos de *B. textilis* em plasma de coelhos, sendo estes: (*E*)- p- ácido cumárico, (*Z*)-p- ácido cumárico e apigenin-8-C- β -D-(2''-O- α -L-rhamnosyl)-glucopyranoside.

Em vista do exposto, o presente estudo teve por finalidade detectar possíveis substâncias ativas e determinar componentes de interesse farmacológico que possam contribuir para o desenvolvimento de estudos futuros com aplicações terapêuticas. Para tanto, investigamos a constituição química dos flavonóides de espécimes de *Bambusa textilis* provenientes de Bauru-SP em comparação com os dados obtidos na literatura.

3 OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo estão descritos a seguir.

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a constituição fitoquímica das folhas da espécie de bambu *Bambusa textilis* em extratos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) extrair e analisar as frações brutas obtidas das folhas da *Bambusa textilis*;
- b) detectar componentes químicos através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE;
- c) analisar e comparar os espectros de UV dos picos cromatográficos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

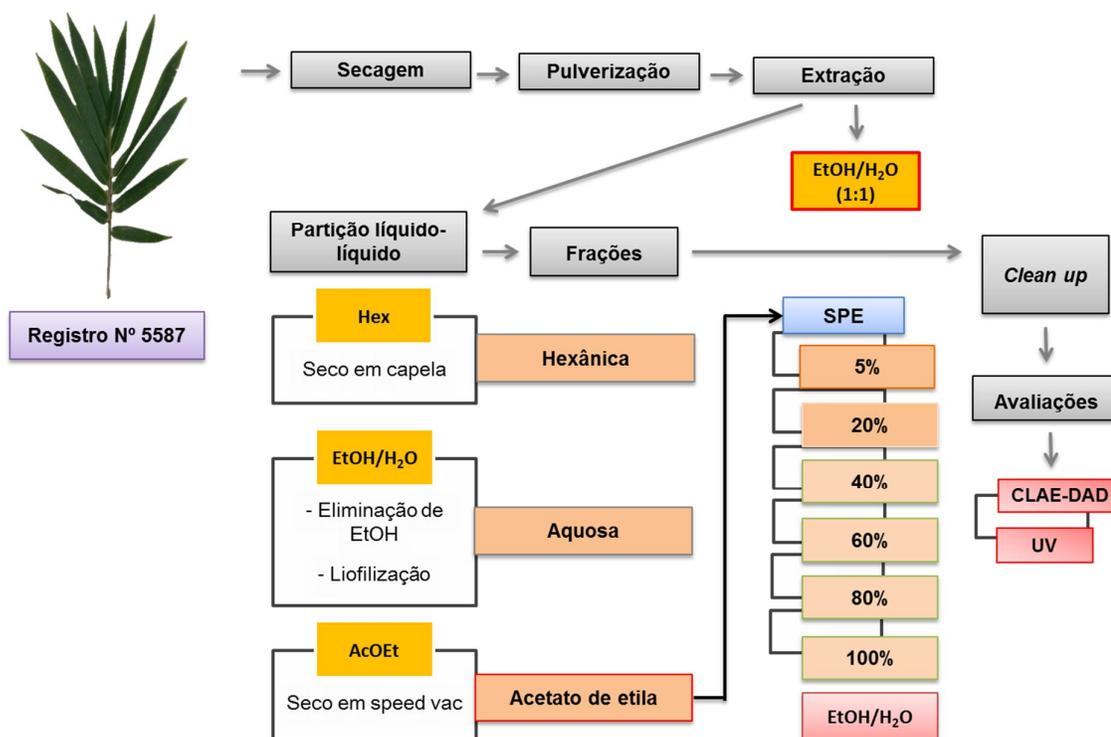
A seguir estão descritos os materiais e métodos utilizados no presente estudo.

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O enfoque do presente trabalho foi o estudo do perfil fitoquímico de folhas de *Bambusa textilis*, vulgarmente chamado bambu. A seguir, encontra-se o fluxograma de processo desenvolvido na obtenção das amostras brutas e frações que foram produzidas e analisadas neste trabalho (Figura 2).

Figura 2 - Delineamento experimental

➤ Folhas de *B. textilis*



Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A coleta das folhas foi realizada no dia 13 de julho de 2015 na Universidade Estadual Paulista - UNESP, no campus de Bauru. As folhas foram encaminhadas ao

herbário da Universidade do Sagrado Coração onde foram secas e devidamente identificadas. Após a identificação uma exsicata foi incorporada no herbário sob o número de registo 5587.

4.3 REAGENTES

Durante a extração e a análise cromatográfica foram utilizados os seguintes solventes: Água Ultrapura (18 M Ω) obtida no sistema Millipore (Merk Milli-Q Element A10), Álcool Etilico grau PA (Synth®), Álcool Metílico grau PA (Synth®), Acetato de Etila grau PA (Êxodo®), Hexano grau PA (Synth®), Álcool de Cereais (Synth®) e Metanol Grau CLAE (J.T.Baker®).

4.4 EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO

O extrato bruto foi solubilizado em etanol/água na proporção de 1:1 e sonificado durante trinta minutos. Este procedimento foi repetido três vezes. Em seguida foi realizado o fracionamento do extrato através de partição líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades e em ordem crescente de polaridade, hexano (HEX) e acetato de etila (AcOEt).

Inicialmente o hexano foi adicionado juntamente com a fração etanol/água em um funil de separação e após a emulsão ser desfeita, as fases foram separadas. Esta etapa foi repetida mais duas vezes. A fração hexânica foi concentrada em rotaevaporador Heidolph (Laborota 4000 efficient) e seca em capela. A fração aquosa foi rotaevaporada e transferida novamente para o funil de separação com o solvente acetato de etila e 10% H₂O. Este procedimento foi repetido mais duas vezes, no entanto sem a adição de H₂O. Após a separação das fases, a fração aquosa foi rotaevaporada novamente com o intuito de eliminar qualquer resquício de acetato de etila dissolvido e liofilizados (Christ Alpha 2-4 LD Plus). Enquanto que a fração de acetato de etila foi concentrada em rotaevaporador e seca em speed vac (Thermo, Savant). Ao término da extração, as frações foram armazenadas em geladeira (-20°C) até o uso para experimento.

4.5 PARTIÇÃO DA FRAÇÃO EM COLUNA ABERTA

A fração de AcOEt foi ressuspensa em álcool metílico para a extração em fase sólida (SPE). Essa solução foi misturada a uma quantidade mínima de sílica C18 (Poliygoprep 60-50 C₁₈ Macherey-Nagel) em um graal de porcelana. Após a completa evaporação do solvente, a amostra foi particionada em coluna aberta de vidro, com o preenchimento de 15 g de sílica C18 (Poliygoprep 60-50 C₁₈ Macherey-Nagel). Para o cálculo do volume morto utilizou-se a fórmula $V_m = 0,5 \times L \times d^2$. Então, a partição foi realizada com água-etanol, em concentrações crescentes de etanol, sendo chamado de SPE 5% (95%H₂O e 5%EtOH), SPE 20% (80%H₂O e 20%EtOH), SPE 40% (60%H₂O e 40%EtOH), SPE 60% (40%H₂O e 60%EtOH), SPE 80% (20%H₂O e 80%EtOH) e SPE 100% (100%EtOH), respectivamente.

O material foi concentrado em rotaevaporador, sendo que as amostras SPE 5%, SPE 20%, SPE 40% e SPE 60% foram liofilizadas e, SPE 80% e SPE 100% foram secas em *speed vac*. Ao término da partição as amostras foram armazenadas em freezer até sua utilização.

4.6 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA CLAE

Após a secagem as frações aquosa, acetato de etila, SPE 5%, SPE 20%, SPE 40%, SPE 60%, SPE 80%, SPE 100% foram ressuspensas em quantidade necessária de metanol-água para a realização de um *clean up* das amostras em cartucho contendo resina modificada do tipo C18, eluindo com metanol-água na proporção 95:5 e filtrando em filtro de seringa 0,22 µm de poro. A fração hexânica não passou por tais processos.

4.7 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA CLAE-DAD

As análises por CLAE foram realizadas utilizando equipamento analítico da marca (Shimadzu ® modelo Prominence) equipado com injetor automático (Shimadzu ®, SIL10AP), sistema de bombas (LC-20AT) e detector de arranjo de diodos (DAD) (SPD-M20A). A coluna utilizada para as análises foi Phenomenex® (Luna C18(2), (250 x 4,6 mm, 5 µm)). A eluição foi realizada com solventes de grau cromatográfico. A fase móvel utilizada foi H₂O ultrapura MilliQ (Solvente A) e

Metanol Grau CLAE da J.T.Baker® (Solvente B), utilizando um método de gradiente exploratório, de 5%-100% de B em 40 minutos. Os cromatogramas foram registrados nos comprimentos de onda (λ) = 220nm, 254nm, 280nm, 300nm e 350nm.

A fração de acetato de etila também foi analisada pelo método adaptado de cana-de-açúcar estabelecido por Leme et al. (2014), sendo a fase móvel utilizada H₂O ultrapura MilliQ com 1% de ácido acético (Solvente A) e Metanol Grau CLAE com 1% de ácido acético (Solvente B), 90% de A e 10% de B em 0 minutos, 50% de A e 50% de B em 55 minutos, 0% de A e 100% em 65 minutos e 90% de A e 10% de B em 80 minutos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A coleta das folhas de *Bambusa textilis* (Figura 3) foi realizada no dia 13 de julho de 2015, na propriedade particular do Dr. Marco Antonio dos Reis Pereira, docente da Universidade Estadual Paulista - UNESP. Foram coletadas folhas de seis indivíduos distintos de idades variadas, sendo posteriormente encaminhadas ao herbário da Universidade do Sagrado Coração -USC, onde foram secas e devidamente identificadas. Após a identificação uma exsicata foi incorporada no herbário sob o número de registro 5587.

As folhas foram secas durante sete dias em envelopes de papel Kraft em estufa de secagem com circulação de ar e temperatura controlada (inferior a 60°C), para permitir maior evaporação de umidade residual, evitando a contaminação do material. Após esse período, as amostras foram trituradas em liquidificador industrial e posteriormente moídas em moinho de facas (Wiley) com malha de 1,5 mm, obtendo-se 852,56g de material moído a partir das folhas. O armazenamento das amostras foi feito em geladeira (- 5°C) até sua utilização.

Figura 3 - Folha de *Bambusa Textilis*



Fonte: Elaborada pela autora.

No dia 10 de agosto de 2015 as amostras foram encaminhadas ao Instituto de Química, da Universidade Estadual Paulista do campus de Araraquara para a realização da parte experimental deste estudo sob supervisão do Dr. Alberto José Cavalheiro e auxílio dos técnicos João e Juliana.

No procedimento de extração, a massa de 852,56g de folhas moídas e trituradas foi dividida em dois frascos do tipo erlenmeyer e foram adicionados cerca de 500mL de uma mistura binária formada por etanol/água (1:1), sendo

posteriormente os dois erlenmeyers colocados em sistema de ultrassom para sonicação (Figura 4). O tempo de sonicação foi de 30 minutos. Este procedimento foi repetido em triplicata, obtendo-se 2,5L de extrato bruto etanol/água.

Posteriormente, foi realizada a partição líquido/líquido com cada uma das frações. A partição envolveu o uso de solvente de ordem crescente de polaridade. A extração líquido-líquido foi processada através de etapas: partição entre hexano: etanol-água e acetato de etila em funil de separação de vidro (2 litros) da marca Pyrex. Foram obtidas 3 frações: hexânica (HEX), aquosa (etanol/água) e acetato de etila (AcOEt), de acordo com a Figura 6. Foram utilizados solventes da marca *Synth* (reagente analítico, São Paulo, Brasil) e água ultrapura (18 MΩ) obtida no sistema Millipore (Merk Milli-Q Element A10).

Figura 4 - Sonicação em banho de ultrassom e partição líquido-líquido



Fonte: Elaborada pela autora.

Para a partição líquido/líquido, inicialmente o volume total foi dividido em dois funis de separação (A= 1,4 L e B= 1,1L) sendo adicionado $\frac{1}{3}$ do volume total de hexano a cada funil de separação. Os funis foram agitados e ficaram em repouso dentro da capela sob temperatura ambiente (20°C) até que a emulsão fosse desfeita e as fases separadas, sem a utilização de sais,. Esta etapa foi repetida mais duas vezes. A fração hexânica foi concentrada em rotaevaporador Heidolph (Laborota 4000 efficient), como mostra a figura 5 e seca em capela.

Figura 5 - Rotaevaporador



Fonte: Elaborada pela autora.

Devido à miscibilidade do etanol com acetato de etila, a fração etanol/água foi concentrada a fim de eliminar o solvente etanol e transferi-lo novamente para o funil de separação, sendo adicionado $\frac{1}{3}$ do volume total de acetato de etila e 10% do volume total de H_2O . Este procedimento foi repetido mais duas vezes, no entanto sem a adição de H_2O .

Após a separação das fases, a fração aquosa foi rotaevaporada novamente com o intuito de eliminar qualquer resquício de acetato de etila dissolvido e concentrar a amostra. Posteriormente as amostras foram transferidas para frascos do liofilizador e colocadas dentro de uma caixa de isopor com nitrogênio líquido, e após as amostras estarem completamente congeladas, os frascos foram acoplados ao liofilizador (Christ Alpha 2-4 LD Plus) a 610 PA, a temperatura de 0,01 °C (este procedimento foi realizado para as demais amostras liofilizadas), (Figura 6) Enquanto que a fração de acetato de etila foi concentrada em rotaevaporador e seca em *speed vac* (Thermo, Savant) (Figura 7). Ao término da extração, as frações foram armazenadas em freezer (-20°C) até sua utilização.

Figura 6 - Liofilizador



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 7 - Speed vac



Fonte: Elaborada pela autora.

Posteriormente a fração de AcOEt (1,42g) foi ressuspensa em álcool metílico (cerca de 10mL) para a extração em fase sólida (SPE). Essa solução foi misturada a uma quantidade mínima de 5g de sílica C18 (Poliygoprep 60-50 C₁₈ Macherey-Nagel) em um graal de porcelana (Figura 8). Após a completa evaporação do solvente, a amostra foi particionada em coluna aberta de vidro, com o preenchimento de 15 g de sílica C18 (Figura 9). Para o cálculo do volume morto utilizou-se a fórmula:

$$V_m = 0,5 \times L \times d^2 \quad (1)$$

Onde:

V_m = volume morto

L = comprimento da coluna

d = diâmetro

Então, a extração em fase sólida foi realizada com água-etanol, em concentrações crescentes de etanol, sendo chamado de SPE 5% (95% H_2O e 5%EtOH), SPE 20% (80% H_2O e 20%EtOH), SPE 40% (60% H_2O e 40%EtOH), SPE 60% (40% H_2O e 60%EtOH), SPE 80% (20% H_2O e 80%EtOH) e SPE 100% (100%EtOH), respectivamente.

O material foi concentrado em rotaevaporador, sendo que as amostras SPE 5%, SPE 20%, SPE 40% e SPE 60% foram liofilizadas e, SPE 80% e SPE 100% foram secas em *speed vac*. Ao término da partição as amostras foram armazenadas em freezer até sua utilização.

Figura 8 - Amostra misturada com C18



Fonte: Elaboradas pela autora.

Figura 9 - Partição em coluna aberta de vidro



Fonte: Elaboradas pela autora.

Após a secagem de todas as amostras como descrito anteriormente, uma quantidade mínima de cerca de 10mg foram separados para ser analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com exceção da fração hexânica. Sendo primeiramente realizado um *clean up* (limpeza) das amostras em cartucho contendo resina modificada do tipo C18. Para isso as amostras foram ressuspendidas em quantidade suficiente de metanol-água (1mL), variando a quantidade de cada solvente de acordo com a amostra em questão, eluindo metanol-água na proporção 95:5 e filtrando em filtro de seringa 0,22 μ m de poro. Para o cálculo do volume morto (V_m) utilizamos a fórmula $V_m = 0,5 \times L \times d^2$.

O condicionamento da C18 é realizado com seis vezes o volume morto (5mL) de 100% metanol, em seguida ocorreu o equilíbrio com a aplicação onde 6 volumes mortos, o equilíbrio foi realizado com seis vezes o volume morto (5mL) de metanol-água na proporção 95:5. Então a amostra foi injetada e novamente é passado metanol-água na proporção 95:5 (4mL) para a eluição e ao término é realizado a limpeza com seis vezes o volume morto (5mL) de 100% metanol.

Após o *clean up* de todas as amostras, com exceção da fração de hexano, foram realizadas as análises cromatográficas. As amostras foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando equipamento analítico equipado com injetor automático, sistema de bombas e detector de arranjo de diodos (DAD) (Figura 10). A coluna utilizada para as análises foi Phenomenex® (Luna C18(2), (250 x 4,6 mm, 5 μ m). A eluição foi realizada com solventes de grau cromatográfico. A fase móvel utilizada foi H₂O ultrapura MilliQ (Solvente A) e Metanol Grau CLAE (Solvente B), utilizando um método de gradiente exploratório, de 5% à 100% de B em 40 minutos. Os cromatogramas foram registrados nos comprimentos de onda (λ) = 220nm, 254nm, 280nm, 300nm e 350nm.

Ambas as análises cromatográficas foram monitoradas com o auxílio do software LCSolutions.

Figura 10 - Cromatógrafo

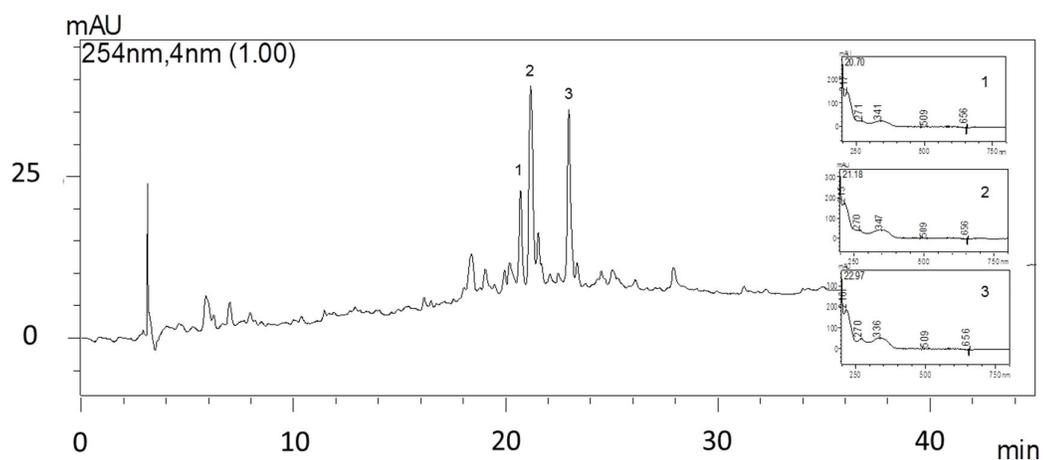


Fonte: Elaborada pela autora.

A fração de acetato de etila também foi analisada pelo método adaptado de cana-de-açúcar estabelecido por Leme et al. (2014), sendo a fase móvel utilizada H₂O ultrapura MilliQ com 1% de ácido acético (Solvente A) e Metanol Grau CLAE com 1% de ácido acético (Solvente B), 90% de A e 10% de B em 0 minutos, 50% de A e 50% de B em 55 minutos, 0% de A e 100% em 65 minutos e 90% de A e 10% de B em 80 minutos. A seguir estão representados alguns cromatogramas e espectros de UV das amostras analisadas. Os cromatogramas foram registrados nos comprimentos de onda (λ) = 220nm, 254nm, 280nm, 300nm e 350nm.

A análise da fração aquosa em 254nm indicou a presença de pelo menos 3 picos cromatográficos principais, como pode ser observado na Figura 11. Os espectros de UV dos três picos indicados como sendo 1, 2 e 3 mostram máximos de absorvância em 270 e 347 nm.

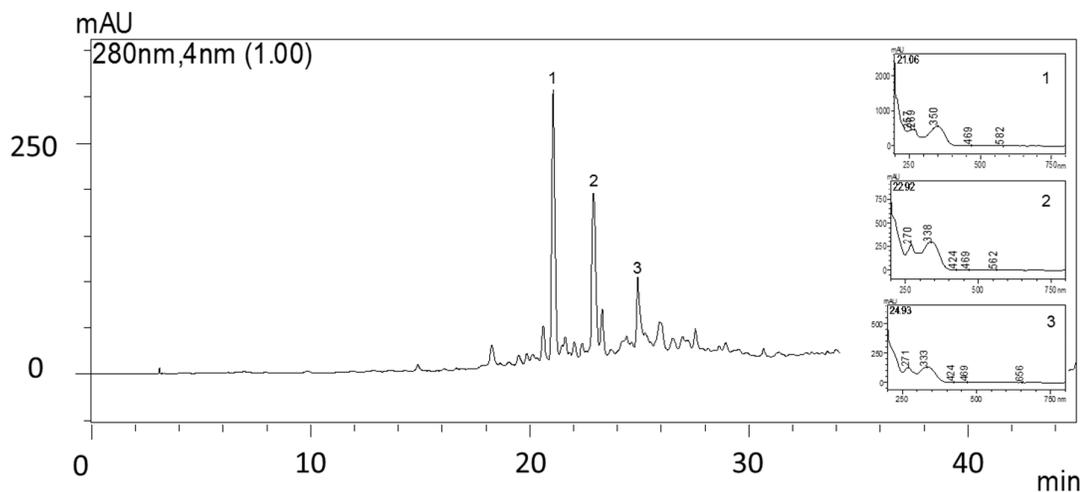
Figura 11 - Análise Cromatográfica da Fração Aquosa em 254nm



Fonte: Elaborada pela autora.

A fração acetato de etila foi analisada em 280 nm e foram observados a presença de três picos cromatográficos entre 20 e 26 minutos. A análise dos espectros de UV desses picos mostrou bandas de absorção máxima em 270 e 330 nm, como mostra a Figura 12.

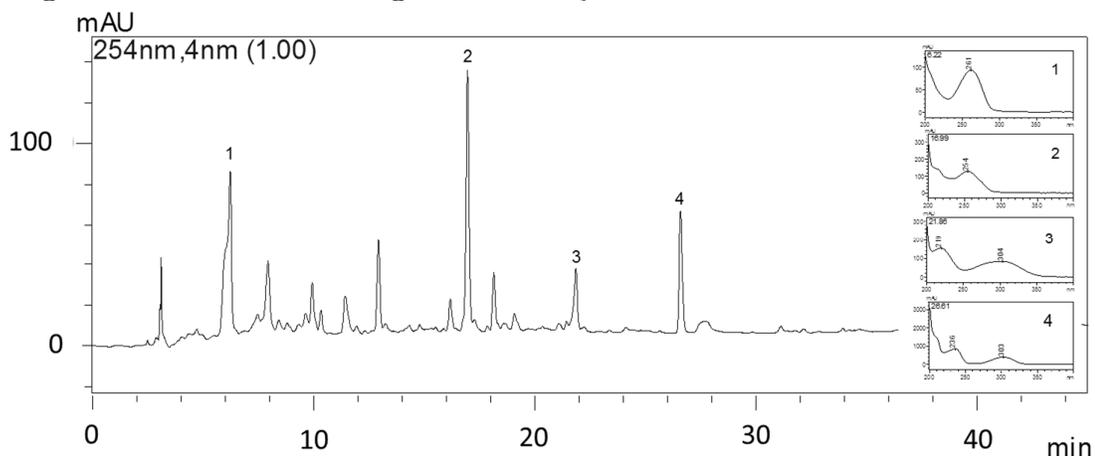
Figura 12 - Análise Cromatográfica da Fração Acetato de Etila em 280 nm



Fonte: Elaborada pela autora.

Após a extração em fase sólida, a fração SPE 5% foi analisada por CLAE a 254nm e puderam ser observados picos de 5 a 28 minutos, sendo que foram obtidos espectros de UV para os picos indicados por 1, 2, 3 e 4. O espectro de UV do primeiro pico cromatográfico indicou um máximo de absorbância em 260nm, enquanto que o pico 2 apresentou máximos de absorbância em 254nm e os picos 3 e 4 mostraram mesmos perfis, indicando se tratar de substâncias de mesma classe, apresentando bandas de absorção máxima em 220 e 304 nm, como mostra a Figura 13.

Figura 13 - Análise Cromatográfica da Fração SPE 5% em 254 nm

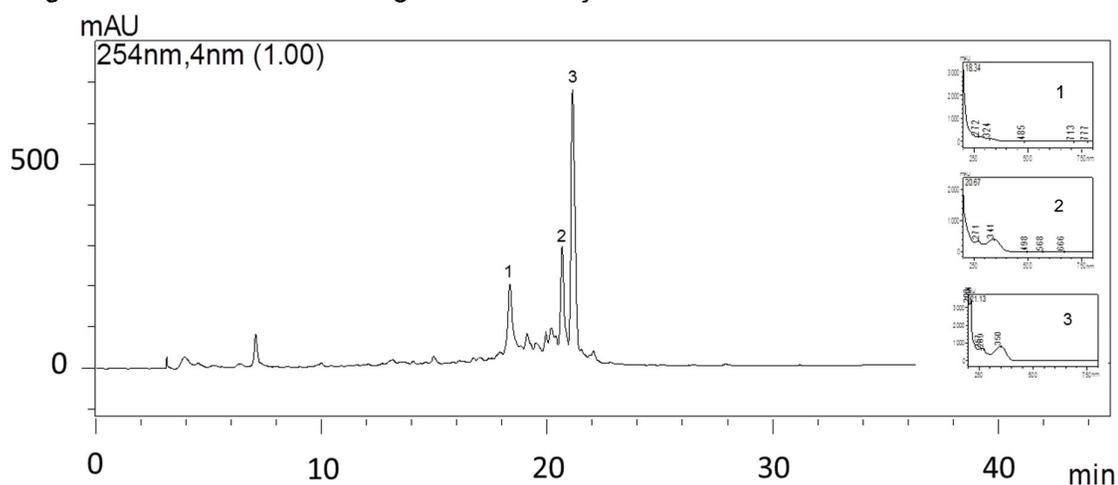


Fonte: Elaborada pela autora.

Os espectros de UV 3 e 4 apresentam bandas que sugerem possivelmente polifenóis pertencentes à classe de flavonóides (ANDERSEN, 2006).

A análise da fração SPE 20% a 254nm indicou a presença de três picos majoritários, indicados como sendo 1, 2 e 3. O espectro de UV do pico 1 não apresentou sinais expressivos, enquanto os picos 2 e 3 apresentam perfis nos espectros de UV semelhantes com máximos de absorvância em 271 e 341 nm, como mostra a Figura 14.

Figura 14 - Análise Cromatográfica da Fração SPE 20% em 254 nm

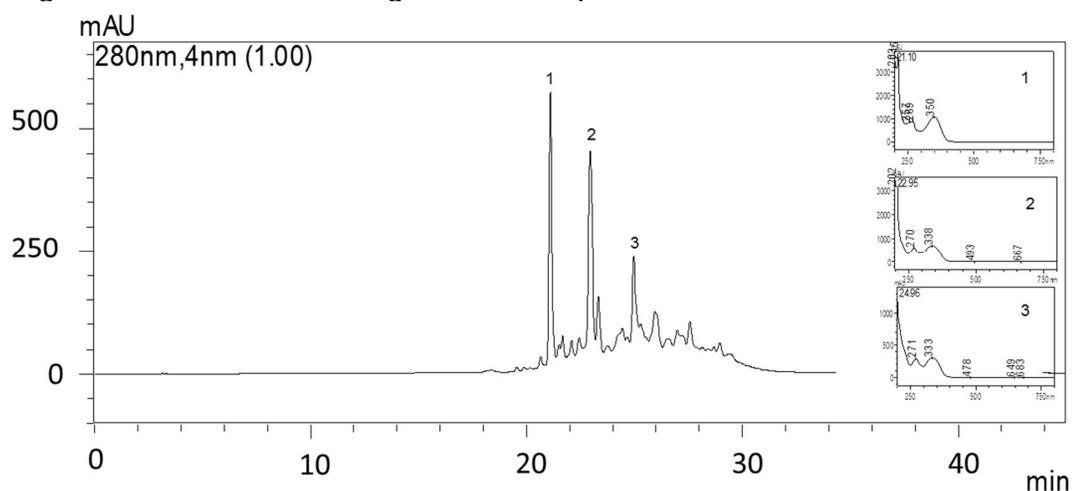


Fonte: Elaborada pela autora.

Os espectros de UV 2 e 3 sugerem que as bandas sejam de polifenóis, possivelmente do grupo dos flavonóides, sendo seus espectros semelhantes aos compostos encontrados por Wang et al. (2012b).

A análise da amostra SPE 40% por CLAE 280nm indicou a presença de três picos majoritários, indicados na Figura 15 como 1, 2 e 3. Ambos os picos apresentaram mesmos perfis no espectro de UV com bandas de absorção máxima em 270 e 340 nm.

Figura 15 - Análise Cromatográfica da Fração SPE 40% em 280 nm

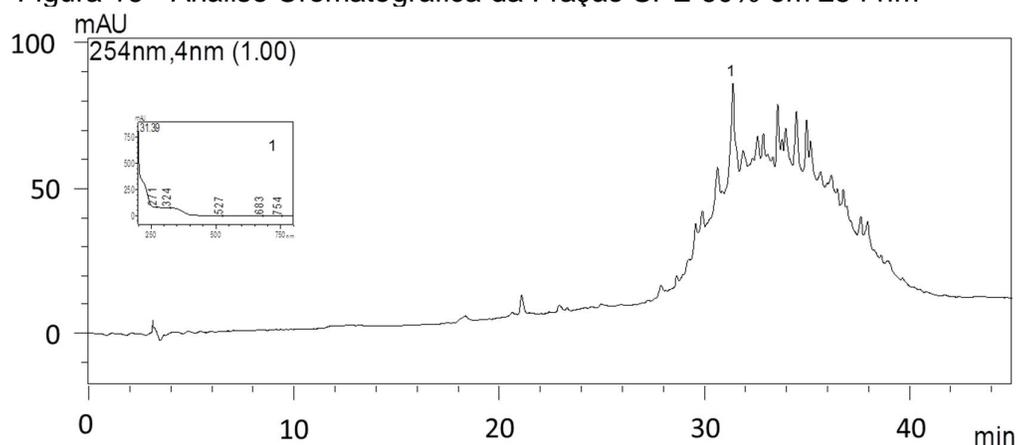


Fonte: Elaborada pela autora.

Os espectros de UV 1, 2 e 3 sugerem bandas semelhantes à de polifenóis, possivelmente do grupo dos flavonóides. O espectro 2 apresenta perfil semelhante no espectro de UV à substância isoorientina e suas derivadas isoorientina 4''-O- β -D-xylopyranoside e a isoorientina 2''-O- α -L-rhamnoside (WANG et al., 2012b).

A análise da fração SPE 60% por CLAE 254nm indicou a presença de substâncias menos polares em menores concentrações, como mostra a Figura 16. O espectro de UV obtido do pico identificado como 1 é inexpressivo e sem bandas que permitam uma análise mais profunda.

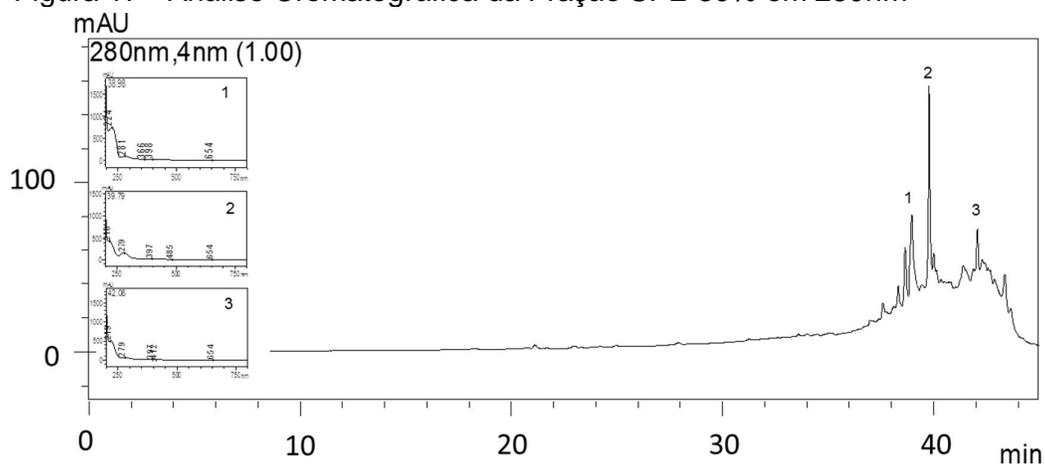
Figura 16 - Análise Cromatográfica da Fração SPE 60% em 254 nm



Fonte: Elaborada pela autora.

A análise da fração SPE80% por CLAE 280nm indicou a presença de pelo menos 3 picos cromatográficos expressivos, indicados na Figura 17. Os espectros de UV dos três picos são semelhantes e mostram bandas com máximos de absorção em 210 e 270 nm.

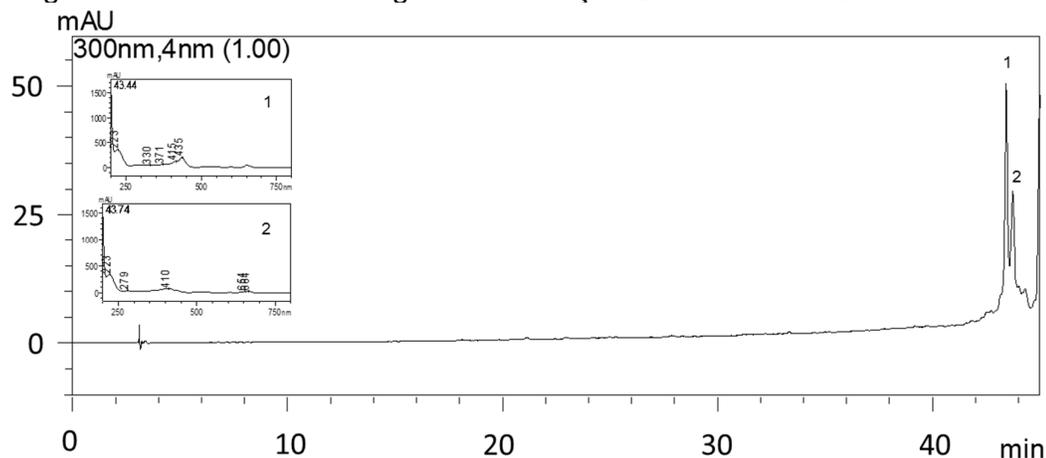
Figura 17 - Análise Cromatográfica da Fração SPE 80% em 280nm



Fonte: Elaborada pela autora.

A análise da fração SPE 100% por CLAE 300nm indicou que essa fração é a mais rica em substâncias menos polares, mostrando picos após 40 minutos de análise, Figura 18. A análise dos espectros de UV desses dois picos indicou a presença de bandas máximas de absorção em 220 e 420 nm.

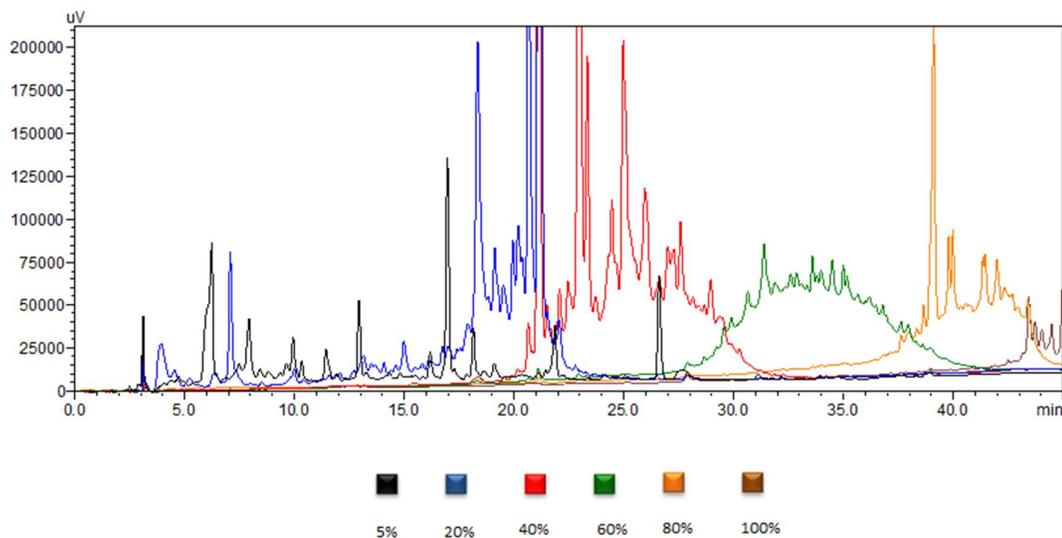
Figura 18 - Análise Cromatográfica da Fração SPE 100% em 300nm



Fonte: LCSolutions e adaptado pela autora

Na Figura 19, pode-se ver uma comparação entre os cromatogramas das frações do fracionamento da fração de AcEOt obtidos todos em 254nm. Pode-se observar que as substâncias ficaram bem distribuídas.

Figura 19 - Comparação entre cromatogramas das amostras fracionadas da amostra de AcEOt.



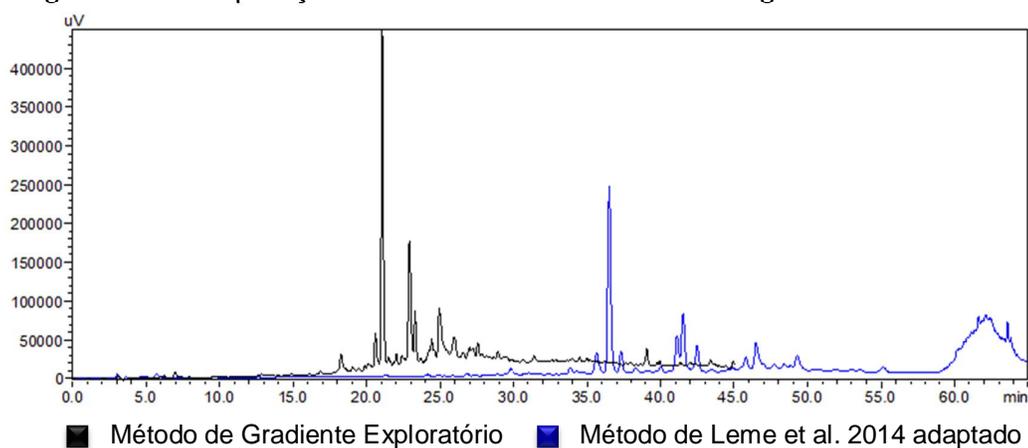
Fonte: Elaborada pela autora.

A partir da fração de AcEOt foram realizadas duas análises cromatográficas diferenciando no tempo das fases móveis e na presença ou não de ácido acético. O primeiro método empregado na análise cromatográfica da fração de AcEOt foi o método de gradiente de exploração, citado anteriormente detalhadamente. Este

método preliminar teve por finalidade analisar o tempo de corrida das substâncias afim de criar uma estimativa para futuros estudos.

Enquanto que o segundo método empregado foi uma adaptação do método de Leme et al. (2014). Leme et al. (2014) em seu trabalho desenvolveu um método de *fingerprinting* de cana-de-açúcar por HPLD-DAD, avaliando os constituintes químicos desta planta. A seguir na Figura 20 é possível observar a comparação dos métodos de análise empregados para a fração de acetato de etila, sendo possível observar que aparentemente ambos os métodos são válidos para esta planta.

Figura 20 - Comparação dos métodos de análise cromatográfico.



Fonte: Elaborada pela autora.

Assim como a cana-de-açúcar, o bambu pertence à família Poacea e devido a este fato, esperava-se que houvesse certas substâncias em comum. Por este motivo, foi realizado um método adaptado de Leme et al. (2014) para averiguar se a metodologia poderia interferir na identificação destas substâncias.

Os flavonóides têm atraído considerável interesse ao longo das últimas décadas em virtude de seus efeitos benéficos à saúde. Sua eficácia é atribuída a diferentes atividades biológicas (Kumar, PANDEY, 2013; NARAYANA et al., 2001; MIDDLETON, 1998) e sabendo-se que essas propriedades dependem do arranjo dos anéis aromático e heterocíclico que compõe seu esqueleto (GROTEROLD, 2006; RICE-EVANS, MILLER, PAGANGA 1996; BORS et al., 1990). Uma grande variedade de vegetais possuem flavonóides em sua composição fitoquímica, resultando em uma necessidade de análises mais específicas e que tragam à luz um

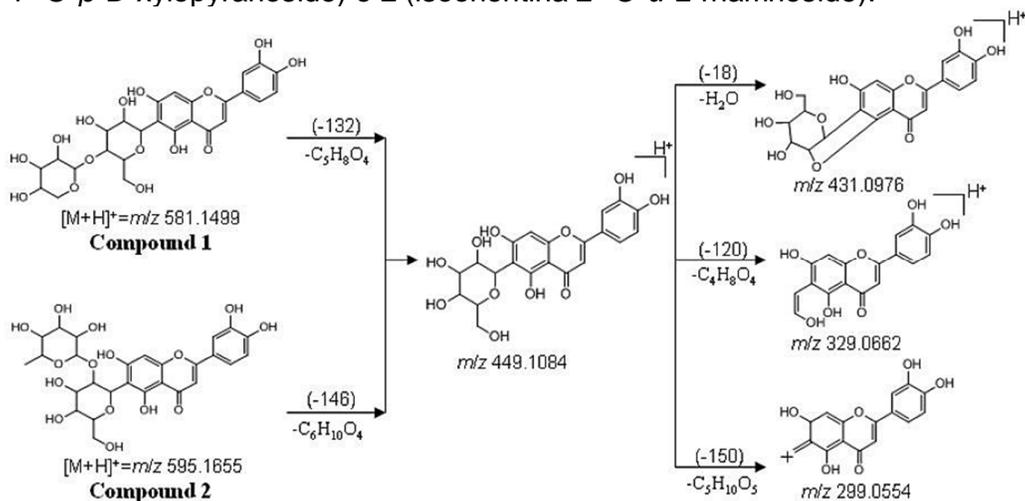
detalhamento sobre componentes químicos responsáveis por tais atividades biológicas, como a cromatografia.

Os flavonóides podem ser caracterizados por um espectro no UV contendo dois máximos de absorbância, sendo um em 330-370 nm (Banda I) e outro em 240-280 nm (Banda II). As diferenças entre as subclasses de flavonóides podem ser distinguidas através das razões entre as absorções máximas M1 (264 nm) e M2 (340 nm) que são típicas e diferentes para cada subclasse. A análise dos espectros no UV baseados na região de absorção de 300-400 nm (Banda I) permite identificar as insaturações entre os carbonos C2 e C3. Saturações entre esses (diidroflavonol) causam o desaparecimento da banda de absorção máxima em 350 nm. Por outro lado, a presença da dupla ligação causa um máximo de absorção nessa mesma banda (ANDERSEN; THOMAS, 2006)

Wang et al. (2012c) detectaram vinte compostos nas folhas e destes, três compostos potencialmente bioativos no plasma de coelhos, sendo estes: (*E*)- p-ácido cumárico, (*Z*)-p-ácido cumárico e apigenin-8-C- β -D-(2"-O- α -L-rhamnosyl)-glucopyranoside. Estes compostos absorvidos na corrente sanguínea têm grande probabilidade de serem constituintes eficazes e de interesse farmacológico.

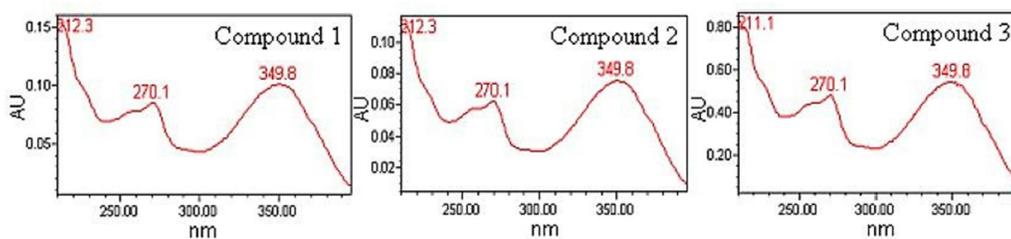
Através da triagem de CCD de isoorientina, isovitexina, orientina e vitexina, constatou se que nas folhas de *Bambusa textilis* há a presença de isoorientina e orientina, segundo Wang et al. (2012a). Em análise por CLAE-UV ($\lambda=330\text{nm}$) desta mesma espécie, os espectros de UV obtidos mostrou a presença de três compostos típicos caracterizados pela literatura como sendo a isoorientina 4"-O- β -D-xylopyranoside, isoorientina 2"-O- α -L-rhamnoside e isoorientina, pertencentes ao grupo de flavonóides de acordo com duas bandas principais de absorção a 250 e 360nm. A banda de absorção em 349,8nm sugere que esses flavonóides pertençam a família das flavonas (Wang et al., 2012b). Sendo estes compostos a isoorientina, isoorientina 4"-O- β -D-xylopyranoside e a isoorientina 2"-O- α -L-rhamnoside, representados a baixos pela Figura 21 e pela Figura 22.

Figura 21 - Principais vias de fragmentação dos compostos 1 (isorientina 4''-O- β -D-xylopyranoside) e 2 (isorientina 2''-O- α -L-rhamnoside).



Fonte: Wang et al. 2012b

Figura 22 - Espectros de UV dos 3 componentes encontrados por Wang et al. 2012b



Fonte: Wang et al. 2012b

6 CONCLUSÕES

A partir do estudo realizado podemos supor que as folhas de *Bambusa textilis* seja constituída principalmente de polifenóis do grupo dos flavonóides. Em comparação com os dados da literatura, também podemos sugerir que haja a presença dos mesmos componentes nesta planta.

Estudos complementares estão em andamento a fim de identificar estes compostos presentes nos picos cromatográficos encontrados no presente estudo. Além de ensaio biológico com os extratos obtidos a partir deste estudo.

REFERÊNCIAS

AHERNE, S. Aisling; O'BRIEN, Nora M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, United States, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0899900701006955/1-s2.0-S0899900701006955-main.pdf?_tid=504f664e-9d2c-11e5-b939-00000aab0f02&acdnat=1449525115_5af37ae072ccb1c0abf8a3845cec7da8>. Acesso em: 28 set. 2015.

ANDERSEN, Ø. M., FOSSEN, T., **Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications**. New York: Taylor & Francis Group, 2006.

BIRT, D. F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & therapeutics**, England, v. 90, n. 2, p. 157-177, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725801001371>> Acesso em: 28 set. 2015.

BORS, W.; et al. [36] Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. **Methods in enzymology**, United States, v.186, 1990, Pages 343–355, 1990. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/007668799086128I>> Acesso em: 28 set. 2015.

BROWN, J., et al. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. **Biochem. j**, v. 330, p. 1173-1178, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1219258/pdf/9494082.pdf>> Acesso em: 30 set 2015.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, United States, v. 22, n. 5, p. 749-760, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584996003516>> Acesso em: 28 set. 2015.

CAVALHEIRO, A. J.; YOSHIDA, M. 6-[ω-arylalkenyl]-5,6-dihydro-α-pyrone from *Cryptocarya moschata* (Lauraceae). **Phytochemistry**, England, v. 53 (7), 811, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942299005324>> Acesso em: 01 nov. 2015.

COOK, N. C.; SAMMAN, St. Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of nutritional biochemistry**, United States, v. 7, n. 2, p. 66-76, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286395001689>> Acesso em: 29 set. 2015.

FRANKE, A. et al. **Flavonoids in the living system**. Inhibition of neoplastic transformation and bioavailability of dietary flavonoid agents. New York: Springer US, p. 237-48, 1998. Disponível em: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-5335-9_17> Acesso em: 29 set. 2015.

FRIESENECKER, B. et al. Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg. **International Journal of Microcirculation**, Switzerland, v. 15, n. Suppl. 1, p. 17-21, 1995. Disponível em: <<http://www.karger.com/Article/Pdf/179090#>> Acesso em: 29 set. 2015.

GONG, Jinyan et al. Functional Components of Bamboo Shavings and Bamboo Leaf Extracts and Their Antioxidant Activities In Vitro. **Journal of medicinal food**, United States, v. 18, n. 4, p. 453-459, 2015. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/268229248_Functional_Components_of_Bamboo_Shavings_and_Bamboo_Leaf_Extracts_and_Their_Antioxidant_Activities_In_Vitro> Acesso em: 10 set. 2015.

GROTEWOLD, E. (Ed.). **The science of flavonoids**. New York: Springer, 2006.

HARBONE, J. B.; MABRY, T. J. **The flavonoids: advances in research**. New York: Chapman & Hall, 1982.

HERTOG, M. GL; HOLLMAN, P. CH; KATAN, M. B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 40, n. 12, p. 2379-2383, 1992. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/40131264_Hertog_MGL_Hollman_PCH_Katan_MB_Content_of_potentially_antitumorogenic_flavonoids_of_28_vegetables_and_9_fruits_commonly_consumed_in_The_Netherlands._J._Agric._Food_Chem._40_2379-2383> Acesso em: 29 set. 2015.

HODNICK, W. F., et al. Electrochemistry of flavonoids: Relationships between redox potentials, inhibition of mitochondrial respiration, and production of oxygen radicals by flavonoids. **Biochem. Pharmacol**, England, v. 37, p. 2607-2611, 1988. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006295288902535>> Acesso em: 29 set. 2015.

KUMAR, Shashank; PANDEY, Abhay K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, United States, v. 2013, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/tswj/2013/162750/>> Acesso em: 29 set. 2015.

LEE, H. E., et al. The flavonoid quercetin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. **Journal of pharmacy and pharmacology**, England, v. 55, n. 8, p. 1169-1174, 2003. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1211/0022357021396/pdf>> Acesso em: 25 set. 2015.

LEE, H. J., et al. The compound isolated from the leaves of *Phyllostachys nigra* protects oxidative stress-induced retinal ganglion cells death. **Food and Chemical Toxicology**, England, v. 48, n. 6, p. 1721-1727, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691510002127>> Acesso em: 29 set. 2015.

LEME, G. M., et al. HPLC-DAD method for metabolic fingerprinting of the phenotyping of sugarcane genotypes. **Analytical Methods**. Cambridge: Royal Soc Chemistry, v. 6, n. 19, p. 7781-7788, 2014. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/116857>> Acesso em: 29 set. 2015.

LEOPOLDINI, M., et al. Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. **Journal of agricultural and food chemistry**, United States, v. 54, n. 17, p. 6343-6351, 2006. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf060986h>> Acesso em: 29 set. 2015.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The ultraviolet spectra of flavones and flavonols**. United States: Springer Berlin Heidelberg, 1970. Disponível em: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-88458-0_5> Acesso em: 29 set. 2015.

MIDDLETON JR, E. **Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. In: Flavonoids in the Living System**. United States: Springer US, p. 175-182, 1998. Disponível em: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-5335-9_13> Acesso em: 29 set. 2015.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000. Disponível em: <<http://pharmrev.aspetjournals.org/content/52/4/673.long>> Acesso em: 29 set. 2015.

MU, J., UEHARA, T., LI, J., FURUNO, T. Identification and evaluation of antioxidant activities of bamboo extracts. **Forestry Studies in China**, China, v. 6, n. 2, p. 1-5, 2004. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11632-004-0011-7>> Acesso em: 29 set. 2015.

MUTOH, M., et al. Suppression by Flavonoids of Cyclooxygenase-2 Promoter-dependent Transcriptional Activity in Colon Cancer Cells: Structure-Activity Relationship. **Japanese journal of cancer research**, Japan, v. 91, n. 7, p. 686-691, 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1349-7006.2000.tb01000.x/pdf>> Acesso em: 29 set. 2015.

NARAYANA, K. R., et al. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. **Indian journal of pharmacology**, v. 33, n. 1, p. 2-16, 2001. Disponível em: <http://www.health-mall.in/files_hl/BIOFLAVONOIDS_THERAPEUTIC_POTENTIAL.pdf> Acesso em: 25 set. 2015.

NI, Q., et al. Seasonal variations of the antioxidant composition in ground bamboo *Sasa argenteostriatus* leaves. **International journal of molecular sciences**, Switzerland, v. 13, n. 2, p. 2249-2262, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3292020/pdf/ijms-13-02249.pdf>> Acesso em: 29 set. 2015.

PEREIRA, M. A. R.; BERALDO, A. L. **Bambu de corpo e alma**. Bauru: Canal, v. 6, p. 235, 2007.

RANKIN, Sara M. et al. The modification of low density lipoprotein by the flavonoids myricetin and gossypetin. **Biochemical pharmacology**, England, v. 45, n. 1, p. 67-75, 1993. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000629529390378A>> Acesso em: 29 set. 2015.

RASO, G. M., et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A. 1. **Life sciences**, Netherlands, v. 68, n. 8, p. 921-931, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320500009991>> Acesso em: 29 set. 2015.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Review article - Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, United States, v. 20, Issue 7, Pages 933–956, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0891584995022279>> Acesso em: 29 set. 2015.

SEKI, T.; KIDA, K.; MAEDA, H. Immunostimulation-mediated anti-tumor activity of bamboo (*Sasa senanensis*) leaf extracts obtained under 'vigorous' condition. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, United States, v. 7, n. 4, p. 447-457, 2008. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ecam/2010/514364/abs/>> Acesso em: 29 set. 2015.

TELASCRA, M. **Busca de substâncias antitumorais e antifúngicas através do estudo fitoquímico biomonitorado em *Cryptocarya mandioccana* e *Cryptocarya moschata* (Lauraceae)** 2006. Tese (Doutorado em Química). Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2006.

TUNON, M. J., et al. Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. **Current drug metabolism**, Netherlands, v. 10, n. 3, p. 256-271, 2009. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/68936/article>> Acesso em: 29 set. 2015.

VAN HOYWEGHEN, L., et al. In Vitro Inhibition of the Transcription Factor NF- κ B and Cyclooxygenase by Bamboo Extracts. **Phytotherapy Research**, England, v. 28, n. 2, p. 224-230, 2014. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.4978/abstract?userIsAuthenticated=false&deniedAccessCustomisedMessage=>>> Acesso em: 29 set. 2015.

WANG, J., et al. Rapid screening for flavone C-glycosides in the leaves of different species of bamboo and simultaneous quantitation of four marker compounds by HPLC-UV/DAD. **International journal of analytical chemistry**, Egypt, v. 2012a. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijac/2012/205101/>> Acesso em: 28 set. 2015.

WANG, J. et al. TLC Screening for antioxidant activity of extracts from fifteen bamboo species and identification of antioxidant flavone glycosides from leaves of *Bambusa textilis* McClure. **Molecules**, Switzerland, v. 17, n. 10, p. 12297-12311, 2012b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23085665>> Acesso em: 28 set. 2015.

WANG, J. et al. Screening and analysis of the potential bioactive components in rabbit plasma after oral administration of hot-water extracts from leaves of *Bambusa textilis* McClure. **Molecules**, Switzerland, v. 17, n. 8, p. 8872-8885, 2012c. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/17/8/8872>> Acesso em: 28 set. 2015.

ZHANG, Y., et al. Determination of flavone C-glucosides in antioxidant of bamboo leaves (AOB) fortified foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet diode array detection. **Journal of Chromatography A**, Netherlands, v. 1065, n. 2, p. 177-185, 2005. Disponível em: <<http://www.pubfacts.com/detail/15782963/Determination-of-flavone-C-glucosides-in-antioxidant-of-bamboo-leaves-AOB-fortified-foods-by-reverse>> Acesso em: 29 set. 2015.