

Celso Markowitsch Jose

Estudo das atividades biológicas e caracterização química de dois bambus nativos: *Apoclada simplex* McClure & Smith e *Merostachys riedeliana* Rupr.

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais

São Paulo 2016

Celso Markowitsch Jose

**Estudo das atividades biológicas e caracterização química de
dois bambus nativos: *Apoclada simplex* McClure & Smith e
Merostachys riedeliana Rupr.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais

ORIENTADORA: MARIA TEREZA GROMBONE GUARATINI

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Jose, Celso Markowitsch

J83e Estudo das atividades biológicas e caracterização química de dois bambus nativos: *Apoclada simplex* McClure & Smith e *Merostachys riedeliana* Rupr. / Celso Markowitsch Jose -- São Paulo, 2016.
84p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2016.

Bibliografia.

1. Poaceae. 2. Compostos fenólicos. 3. Fotoproteção. I. Título.

CDU: 582.542.1

Epígrafe

“Se A é o sucesso, então A é igual a X mais Y mais Z.
O trabalho é X; Y é o lazer; e Z é manter a boca fechada.”

(Albert Einstein)

Agradecimentos

Este trabalho é o resultado da dedicação e empenho de muitas pessoas, gostaria de agradecer pelos meses de compreensão e apoio da minha família, incluindo os membros de quatro patas, pelo amor, união e muitas alegrias e incentivos! Especialmente dos meus pais e minha irmã, Elias, Doris e Yeda.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, principalmente ao Nucleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, e ao Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente pela oportunidade de realizar esse trabalho.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior pela bolsa concedida.

Aos envolvidos no projeto, Dra. Luce Maria Brandão Torres pela atenção e dedicação a pesquisa. Amarílis, pela amizade e horas de coleta. Dr. André Rolim Baby por todo apoio, ensinamentos e atenção. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno pela amizade, imensa dedicação e apoio.

A minha orientadora, educadora, Dra. Maria Tereza Grombone Guaratini pelos ensinamentos, crescimento e valores compartilhados. Não apenas uma orientadora, mas uma professora exemplar! Serei eternamente grato!

Aos amigos do Instituto de botânica e da USP, Pedro, Marco, Marcelo, Janaina, Fabio, Fernanda, Francine, Beatriz, Vitor, Pedro (Pepi), Heloisa, Mauro, Cynthia, Rodrigo Cabral, Simone, Thalita e Daniela. Obrigado por cada dia, por cada palavra de apoio, pelos conselhos, alegrias, experiências, carinho e amizade.

Aos meus amigos, Leandro, Flávia, Ricardo, Felipe (Coxa), Will, Herinque (Kiko), Leandro (Bomba), Daniel, Thiago, Rodrigo, Giovanna, Lucas, Mirela, Adalberto, Rodrigo, Vanessa por todo apoio ao longo destes anos, bagunças e risadas.

A todos o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| Lista de tabelas | I |
| Lista de figuras | II |
| Lista de abreviações | V |
| Resumo. | VII |
| Abstract. | VIII |
| 1. Introdução | 1 |
| 1.1 Bambus: taxonomia e distribuição | 1 |
| 1.2 Importância ecológica e econômica dos bambus "lenhosos" (lignificados)..... | 3 |
| 1.3 <i>Apoclada simplex</i> e <i>Merostachys riedeliana</i> | 6 |
| 1.4 Atividade Antioxidante/FPS..... | 8 |
| Estresse Oxidativo | 8 |
| Antioxidantes naturais e sintéticos | 9 |
| Métodos de avaliação da capacidade antioxidante | 11 |
| Ação da radiação ultravioleta e fotoproteção | 13 |
| 2. Objetivo | 16 |
| 2.1 Objetivos específicos | 16 |
| 3. Materiais e Métodos | 16 |
| 3.1. Material vegetal | 16 |
| 3.2. Extração e fracionamento | 17 |
| Extrato etanólico..... | 17 |
| Extrato aquoso | 17 |
| Fracionamento dos extratos | 18 |
| Obtenção dos óleos voláteis de folhas de <i>A. simplex</i> e <i>M. riedeliana</i> | 18 |
| 3.3. Atividade Antioxidante (anti-radicalar)..... | 19 |
| Ensaio qualitativo por autografia em cromatografia de camada delgada..... | 19 |

| | |
|--|----|
| Ensaio quantitativo em microplaca..... | 19 |
| 3.4 Determinação de compostos fenólicos totais | 20 |
| Ensaio qualitativo por autografia em cromatografia de camada delgada..... | 20 |
| Ensaio quantitativo em microplaca..... | 21 |
| 3.5 Determinação de flavonóides totais..... | 21 |
| Ensaio quantitativo em microplaca..... | 21 |
| 3.6 Eficácia fotoprotetora <i>in vitro</i> : determinação do valor de proteção solar estimado (FPS) e proteção frente à radiação UV de extratos e frações de <i>M. riedeliana</i> e <i>A.simplex</i> | 22 |
| 3.7 Análises | 24 |
| Análise Cromatográfica UHPLC – DAD - <i>Apoclada simplex</i> | 24 |
| Análise LC-DAD / ESI / MS / MS de <i>M. riedeliana</i> | 25 |
| Análise GC-MS de <i>A. simplex</i> e <i>M. riedeliana</i> | 25 |
| Extrato e frações de <i>A.simplex</i> e <i>M.riedeliana</i> | 25 |
| Óleos voláteis de folha de <i>A.simplex</i> e <i>M.riedeliana</i> | 26 |
| 4. Resultados e Discussão | 27 |
| 4.1 Obtenção e rendimento dos extratos brutos e frações de <i>A. simplex</i> e <i>M. riedliana</i> | 27 |
| 4.2 Determinação da capacidade antioxidante | 28 |
| Método Qualitativo - CCD - DPPH..... | 28 |
| Quantificação DPPH | 31 |
| 4.3 Quantificação de Fenólicos Totais | 33 |
| Método Qualitativo - CCD - NP-PEG..... | 33 |
| Quantificação dos compostos fenólicos totais..... | 35 |
| 4.4 Quantificação dos flavonóides totais..... | 36 |
| 4.5 Eficácia fotoprotetora <i>in vitro</i> : determinação do valor de proteção solar estimado (FPS) e proteção frente à radiação UV de extratos e frações de <i>M. riedeliana</i> | 39 |
| 4.6 Análises | 41 |
| Análise Cromatográfica UHPLC – DAD | 42 |

| | |
|--|-----------|
| Análise LC-DAD / ESI / MS / MS de <i>M. riedeliana</i> | 44 |
| Análise do extrato bruto e frações de <i>A.simplex</i> e <i>M.riedeliana</i> em GC-MS..... | 45 |
| Análise dos óleos voláteis | 49 |
| 5. Conclusões | 51 |
| 6. Referencias bibliográficas | 52 |

Lista de tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Dados dos rendimentos dos extratos (%) obtidos por partição líquido-líquido dos extratos aquosos e etanólicos de <i>A. simplex</i> | 27 |
| Tabela 2. Dados dos rendimentos das frações (%) obtidos por partição líquido-líquido dos extratos aquosos e etanólicos de <i>M. riedeliana</i> | 28 |
| Tabela 3. Concentração efetiva (IC ₅₀) dos extratos brutos e frações diclorometano, acetato de etila e <i>n</i> -butanólica de <i>M. riedeliana</i> obtida no ensaio de determinação de atividade antioxidante..... | 31 |
| Tabela 4. Quantificação de substâncias fenólicas de <i>M. riedeliana</i> utilizando a metodologia de Folin-Ciocalteu. Os resultados estão expressos como média seguida do erro padrão..... | 36 |
| Tabela 5. Quantificação de flavonóides totais de <i>M. riedeliana</i> foi realizada utilizando cloreto de alumínio como agente complexante. Os resultados de flavonóides totais e porcentagem estão expressos como média seguida do seu erro padrão. | 37 |
| Tabela 6. Caracterização fotoprotetora <i>in vitro</i> das frações de <i>M. riedeliana</i> antes e após irradiação UV artificial..... | 39 |
| Tabela 7. Caracterização fotoprotetora <i>in vitro</i> das frações de <i>A. simplex</i> antes e após irradiação UV artificial..... | 40 |
| Tabela 8. Compostos identificados do extrato aquoso de folha e da fração acetato de etila de folha de <i>M. riedeliana</i> analisadas em LC-DAD / ESI / MS / MS. | 44 |
| Tabela 9. Indetificação dos compostos no extrato aquoso (EA), fração acetato de etila (Ac Et) e fração <i>n</i> -butanol (<i>n</i> -But) de folhas de <i>A. simplex</i> em GC-MS..... | 45 |
| Tabela 10. Indetificação dos compostos na fração acetato de etila do extrato de folha de <i>M. riedeliana</i> analisadas em GC-MS..... | 47 |
| Tabela 11. Compostos voláteis encontrados na folha de <i>A. simplex</i> e identificados por GC-MS. | 49 |
| Tabela 12. Compostos voláteis encontrados na folha de <i>M. riedeliana</i> identificados por GC-MS. | 49 |

Lista de figuras

- Figura 1.** Distribuição dos bambus lenhosos (Bambuseae)..... 1
- Figura 2.** Distribuição de bambus lenhosos paleotropicais. 2
- Figura 3.** Distribuição de bambus lenhosos neotropicais. 3
- Figura 4.** *Apoclada simplex* vista geral, colmos e folhas. 7
- Figura 5.** *Merostachys riedeliana* detalhes do colmo e das ramificações e vista geral da planta. 7
- Figura 6.** Fluxograma do fracionamento dos extratos brutos de folhas e colmos de *A. simplex* e *M. riedeliana* 18
- Figura 7.** Perfil cromatográfico de extratos brutos de *A. simplex* (CCDC, em sílica gel F254, clorofórmio: metanol: água (60:35:5). 1- Extrato Aquoso de folha, 2 - Extrato aquoso de colmo jovem, 3 - Extrato aquoso de colmo adulto 4 - Extrato etanólico de folha, 5 - Extrato etanólico de colmo jovem, 6 - Extrato etanólico de colmo adulto, 7 - quercetina, 8 - rutina, 9 - ácido clorogênico, 10 - ácido cafeico, 11 - ácido vanílico, 12 - ácido ferúlico, 13 - ácido siríngico, 14 - Ácido sináptico. Revelador solução metanólica do radical livre DPPH e visualizado sob luz branca..... 29
- Figura 8A.** Perfil cromatográfico (CCDC, em sílica gel F254, clorofórmio: metanol: água (60:35:5) 1 - Extrato Aquoso de folha, 2 - Fração hexânica; 3 - Fração diclorometano; 4 - Fração acetato de etila; 5 - Fração n-butanol; 6- Fração Aquosa; 7- Extrato etanólico de folha, 8 - Fração hexânica; 9- Fração diclorometano; 10 - Fração acetato de etila; 11 - Fração n-butanol; 12 - Fração Aquosa; 13-Quercetina, 14-Rutina, 15-Ácido cafeico, 16-Ácido clorogênico, 17-Ácido ferúlico, 18-Ácido vanílico, 19- Vitexina. Revelado com solução metanólica de DPPH e visualizados sob luz branca. 29
- Figura 8B.** Perfil cromatográfico (CCDC, em sílica gel F254, clorofórmio: metanol: água (60:35:5) 1 - Extrato Aquoso de Colmo, 2 - Fração hexânica, 3 - Fração diclorometano, 4 - Fração acetato de etila, 5 - Fração n-butanólica, 6- Fração Aquosa, 7- Extrato etanólico de Colmo, 8 - Fração hexânica, 9- Fração diclorometano 10 - Fração acetato de etila, 11 - Fração n-butanólica 12 - Fração Aquosa, 13-Quercetina, 14-Rutina, 15-Ácido cafeico, 16-Ácido clorogênico, 17-Ácido ferúlico, 18-Ácido vanílico, 19- Vitexina. Revelado com solução metanólica de DPPH e visualizados sob luz branca. 30
- Figura 9A.** Perfil cromatográfico (CCDC, em sílica gel F254, clorofórmio: metanol: água (60:35:5) 1- Extrato Aquoso de folha, 2-Fração hexânica, 3-Fração diclorometano, 4-Fração acetato de etila, 5-Fração n-butanólica, 6-Fração Aquosa, 7-Extrato etanólico de folha, 8-Fração hexânica, 9-Fração diclorometano, 10-Fração acetato de etila, 11-

Fração n-butanólica, 12-Fração Aquosa, 13-Quercetina, 14- Rutina, 15-Ácido cafeico, 16-Ácido clorogênico, 17-Ácido ferúlico, 18-Ácido vanílico; 19-Vitexina. Revelado com solução metanólica de DPPH e visualizados sob luz branca..... 30

Figura 9B. Perfil cromatográfico (CCDC, em sílica gel F254, clorofórmio: metanol: água (60:35:5) 1- Extrato Aquoso de Colmo, 2-Fração hexânica, 3-Fração diclorometano, 4-Fração acetato de etila, 5-Fração n-butanólica, 6-Fração Aquosa, 7- Extrato etanólico de Colmo, 8-Fração hexânica, 9-Fração diclorometano, 10-Fração acetato de etila, 11- Fração n-butanólica, 12-Fração Aquosa, 13-Quercetina, 14- Rutina, 15-Ácido cafeico, 16-Ácido clorogênico, 17-Ácido ferúlico, 18-Ácido vanílico; 19- Vitexina. Revelado com solução metanólica de DPPH e visualizados sob luz branca..... 31

Figura 10. perfil cromatográfico dos extratos brutos de *A. simplex* (CCDC, em sílica gel F254, clorofórmio: metanol: água (60:35:5). 1- Extrato Aquoso de folha, 2 - Extrato aquoso de colmo jovem, 3 - Extrato aquoso de colmo adulto 4 -Extrato etanólico de folha, 5 -Extrato etanólico de colmo jovem, 6 - Extrato etanólico de colmo adulto, 7 - Quercetina, 8 - Rutina, 9 -Ácido clorogênico, 10 - Ácido cafeico, 11-Ácido vanílico, 12- Ácido ferúlico, 13-Ácido siríngico, 14 - Ácido sináptico. Revelador NP-PEG e visualizado 366nm..... 33

Figura 11A. Perfil cromatográfico (CCDC, em sílica gel F254, clorofórmio: metanol: água (60:35:5) 1 - Extrato Aquoso de folha, 2 - Fração hexânica; 3 - Fração diclorometano; 4 - Fração acetato de etila; 5 - Fração n-butanol; 6- Fração Aquosa; 7- Extrato etanólico de folha, 8 - Fração hexânica; 9- Fração diclorometano; 10 - Fração acetato de etila; 11 - Fração n-butanol; 12 - Fração Aquosa; 13-Quercetina, 14-Rutina, 15-Ácido cafeico, 16-Ácido clorogênico, 17-Ácido ferúlico, 18-Ácido vanílico, 19- Vitexina. Revelado com solução NP-PEG e visualizado 366nm.. 33

Figura 11B. Perfil cromatográfico (CCDC, em sílica gel F254, clorofórmio: metanol: água (60:35:5) 1 - Extrato Aquoso de Colmo, 2 - Fração hexânica, 3 - Fração diclorometano, 4 - Fração acetato de etila, 5 - Fração n-butanólica, 6- Fração Aquosa, 7- Extrato etanólico de Colmo, 8 - Fração hexânica, 9- Fração diclorometano 10 - Fração acetato de etila, 11 - Fração n-butanólica 12 - Fração Aquosa, 13-Quercetina, 14-Rutina, 15-Ácido cafeico, 16-Ácido clorogênico, 17-Ácido ferúlico, 18-Ácido vanílico, 19- Vitexina. Revelado com solução NP-PEG e visualizado 366nm. 34

Figura 12A. Perfil cromatográfico de extratos e frações de folhas de *M. riedeliana* (CCDC, em sílica gel F254, clorofórmio: metanol: água (60:35:5) 1- Extrato Aquoso de folha, 2-Fração hexânica, 3-Fração diclorometano, 4-Fração acetato de etila extrato, 5- Fração n-butanólica, 6-Fração Aquosa extrato, 7-Extrato etanólico de folha, 8-Fração hexânica, 9-Fração diclorometano, 10-Fração acetato de etila, 11- Fração n-butanólica, 12-Fração Aquosa, 13-Quercetina, 14- Rutina, 15-Ácido cafeico, 16-Ácido clorogênico, 17-Ácido ferúlico, 18-Ácido vanílico; 19-Vitexina. Revelado com solução NP-PEG e visualizados sob 366nm..... 34

Figura 12B. Perfil cromatográfico de colmos de *M. riedeliana* (CCDC, em sílica gel F254, clorofórmio: metanol: água (60:35:5) 1- Extrato Aquoso de Colmo, 2-Fração hexânica, 3-Fração diclorometano, 4-Fração acetato de etila, 5-Fração *n*-butanólica, 6-Fração Aquosa extrato, 7-Extrato etanólico de Colmo, 8-Fração hexânica, 9-Fração diclorometano, 10-Fração acetato de etila, 11- Fração *n*-butanólica, 12-Fração Aquosa extrato, 13-Quercetina, 14- Rutina, 15-Ácido cafeico, 16-Ácido clorogênico, 17-Ácido ferúlico, 18-Ácido vanílico; 19-Vitexina. Revelado com solução NP-PEG e visualizados sob 366nm..... 34

Figura 13. Curva de calibração do ácido gálico utilizado para a determinação da concentração de substâncias fenólicas nos extratos brutos das folhas e colmos e as frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanólica de *M. riedeliana*. 35

Figura 14. Curva de calibração do padrão externo quercetina, utilizada para a quantificação de flavonóides totais contidos nos extratos brutos das folhas e colmos e as frações clorofórmica, acetato de etila e *n*-butanólica de *M.riedeliana*..... 37

Figura 15. Perfis cromatográficos das diferentes frações de folhas de *A. simplex* em 280 nm. (1) mistura dos padrões: ácido *trans*-3-cafeoilquínico (9 minutos); ácido cafeico (9,8 minutos); ácido *p*-cumárico (13,2 minutos); luteolina 8-*C*-glicosídeo (18,8 minutos); luteolina 6-*C*-glicosídeo (20,6 minutos); apigenina 8-*C*-glicosídeo (21 minutos); (2) fração diclorometano, (3) fração acetato de etila, (4) fração *n*- butanol e (5) fração aquosa. 43

Lista de abreviações

Ac Et- Acetato de etila
Al Cl₃- Cloreto de alumínio
ASE- Sistema de aceleração de extração com solvente
BSTFA- Trifluoroacetamida
CCD- Cromatografia de camada delgada
CHCl₃- Cloroformio
C₂H₆O- Etanol
CH₃OH- Metanol
DAD- Detector de díodos da matriz
DCM- Diclorometano
DPPH- 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EA- Extrato aquoso
EAG- Equivalentes de ácido gálico
EHA- Extrato Hidroalcoólico
EIC- Íon extraído do cromatograma
EROs - Espécies reativas de oxigênio
ESI- Íonização por eletrospray
FPS- Fator de Proteção Solar
GC- Cromatografia Gasosa
Hex- Hexano
IC₅₀- Concentração efetiva de 50%
IK- Índice de retenção de Kováts
IR- Índice de retenção
LC- Cromatografia líquida.
MS- Massa
[M-H]⁺-Massa (+) hidrogênio
n-But- *n*- butanólica
NP- Difenilboriloxietilamina
PABA- Ácido p-amino benzoico
PMMA- Polimetilmetacrilato
PEFI- Parque Estadual das Fontes do Ipiranga
PEG- Polietilenoglicol

R²- r-quadrado

R_f- Fator de retenção

R_t - Tempo de retenção

TIC- Total de íons do cromatograma

TMS- Trimetilclorossilano

UHPLC- Cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência

UV- Ultravioleta

UV-Vis- Ultravioleta-visível

Resumo: Embora o Brasil apresente a maior diversidade de bambu do Novo Mundo suas propriedades químicas e bioquímicas de bambus brasileiros ainda são poucas exploradas. Este estudo foi realizado para avaliar a atividade antioxidante e fotoprotetora, *in vitro*, dos extratos aquosos e etanólicos de folhas e colmos de *Apoclada simplex* e *Merostachys riedeliana*. Por conseguinte, os fenólicos e flavonóides totais, bem como o perfil químico dos extratos e frações são analisados. As propriedades antioxidantes foram examinadas usando método estavel sequestrador de radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). As atividades fotoprotetoras foram descritas utilizando a técnica de transmissão difusa para determinar o fator de fotoproteção solar e o nível de proteção contra a radiação UV. Os fenólicos e flavonóides totais foram analisados utilizando métodos de Folin-Ciocalteu e cloreto de alumínio (AlCl₃). As análises em CCD, UHPLC e CG-MS foram utilizadas para caracterizar os fitoconstituintes. A fração acetato de etila e diclorometano de folhas de *M. Riedeliana* apresentaram um sequestro de radicais livres mais elevados em comparação a concentração IC₅₀, com valores de 33,96 ± 0,16µg / mL e 36,07 ± 0,18µg / mL, respectivamente. A fração acetato de etila mostrou altos valores de flavonóides totais. A análise das frações de acetato de etila mostrou a presença de ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido siringico e quercetina na em *A. simplex* e ácido 4-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido trans-ferúlico, ácido siringico, isovitexina, orientina e isoorientina em *M. riedeliana*. As frações diclorometano e acetato de etila de *M. riedeliana* e *A. simplex* apresentaram uma eficácia anti-UVB superior quando comparadas aos com os filtros. A atividade antioxidante pode estar relacionada com os flavonóides glicosíladados encontrados em folhas de bambu. Estes resultados demonstram que folhas de bambu apresentam propriedades antioxidantes e fotoprotetoras, podendo considerar *A. simplex* e *M. riedeliana* candidatas úteis para promover o uso de antioxidantes naturais e fotoprotetores na indústria de cosméticos.

Palavras chave: potencial antioxidante, folhas de bambu, compostos fenólicos, fotoproteção

Abstract: Although Brazil has the largest bamboo diversity of the New World the chemical and biochemical properties of Brazilian bamboos are still underexploited. This study was undertaken to evaluate the antioxidant and photoprotective properties, *in vitro*, of the aqueous and ethanolic extracts of *Apoclada simplex* and *Merostachys riedeliana* leaves and culms. Therefore the total phenolic and flavonoid contents as well as the chemical profile of the extracts and fractions are described. The antioxidant properties were examined using stable 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging. The photoprotective activities were described using the diffuse transmittance technique to determine the solar photoprotection factor and the level of protection against UV radiation. Total phenolics and flavonoids were examined using Folin-Ciocalteu and aluminum chloride (AlCl₃) methods. CCD, UHPLC and CG-MS analysis were used to characterize the phytoconstituents. The ethyl acetate and dichloromethane fractions of *M. riedeliana* leaves had a higher free radical scavenging with an IC₅₀ concentration with values of 33,96±0,16 µg/mL and 36,07±0,18µg/mL respectively. The ethyl acetate showed high levels of total flavonoid in the content. Analysis of the ethyl acetate fractions showed the presence of *p*-hydroxibenzoic acid, vanilic acid, caffeic acid, siringic acid and quercetin in both *A. simplex* and 4-hydroxibenzoic acid, vanilic acid, trans-ferulic acid, siringic acid and isovitexin, orientin and isoorientin in *M. riedeliana*. Dichloromethane and ethyl acetate fractions of *M. riedeliana* and *A. simplex* showed superior anti-UVB efficacy when compared to filters. Antioxidant activity may be related to the flavonoid glycosides found in bamboo leaves. These results showed that bamboo leaves have photoprotective and antioxidant properties, *A. simplex* and *M. riedeliana* may be useful candidates for furthering the use of natural antioxidants and photoprotectors in the cosmetic industry.

Keywords: antioxidant potential, bamboo leaves, phenolic compounds, photoprotection

1. Introdução

1.1 Bambus: taxonomia e distribuição

Bambus são gramíneas perenes e robustas encontradas nas florestas tropicais e temperadas (Kelchner et al. 2013). A família Poaceae, dentro da qual estão inseridos os bambus (subfamília Bambusoideae), é uma das mais importantes entre as angiospermas que compõe a flora nacional, sendo composta de cerca de 700 gêneros e aproximadamente 10 mil espécies (Judziewicz et al. 1999). As espécies de Bambusoideae apresentam distribuição que vai do nível do mar a altitudes de 4300 m, sendo encontrados principalmente em habitats florestais e campos de altitude ao redor do mundo, exceto na Europa e Antártica (Judziewicz et al. 1999; Kelchner et al. 2013) (Fig. 1).

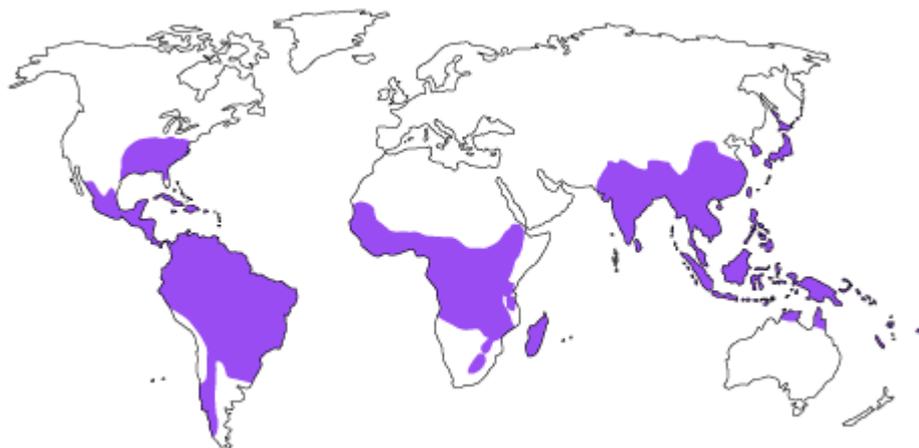


Figura 1- Distribuição dos bambus lenhosos (Bambuseae). Fonte: <http://www.eeob.iastate.edu/research/bamboo/maps/world-total-woody.gif>

A diversidade estimada de bambus no mundo, segundo o (Bamboo Phylogeny Group (BPG) 2012, é de 1439 espécies e 116 gêneros; entretanto, estes dados podem variar em função da descoberta de novos gêneros e espécies. A subfamília Bambusoideae por sua vez é dividida três tribos em função de suas três principais linhagens (Sungkaew et al. 2009): tribos Arundinarieae (bambus lenhosos temperados com 533 espécies) e Bambuseae (bambus lenhosos tropicais com 784 espécies) e Olyreae (bambus herbáceos com 122 espécies) (BPG 2012). Bambus lenhosos apresentam como características: folhas do colmo modificadas para proteger os brotos, complexo e massivo sistema de rizomas, colmos lignificados, lígula externa (contralígula) e espiguetas bissexuais. Bambus lignificados são plantas peculiares, tanto

no aspecto morfológico como em relação ao seu ciclo de vida; em geral, apresentam longos períodos de crescimento vegetativo que antecedem a floração, seguidos da morte dos indivíduos da população após o florescimento (Janzen 1976; Stern et al. 1999, Griscom & Ashton 2003). Certas espécies exibem florescimento sincronizado, ou seja, todos os colmos, independentemente da idade florescem simultaneamente no mesmo ano e morrem (Franklin 2004). Bambus herbáceos usualmente não apresentam folha do colmo diferenciada e língulas externas, apresentam propagação restrita, florescimento contínuo ou sazonal e espiguetas unissexuais restrito alastramento (Judziewicz et al. 1999; McClure 1993).

Os membros da tribo Arundinarieae ocorrem principalmente em regiões montanhosas da Ásia e na América do Norte, sem espécies nativas no Brasil; Olyreae é uma tribo quase exclusivamente Neotropical e inclui várias espécies que são nativas ou endêmicas do Brasil (Longhi-Wagner 2012). O centro de diversidade de Olyreae está localizado na Mata Atlântica do sul da Bahia e norte do Espírito Santo (Soderstrom et al. 1988). A tribo Bambuseae exibe dois centros de diversidade, um na Ásia e um na região neotropical, com vários membros da Mata Atlântica, muitas das quais são endêmicas (Longhi-Wagnee 2012) (Figuras 2 e 3).



Figura 2 - Distribuição de bambus lenhosos paleotropicals Fonte: <http://www.eob.iastate.edu/research/bamboo/maps/paleotropical.gif>



Figura 3 - Distribuição de bambus lenhosos neotropicais. Fonte: <http://www.eeob.iastate.edu/research/bamboo/maps/neotropical.gif>

O Brasil é o país com maior diversidade de espécies de bambu do Novo Mundo (Judziwicz et al. 1999), o que significa 89% dos gêneros e 65% das espécies de bambu conhecidas (36 gêneros e 254 espécies) distribuídas entre a Mata Atlântica, o Cerrado e a Amazônia (Filgueiras et al. 2016). Os gêneros com maior número de espécies incluem *Merostachys* (53 espécies) e *Chusquea* (40 espécies) (Filgueiras & Santos-Gonçalves 2004). No estado de São Paulo, boa parte das espécies de bambus se concentra em áreas de Mata Atlântica, onde a riqueza biológica é grande.

1.2 Importância ecológica e econômica dos bambus "lenhosos" (lignificados)

Bambus são descritos como "uma das plantas mais valiosas do mundo" (Lv et al. 2014) que ocorrem naturalmente nas florestas por apresentam nutrientes em todas os seus órgãos. Bambus lenhosos são uma parte importante da diversidade florestal na América do Sul (Filgueiras & Pereira 1988).

Bambus geralmente têm populações de densidade descontínuas e baixas, mas são capazes de proliferação substancial resultando na superdominância (Garrot et al. 1993; Lima et al. 2012). Vários estudos têm mostrado que bambus têm um forte efeito sobre a estrutura e composição das florestas tropicais, diminuindo a densidade de árvores, área basal total, riqueza florística e grupos funcionais (Campanello et al. 2007; González et al. 2002; Griscom & Ashton 2003; 2006; Griscom et al. 2007; Larpken et al. 2011; Montti et al. 2013; d'Oliveira et al. 2013). A capacidade de crescimento agressivo (Griscom & Ashton 2003; 2006) e a plasticidade de caracteres funcionais,

como, por exemplo, a capacidade fotossintética, explicam seu sucesso em áreas perturbadas e conferem uma vantagem competitiva sobre as árvores da floresta (Montti et al. 2013; Grombone-Guaratini et al. 2013). No entanto, a competição por recursos pode não apenas explicar as alterações na riqueza de espécies e as mudanças na estrutura da floresta, o que sugere que outras estratégias envolvendo as interações planta-planta poderiam estar presentes (Chou & Hou 1981). Neste contexto, alguns estudos têm mostrado que metabólitos secundários, tais como flavonóides e ácidos orgânicos, são liberados pelo bambu e inibem a germinação de sementes e crescimento das árvores (Chou & Hou 1981; Tsai & Young 1993; Grombone-Guaratini et al. 2009; Chou 2010). A floração massiva e sincrônica seguida de morte é descrita como um importante evento que pode resultar em alterações nas características espectrais, térmicas e de luz no interior da floresta (Giordano et al. 2009).

Os bambus mais conhecidos e caracterizados como economicamente úteis são bambus de colmos lenhosos (lignificados) pertencentes às tribos Arundinarieae (bambus lenhosos temperados) e Bambuseae (bambus lenhosos tropicais) (Kelchner et al. 2013). Tais bambus (cerca de 1300 espécies lenhosas) desempenham papel fundamental na ecologia florestal (Grombone-Guaratini et al. 2009; 2011; Rother et al. 2013; 2015) onde representam cerca de 20 - 25% da biomassa total e na economia tendo sido caracterizado como um dos mais importantes recursos renováveis (Bansal & Zoolagud 2002).

Atualmente, a excessiva emissão de dióxido de carbono, uma das mais contundentes causas do aquecimento global e das mudanças climáticas tem voltado a atenção da pesquisa mundial para o desenvolvimento de métodos que minimizem tais impactos. Dentro deste contexto, aspectos como o sequestro de carbono e o potencial de produção de biomassa de bambu têm recebido atenção cada vez maior. Bambus podem desempenhar papel importante no sequestro de carbono devido ao crescimento vigoroso e adição de biomassa acima e abaixo do solo. Bambus têm vantagem significativa sobre outros recursos no sequestro de carbono devido ao crescimento vigoroso, rápido estabelecimento, adaptabilidade a diferentes condições de solo e clima (Sudhakara & Jijeesh 2015).

Vários usos econômicos nas indústrias cosmética e medicinal têm sido atribuídos às espécies de bambu asiáticos (Zhang et al. 2005; Jiao et al. 2007). Recentemente, o potencial alelopático (Chou & Yang 1982) que qualifica o uso de

folhas e serapilheira de bambu como recursos bioagroquímico (Chou 2010) foi descrito. Espécies de bambu têm sido utilizadas nos países do sudeste asiático, desde a antiguidade, como material de construção, na produção de papel, móveis, bebidas, barcos, bicicletas, artigos têxteis, instrumentos musicais, comida (Liese et al. 2015). As folhas são utilizadas para tratamento de febre e detoxificação (Lu et al. 2005).

Componentes biologicamente ativos encontrados em folhas bambu têm sido descritos e amplamente estudados para uso comercial (Lu et al. 2005). Estudos têm demonstrado que extratos de etanol/água de folha de bambu apresentam em sua composição glicosídeos de flavona, ácidos fenólicos, lactonas, cumarina, antraquinonas e aminoácidos (Li et al. 2003; Luo & Chen 2003; Lu & Liao 2003). Adicionalmente, pesquisas têm descrito que extratos de folhas de bambu são ricos em flavonóides (Zhang et al. 2008) e apresentam múltiplos efeitos biológicos, tais como anti-radical livre, anti-oxidação, anti-envelhecimento, anti-fadiga, anti-bactérias, anti-vírus e prevenção de doenças cardiovasculares, podendo ser utilizados como suplemento farmacêutico intermediário dietético, ingrediente cosmético, e aditivo alimentar (Zhang & Ding 1996a; 1996b; Tang et al. 1998; Lu & Liao 2003; Lu et al. 2002; 2005; Zhang et al. 2004; 2008). Outros artigos descreveram que o extrato de folha de bambu, rico em clorofila, pode ser utilizado em alimentos com potencial anti-séptico (Liu & Ding 2000) e que o extrato de folhas de bambu, rico em polissacarídeo podem inibir o crescimento de tumores implantado em ratos (*Sarcoma 180*) (Tang et al. 1998).

Na China em 2003, uma preparação obtida a partir das folhas de bambu, *Phyllostachys nigra var. hnonis*, com potencial antioxidante (AOB), foi certificado como um novo tipo de anti-oxidante natural rico polifenóis (flavonóides e ácidos fenólicos) e tem sido usado no preparo de alimentos (Lu et al. 2005; 2006).

Recentemente, a composição química e a atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas de *Phyllostachys heterocycla cv. Pubescens*, *Phyllostachys heterocycla cv. Gracilis*, *Phyllostachys heterocycla cv. Heterocycla* e *Phyllostachys kwangsiensis* foram avaliadas por Jin et al. (2011). Estes autores identificaram 63 componentes do óleo essencial que apresentaram atividade antioxidante (DPPH) e antimicrobiana contra *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*.

As plântulas do bambu Moso (*Phyllostachys pubescens*) possuem como componentes ativos p-cresol (queimado), 2-heptanol (cogumelo), ácido acético (vinagre) e 1-octen-3-ol (cogumelo) (Takahashi et al. 2010). Além disso, compostos

C5-C8 oxigenados e compostos C6 foram identificados nas suas folhas, especialmente C6 aldeídos, como 1-hexanal e (E)-2hexenal e C6 álcoois, tais como (Z)-3-hexenol, foram predominantes para potencial odorífico das folhas deste bambu (Zhang et al. 1998;. Yang et al. 2002).Com relação ao aroma das hastes adultas,o óleo essencial apresentou 89 compostos, sendo os principais ácido palmítico (16,5%), (E)-nerolidol (10,2%) e indol (8,1%). Na análise sensorial, 18 compostos foram detectados como ativos para o aroma, sendo os mais intensos eugenol (doce, cravo, verde) e (E)-2-nonenal (verde) e que aldeídos, tais como fenilacetaldéido (florais) e outros aldeídos insaturados C10-C9 formam o aroma característico deste bambu (Takahashi et al. 2010).

Apesar da grande diversidade brasileira de espécies de bambu pouco se conhece sobre sua composição química e atividades biológicas. Muitas medidas governamentais têm sido implementadas, a fim de fazer avançar o conhecimento e uso de bambus. Uma das medidas mais importantes foi à criação do Centro de Estudos de bambus e fibras naturais (Centro de Estudos de Bambus e Fibras Naturais) da Universidade de Brasília e da Rede Nacional de bambu (Longhi-Wagner 2012).

1.3 Apoclada simplex e Merostachys riedeliana

Para a realização deste estudo serão utilizadas duas espécies de bambus nativos na floresta Atlântica: *Apoclada simplex* McClure & Smith é uma espécie de bambu lignificado com colmos lenhosos de 0,45-13 metros, 2-4 cm de diâmetro (Clark 2001). A espécie é heliófila ou de luz seletiva higrófila. Caracteriza-se por sua distribuição descontínua e irregular formando, algumas vezes, extensos e densos agrupamentos (Smith et al.1981). *Apoclada simplex* é uma espécie de grande importância na construção civil e no artesanato no Brasil. É a única espécie do gênero representada no Estado de São Paulo e apresenta distribuição restrita no Paraná até o sul do estado de São Paulo (Figura 4).



Figura 4. *Apoclada simplex* vista geral, colmos e folhas (fotos de C. M. José).

Merostachys riedeliana Rupr. segundo Shirasuna & Filgueiras (2013) - taquara - mansa) é uma espécie heliófila, subereta, com altura entre três a cinco metros, característica e exclusiva da mata pluvial da encosta Atlântica formando densas touceiras. Sua distribuição é ampla nos estados de São Paulo e Santa Catarina. É uma das espécies mais frequentemente descritas como superdominante em fragmentos perturbados nas regiões de ocorrência. A fenologia da espécie ainda não foi determinada. Em geral, em áreas onde a espécie é superdominante é possível observar-se alterações na estrutura e composição da floresta. No Parque Estadual do Ipiranga (PEFI) são encontradas cerca de 19 populações distintas, sendo três delas relativamente extensas, alastrando-se por cerca de 50-100m dentro da mata (Figura 5).



Figura 5. *Merostachys riedeliana* detalhes do colmo e das ramificações e vista geral da planta (Fotos de Regina Shirasuna)

1.4 Atividade Antioxidante/FPS

Estresse Oxidativo

Radicais livres podem ser definidos como espécies altamente reativas que possuem um elétron desemparelhado na última camada eletrônica (Halliwell & Gutteridge 2000). Entre os diferentes tipos de radicais livres estão principalmente os metais de transição como o ferro, cobre e manganês, e as espécies derivadas do oxigênio. Em geral, são denominados de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), quando são derivados do oxigênio (Saldanha 2005). Os EROs podem também referir-se a espécies que não são derivadas de radicais livres, e sim algumas moléculas derivadas de O_2 capazes de gerar radical livre, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As principais EROs são as seguintes: radical superóxido (O_2^-); peróxido de hidrogênio (H_2O_2); radical hidroxila (OH^-) e oxigênio singlete (1O_2) (Ferreira & Matsubara 1997).

As EROs são formadas por reações de óxido-redução, após cederem ou receberem um elétron de outras moléculas instáveis, e são consequências diretas do metabolismo do oxigênio e da exposição da célula a xenobióticos (micotoxinas, pesticidas, etc.), que provocam a redução incompleta do oxigênio (Droge 2002). Além disso, os radicais livres oxigenados podem ser convertidos a outras espécies reativas não radicais, como peróxido de hidrogênio, ácido hipoclorídrico e peroxinitrito (Ferreira & Abreu 2007) Assim as EROs podem ser espécies radicais e não radicais (Fang et al. 2003).

Os radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio como o peróxido de hidrogênio (que não é um radical livre devido a ausência de elétrons desemparelhados na última camada) são natural e continuamente produzidos e são prejudiciais aos constituintes celulares, incluindo o DNA, lipídios e as proteínas (Ferreira & Matsubara 1997). Contudo, os organismos desenvolvem sistemas de defesa antioxidantes para a proteção e também sistemas de reparação, limitando assim o acúmulo de moléculas alteradas pela oxidação (Halliwell & Gutteridge 2000).

A produção de espécies reativas (em pequenas quantidades) nos organismos vivos decorre do metabolismo celular, normalmente sob a forma de EROs ou ERNs (espécies reativas do nitrogênio) e, uma vez produzidos são neutralizados pelas defesas celulares antioxidantes (enzimas e moléculas não enzimáticas) (Almeida 2009). A produção excessiva de espécies reativas ou a diminuição dos níveis de antioxidantes

conduzem ao estresse oxidativo, ou seja, a alteração do equilíbrio oxidante/antioxidante em favor do primeiro tem sido implicada na etiologia de várias doenças e no envelhecimento (Almeida 2009).

Normalmente os radicais livres são espécies instáveis, muito reativas e que, por isso, têm um tempo de vida muito curto, reagindo e causando lesões em várias estruturas e componentes celulares (Baskin & Salem 1997). As lesões que os EROS causam nos componentes celulares tornam estes radicais tóxicos para o organismo e podem estar na base do aparecimento de determinadas patologias como, por exemplo, câncer, aterosclerose, diabetes, cirrose ou as doenças neurodegenerativas (Arias 2005; Ferreira & Abreu 2007; Matsumoto 2008).

O efeito deletério do estresse oxidativo varia consideravelmente de um ser vivo para o outro, de acordo com a idade, o estado fisiológico e a dieta (Fehrenback 1999). Hábitos de vida inadequados, tais como a ingestão de álcool, fumo e dieta desequilibrada, condições ambientais impróprias, tais como a exposição à radiação não ionizante UV e ondas curtas, poluição, alta umidade relativa e temperatura elevada, estados psicológicos que provocam estresse emocional, envelhecimento e o exercício realizado de forma extrema, também estão associados ao estresse oxidativo (Vancini et al. 2005).

Antioxidantes naturais e sintéticos

Os antioxidantes são um grupo de substâncias que, quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, reagem com os radicais livres impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo (Halliwell et al. 1995). Podem ser divididas em sintéticos, destacando-se o butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propila (GP), tercbutilhidroquinona (TBHQ) ou naturais tais como: α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos) (Souza et al. 2006). Portanto, a capacidade de defesa do sistema antioxidante depende de uma dieta adequada em micronutrientes e outras substâncias bioativas (vitaminas, minerais, aminoácidos, flavonóides) e da produção endógena de antioxidantes (Córdova et al. 2000). As defesas antioxidantes do organismo são compostas por componentes enzimáticos e moleculares, sendo classificados em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Serafini 2006).

Os antioxidantes enzimáticos são responsáveis pela defesa primária do organismo contra as EROs, impedindo a sua formação e interação com alvos celulares. Estas enzimas permitem manter níveis celulares baixos de $^1\text{O}_2$ - e H_2O_2 , evitando assim a formação de OH^- (Winterbourn & Kettle 2003). O sistema de defesa antioxidante enzimático é constituído por várias enzimas, sendo as principais a superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) e a glutationaperoxidase (GPx) (Matsumoto 2008).

Os antioxidantes provenientes da dieta são bastante variados e incluem, como grupos majoritários, os polifenóis e os carotenóides (Donnelli & Robinson, 1995). Estes têm funções diferentes e são produzidos pelas plantas para proteger as células contra danos produzidos por herbivoria, por patógenos e pela radiação ultravioleta (Benzie et al. 2011). Quando ingeridos protegem também o organismo contra o estresse oxidativo (Benzie et al. 2011). Muitos desses compostos (ácido ascórbico, tocoferóis, carotenóides, polifenóis) são capazes de neutralizar as EROs (Finley et al. 2011)

As principais vitaminas com ação antioxidante são a E, a C e o β - caroteno ou provitamina A (Steiner 2002; Bianchi 1999). A vitamina E é composta por quatro homólogos lipossolúveis; α -, β -, γ - e δ -tocoferóis (Chow, 2001). O homólogo mais ativo e predominante é o α -tocoferol, sendo responsável pela proteção da membrana celular à oxidação por parte das EROs e radicais lipídicos, produzidos na peroxidação lipídica. Esta vitamina é o antioxidante lipossolúvel mais abundante (Serafini 2006; Limón-Pacheco & Gonsebatt 2009).

Os antioxidantes naturais com estrutura fenólica englobam cerca de 8000 compostos diferentes divididos em duas categorias principais, dependendo do número de grupos fenólicos: os fenóis simples (com um grupo hidroxila ligada a um anel fenila), e os polifenóis que têm mais de um grupo hidroxila ligado ao anel (Tan & Lin 2015). Os polifenóis são compostos de grande interesse antibacterianos, antivirais, anti-alérgica, anti-inflamatória, anticâncer e imunoestimulantes (Bansal et al. 2013)

Os polifenóis podem proteger as células contra os danos oxidativos e, portanto, limitar o risco de várias doenças degenerativas associadas ao estresse oxidativo, como as doenças cardiovasculares e o câncer (Serafini 2006). Os polifenóis presentes nos alimentos podem ajudar a limitar esses danos através de vários mecanismos: sequestrando e inativando os radicais livres, e estimulando sistemas endógenos de defesa (Ferguson 2001). Os antioxidantes vegetais são de natureza muito variada, mas os compostos fenólicos têm sido apontados como responsáveis por maior capacidade

antioxidante, sendo representados pelos flavonóides e isoflavonóides, ácidos fenólicos, taninos, lignanas, xantonas e outros (Razavi et al.2008).

Recentemente tem-se aumentado o interesse em compostos polifenólicos provenientes de plantas (Bansal et al., 2013). A atividade antioxidante destes compostos é devida a sua habilidade de estabilizar ou desativar radicais livres produzidos pelos processos metabólicos das células e tecidos de um organismo (Staszewaki et al. 2011).

Métodos de avaliação da capacidade antioxidante

Frente à diversidade de compostos com capacidade antioxidante sendo estudada e sabendo que os mesmos são capazes de agir por um ou mais mecanismos na inibição de oxidação torna-se necessária que a determinação da capacidade antioxidante seja avaliada utilizando-se mais de um método (Palanisamy et al. 2011).

A metodologia para mensurar a atividade antioxidante permite utilizar substratos lipídicos ou aquosos e também a capacidade protetora sobre moléculas biológicas (como a LDL, DNA e lipossomas). (Sucupira et al. 2012)

O método colorimétrico TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico) baseia-se na reação entre o ácido tiobarbitúrico e o malonaldeído (MDA), decorrente da quebra dos ácidos graxos insaturados na reação de oxidação (Sanchez-Moreno et al. 1998). Segundo estes autores, os compostos antioxidantes são capazes de inibir a oxidação das moléculas de lipídeos e conseqüentemente, a concentração de MDA é diminuída. O método desenvolvido por Marco (1968) e posteriormente modificado por Miller (1971) é baseado na técnica de co-oxidação dos substratos ácido linoléico e do β -caroteno, em um meio emulsionado. nesta metodologia, o ácido linoléico, ao ser exposto a condições que favorecem a sua oxidação (como a presença do oxigênio e a alta temperatura) produz estruturas radicalares que atacam as duplas ligações do β -caroteno que, ao perder o seu cromóforo provoca a descoloração da solução. O composto antioxidante prolonga o período de formação dos radicais na reação. Para a avaliação deste método, o aparelho Rancimat® (Metrohm AG, modelo CH-9100-Herisau, Switzerland) é utilizado para medir a capacidade de um composto em prolongar a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras (Abdalla & Roozen, 1999) O aparelho reproduz a análise dos métodos como o teste de forno de Shaal, o do oxigênio

ativo (AOM) ou o teste de Swift (Hasenhuetti & Wan 1992). A análise é realizada colocando-se o antioxidante sobre um óleo ou gordura, que são submetidos à alta temperatura (acima de 100 °C) e presença de fluxo de oxigênio. Os produtos secundários da oxidação são coletados em água ultrapura e, através de condutividade realiza-se a leitura pelo aparelho, que plota os sinais captados. O resultado do cálculo final corresponde ao período de indução da oxidação, a partir do tempo (horas) que o aparelho forneceu após a finalização.

O método que utiliza o radical ABTS● consiste na produção do radical ABTS● a partir de seu precursor, o ácido 2,2-azino-bis- (3-etilbenzotiazolina)-6- sulfônico (Miller et al. 1993). Ele pode ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis, tornando-o um teste vantajoso a ser empregado tanto na análise de compostos extraídos de alimentos, como em amostras biológicas (Scalfi et al. 2000; Mazza et al. 2002).

O método DPPH está baseado na capacidade dele em reagir com doadores de hidrogênio. Na presença de substâncias antioxidantes o mesmo recebe H[•] sendo então reduzido. Pode ser facilmente detectado por espectroscopia devido a sua intensa absorção na região visível. (Sanchez-Moreno 2002). As vantagens do método consistem em que o radical é comercializado na forma pronta para sua utilização e no tempo de reação curto (30 minutos), o que o torna um método comum para a análise de compostos provenientes de matrizes alimentares. Entretanto, por ser uma reação que ocorre em solvente metanol, seu uso é inapropriado para amostras biológicas, devido à precipitação das proteínas em meio alcoólico (Brand-Williams et al. 1995).

Desenvolvido por Cao et al. (1993), o método denominado ORAC (*capacidade de absorção de radicais de oxigênio*) utiliza como molécula alvo dos radicais livres de oxigênio as ficobiliproteínas β-ficoeritrinas ou R-ficoeritrina (PE), que são altamente fluorescentes e que contêm um pigmento vermelho fotorreceptor. O fundamento do método consiste na medida do decréscimo da fluorescência das proteínas, como consequência da perda de sua conformidade ao sofrer um dano oxidativo (Prior & Cao 1999). O AAPH é responsável pela geração do radical livre utilizado, a peroxila e o antioxidante padrão utilizado é o Trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E (Antolovich et al. 2002). A vantagem do método ORAC é que com o uso da fluorescência como medida do dano oxidativo, há uma menor interferência dos compostos coloridos na leitura, fator útil na análise de alimentos coloridos, como vinhos

e frutas (Granato 2011). Também é vantajoso o uso de radicais peroxila ou hidroxila como radicais, conferindo uma melhor aproximação na comparação de resultados *in vitro* com os padrões biológicos. O método também pode ser utilizado em fluidos biológicos como o plasma, o soro e a urina (Cao et al. 1993).

Ação da radiação ultravioleta e fotoproteção

Os primeiros estudos referentes à medição da eficácia de um fotoprotetor, realizados por Schulze (1963), envolveram a determinação do Fator de Proteção Solar (FPS). O conceito de FPS foi popularizado, em 1984, por Franz Greiter, que também estudou e descreveu a metodologia de desenvolvimento e avaliação de fotoprotetores que apresentam resistência à água (Greiter & Gschnait 2008).

No ser humano, os sistemas naturais de proteção e prevenção frente às exposições repetitivas à radiação ultravioleta (UV) envolvem: (a) secreção sudorípara contendo ácido ascórbico, enzima superóxido dismutase, vitamina E ácido urocânico; (b) pigmentação (melanina) e (c) espessamento da camada córnea (Kullavanijaya & Lim 2005; Urbach 2001).

As radiações UVA (ultravioleta A) e UVB (ultravioleta B) são responsáveis pelo equilíbrio entre a ativação e inibição dos sistemas antioxidantes por mecanismos distintos, tendo como consequência a alteração da homeostase cutânea (Flora & Ferguson 2005). Ainda segundo os mesmos autores, a radiação UVB (290-320 nm) é responsável pelos danos imediatos causados pela radiação solar por causa da sua energia elevada, ao passo que a UVA (320-400 nm) induz uma série de alterações celulares, envolvendo os fibroblastos e melanócitos, devido ao poder de maior penetrabilidade através da pele.

De acordo com a intensidade, o tempo de exposição à radiação UV, a susceptibilidade genética e a pigmentação da pele, o organismo humano pode manifestar alterações fisiológicas, entre elas processo inflamatório caracterizado pelo desenvolvimento de eritema ou queimaduras de graus variados, edema, calor e elevação dos níveis de substâncias como as prostaglandinas e leucotrienos (Lautenschlager et al. 2007; Taylor 2005; Rabe et al. 2006). Outras modificações incluem a mobilização de neutrófilos e ativação do sistema NADPH oxidase, o que gera uma série de espécies reativas oxidantes (Sheppard et al. 2005, El-Benna et al. 2008). O resultado disso é uma

alteração no sistema imunológico com a diminuição de células alteradas devido às mudanças na produção de citocinas pelos queratinócitos, na expressão genética de moléculas de adesão e na ativação dos melanócitos (aumento da síntese de melanina) esta última alteração pode ser constatada pelo bronzeamento duradouro da pele (Lautenschlager et al. 2007). Além disso, ocorre espessamento da camada córnea e redução de alguns fatores, como firmeza, elasticidade e hidratação da pele (Taylor 2005; Rabe et al. 2006). Outras alterações podem ocorrer em função dos efeitos crônicos da exposição solar, como o aumento da expressão do gene p53, que é um indicador de mutações e risco de câncer de pele (Baron et al. 2008; Lautenschlager et al. 2007; Naik et al. 2007; Morales-Molina et al. 2006; Afaq et al. 2005; Kullavanijaya & Lim 2005).

Como exposto acima, as radiações UVA e UVB estão associadas ao dano cumulativo à pele durante os anos de vida do indivíduo; portanto, torna-se de grande importância a avaliação da eficácia dos fotoprotetores.

Atualmente, é imperativa a tendência do desenvolvimento de fotoprotetores de amplo espectro, possuindo reduzida concentração de filtros químicos e de proteção elevada frente às radiações UVA e UVB, devido ao surgimento de eventos adversos ocasionados pelo uso tópico destes compostos ou formulações e mesmo por sua absorção cutânea, o que compromete a eficácia fotoprotetora, pois a proteção frente à radiação UV deve ser exercida somente na superfície ou nas camadas superficiais da pele. Dentre os eventos adversos ocasionados pelos filtros solares, têm-se: estímulo de atividades endócrinas, reações fotoalérgicas e fototóxicas, dentre outras irritações cutâneas (Schlumpf et al. 2004; Maier & Korting 2005).

Produtos naturais de origem vegetal são uma importante fonte de substâncias bioativas, muitos dos quais se constituem em modelos para síntese de um grande número de fármacos e substâncias cosméticas funcionais (Pinto et al. 2002). A pesquisa química de produtos naturais é direcionada à extração e/ou isolamento e identificação de substâncias químicas de origem vegetal ou animal, com potencial de aproveitamento pelas indústrias Química, Farmacêutica, de Produtos Cosméticos e outras de importância econômica (Pinto et al. 2002). A *World Health Organization*, 2004, reconhece que o conhecimento tradicional sobre as substâncias de origem natural é importante ferramenta para o desenvolvimento de novos produtos. No Brasil, segundo Funari & Ferro (2005), a exploração de produtos naturais e as inovações tecnológicas

tem sido de baixa e média intensidade frente à rica diversidade local, sendo preciso ainda importar tecnologia e pagar *royalties* para os laboratórios estrangeiros.

A exposição moderada à radiação UV apresenta benefícios, porém, o excesso pode propiciar: redução de concentração das substâncias antioxidantes endógenas; alterações nos lipídios das membranas celulares; inativação de sistemas enzimáticos; modificações de constituintes protéicos, carboidratos e DNA; reações inflamatórias; queratose solar; carcinoma e melanoma; sensibilização cutânea e reações fototóxicas e fotoalérgicas (Hönigsmann, 2002; Lautenschlager et al. 2007). A radiação UVB é absorvida pela pele, produzindo eritema, queimaduras e, eventualmente, câncer de pele (Armstrong et al. 2001; Soehnge et al. 1997). Embora a radiação UVA seja o componente predominante do espectro solar incidente sobre a superfície do planeta, esta possui, supostamente, potencial fotocarcinogênico de menor magnitude e é responsável pelo fotoenvelhecimento (Jansen et al. 2013b). Adicionalmente, a relevante relação da radiação UVA na indução da imunossupressão sistêmica está se tornando motivo de apreensão. O mecanismo pelo qual a radiação UVA exerce suas ações deletérias ainda não está completamente elucidado, no entanto, admite-se que esta radiação, por meio das reações fotodinâmicas, causa a geração de espécies reativas de oxigênio capazes de provocar danos ao tecido cutâneo (Pathak 1997; Matsumura & Ananthaswamy 2006).

O desenvolvimento de formulações dermocosméticas, nas suas diversas formas de apresentação, exige a seleção rigorosa das matérias-primas envolvidas e o desenvolvimento tecnológico criterioso, de modo a assegurar requisitos, como: qualidade, segurança, eficácia, aceitação e adesão do produto final pelo usuário/consumidor (Nishikawa et al. 2007). O desenvolvimento de fotoprotetores contendo filtros químicos, físicos e compostos bioativos alude em um desafio incessante para a Pesquisa e o Desenvolvimento dos Produtos Cosméticos Anti-Solares. Para a administração de extratos vegetais, frações isoladas ou substâncias bioativas e filtros solares químicos e físicos, existe a necessidade de incorporá-los em veículos adequados de acordo com a via de administração, os quais devem obedecer a critérios de assegurar o máximo da ação e o mínimo ou ausência de inconveniências (A.R. Baby, comunicação pessoal).

Atualmente é crescente o interesse da indústria pela substituição de produtos sintéticos por naturais. Embora a literatura internacional apresente inúmeros trabalhos onde bambus, principalmente do gênero *Merostachys*, sejam utilizados tanto na

indústria cosmética, alimentícia e medicinal, pesquisas que utilizam a incorporação de extratos de bambu nativo nessas áreas ainda é escassa.

2. Objetivo

O objetivo deste estudo foi realizar a análise fitoquímica de fenólicos e óleos essenciais e avaliar a atividade antioxidante de extratos e atividade fotoprotetora de *Apoclada simplex* e *Merostachys riedeliana*, buscando possíveis usos e aplicações na indústria.

2.1 Objetivos específicos:

- a) Caracterizar e comparar a atividade antioxidante dos extratos brutos e das frações utilizando o método de CCD, DPPH em duas espécies distintas de bambu
- b) Quantificar nos extratos a presença dos compostos fenólicos com o método colorimétrico de Folin-Cicalteou
- c) Quantificar nos extratos a presença de flavonóides mediante a utilização do método de colorimétrico utilizando o cloreto de alumínio ($AlCl_3$)
- d) Avaliar e comparar *in vitro* a eficácia fotoprotetora das frações aquosas e etanólicas de *M. riedeliana*
- e) Caracterizar quimicamente extratos e frações ativas
- f) Caracterizar quimicamente o óleo essencial

3. Materiais e Métodos

3.1 Material vegetal

Folhas e colmos de *A. simplex* foram coletados no Parque Estadual do Jacupiranga, (altitude 662m, 24°53'S 48°22'W) em maio de 2013. Uma exsicata foi depositada no Herbário Maria Eneida Kauffman Fidalgo do Instituto de Botânica de São Paulo (SP454412). A espécie foi identificada pelo Dr. Tarcisio S. Filgueiras.

Folhas e colmos de *M. riedeliana* Rupr. foram coletados no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, (altitude 770 a 825m, 23°38'08"S e 23°40'18"S e meridianos 46°36'48"W e 46°38'00"W) em maio de 2014. Uma exsicata foi depositada no Herbário

Maria Eneida Kauffman Fidalgo do Instituto de Botânica de São Paulo (SP 415223). A espécie foi identificada pelo Dr. Tarcisio S. Filgueiras.

3.2 Extração e fracionamento

O material fresco foi seco em casa de vegetação em temperatura ambiente, separado em colmos e folhas. A parte subterrânea não foi utilizada porque estudos prévios mostraram que a composição química não difere (dados não mostrados). Posteriormente, o material foi pulverizado em moinho de facas (Tecnal, Piracicaba, Brasil).

Extrato etanólico

O material resultante em pó (25g de colmos e 15 g de folhas por célula) foi submetido à extração com etanol em sistema automático ASE 300 (Dionex, Sunnyvale, USA). A extração foi realizada com etanol 60-70% com tempo estático por ciclo de 5min, temperatura de 60°C e pressão 1500psi. Os extratos hidroalcoolicos (EHA) foram concentrados em evaporador rotatório (BüchiR-114,Suíça), liofilizados (ModulyoD-115, Edwards, Crawley, UK) e armazenados em freezer (-23°C) até uso para experimento.

Extrato aquoso

O extrato aquoso (EA) foi obtido por maceração (15 g do pó para 300 mL de H₂O) em banho-maria (Banho Ética), a uma temperatura de 60 °C por 3 horas. O extrato foi filtrado em papel (Whatman 205 µm), concentrado em evaporador rotatório, liofilizado e armazenado em freezer (-23°C) até uso para experimento. O rendimento da extração foi realizado através de cálculo do peso seco (tabela 1). Alíquotas (1 mL; N=5) foram colocadas em vials Eppendorf e secas até peso constante em estufa (Blue M Mod 490A-1, USA) O resultado expresso em porcentagem (%).

Fracionamento dos extratos

Os extratos brutos ativos foram solubilizados em água/metanol (100 mL/1g de extrato) e posteriormente fracionados por partição líquido-líquido, com solventes de diferentes polaridades e em ordem crescente de polaridade, hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (Ac Et) e *n*-butanol (*n*-But), na proporção de (1:1). Este procedimento foi repetido cinco vezes. As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório (Büch) e liofilizadas (Edwards), pesadas e armazenadas em freezer até realização dos estudos químicos e de atividade biológica.

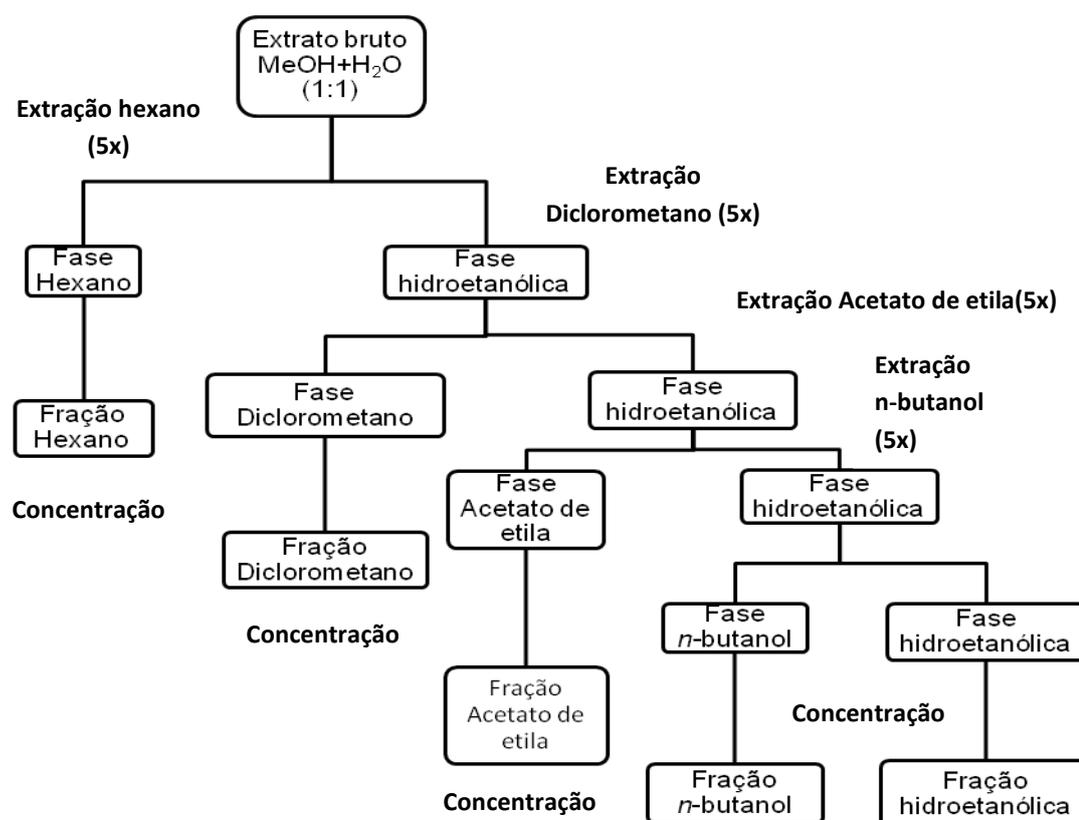


Figura 6. Fluxograma do fracionamento dos extratos brutos de folhas e colmos de *A. simplex* e *M. riedeliana*.

Obtenção dos óleos voláteis de folhas de *A. simplex* e *M. riedeliana*

Obtenção dos óleos voláteis de folhas de *A. simplex* e *M. riedeliana* foi realizada pelo método de hidrodestilação. Após o descongelamento, o material vegetal foi fracionado manualmente com o auxílio de uma tesoura sendo então pesado em uma

balança analítica digital (320g) e submetido à hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger, mantida por 3 horas após o início da ebulição. O óleo obtido foi retirado junto com parte do hidrolato, extraído em pentano (Synth) e desidratado com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄). O pentano foi retirado com o auxílio de evaporador rotatório e o óleo volátil puro pesado para se determinar o rendimento e, posteriormente, armazenado em congelador, à temperatura de -22°C para as análises posteriores (Farmacopeia Brasileira 2001).

O rendimento do óleo volátil foi calculado com base na massa de óleo obtida em relação à massa de material vegetal utilizada. Os valores foram dados em porcentagem.

3.3 Atividade Antioxidante (anti-radicalar)

Ensaio qualitativo por autografia em cromatografia de camada delgada

Alíquotas de 5 µL de extrato bruto (diluído em 200µg/mL de metanol) e frações (diluídas em 100µg/mL) e os padrões (quercetina, rutina, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido clorogênico e vitexina) foram aplicadas em placas de sílica gel 60 Merck (F₂₅₄) no tamanho de 10 x 10 cm e eluídas em cuba com a mistura de clorofórmio (CHCl₃), metanol (CH₃OH) e água (H₂O) na proporção de 60:35:5. Após a secagem cada cromatograma foi visualizado em sistema (Camag Reprostar 3) nos comprimento de onda (λ) de 366 e 254 nm e luz branca e fotografado em câmera digital Epson photo Mod. G 790A. Os resultados foram expressos em R_f (fator de retenção) para as manchas (spots ou halos) visualizadas (Wagner & Bladt, 2001).

Ensaio quantitativo em microplaca

A capacidade antioxidante dos extratos das folhas e colmos e frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanólica foram determinadas pelo método de seqüestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (Brand-Williams et al. 1995). Para isso, nas 96 cavidades da microplaca foram adicionados 71,4 µL de solução metanólica de DPPH (0,3 mm) juntamente com 178,5 µL das amostras dos extratos brutos e frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanólica que foram dissolvidos em solução metanol/água 80:20 (v/v) nas concentrações de 500 a 100 µg/mL. O controle negativo foi realizado com 71,4 µL de solução metanólica de DPPH (0,3 mm) e

178,5 µL de metanol, a quercetina foi utilizada como padrão positivo nas concentrações de 30 a 5 µg/L, o extrato de *Ginkgo biloba* (EGB 761) da Abbott foi utilizado como referência em atividade antioxidante. O comprimido de 80 mg foi triturado e dissolvido em metanol. A microplaca foi mantida em temperatura ambiente, na ausência de luz, e a absorbância foi medida aos 15 e 30 minutos de reação, a 518 nm, em aparelho Biotek® KC4. As amostras foram processadas em triplicatas.

Capacidade seqüestradora do radical foi expressa como porcentagem de redução e calculada usando a seguinte equação:

$$\% \text{ redução DPPH} \cdot = [(Absc - Absa) / Absc] \times 100$$

Onde:

Absc = Absorbância controle

Absa= Absorbância amostra e ou quercetina

Os valores médios da capacidade antioxidante (IC₅₀) (concentração da amostra necessária para reduzir a concentração do radical DPPH em 50%) foram calculados através da regressão linear, plotando-se a porcentagem de atividade antioxidante em função de diferentes concentrações das amostras. Os valores foram expressos como média ± erro padrão.

3.4 Determinação de compostos fenólicos totais

Ensaio qualitativo por autografia em cromatografia de camada delgada

Alíquotas de 5 µL de extrato bruto (diluído em 200µg/mL de metanol) e frações (diluídas em 100µg/mL) e os padrões (quercetina, rutina, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido vanílico, ácido clorogênico e vitexina) foram aplicadas em placas de sílica gel 60 Merck (F₂₅₄) no tamanho de 10 x 10 cm e eluídas em cuba com a mistura de clorofórmio (CHCl₃), metanol (CH₃OH) e água (H₂O) na proporção de 60:35:5. Após a secagem cada cromatograma foi visualizado em sistema (Camag Reprostar 3) nos comprimento de onda (λ) de 366 e 254 nm e luz branca e fotografado em câmera digital Epson photo Mod. G 790A. Os resultados foram expressos em R_f (fator de

retenção) para as manchas (spots ou halos) visualizadas (Wagner & Bladt, 2001). Após a eliminação do solvente, os cromatogramas foram revelados com uma solução de NP-PEG, que consiste em borrifar primeira solução A (2-Aminoetil difenilborato – 1% em CH₃OH) e depois a solução B (polietileno glicol 6000 – 5% em C₂H₆O). Visualizar sob luz UV (366nm).

Ensaio quantitativo em microplaca

Para a quantificação dos fenólicos totais de *M. rideliana* empregou-se o método de Folin-Ciocalteu descrito por Marinova et al. (2005) com adaptações para microplaca. Este método se baseia na transferência de elétrons, em meio alcalino, entre o ácido fosfotúngstico/fosfomolibdênico e os compostos fenólicos, formando complexos azuis e que podem ser determinados espectrofotometricamente (Ainsworth & Gillespie 2007).

A quantificação foi realizada comparando-se as absorbâncias do extrato bruto e frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanólica com as de uma curva padrão preparada com ácido gálico nas concentrações de 100 à 25 µg/L. Os extratos e frações foram diluídos em solução de metanol/água 80:20 (v/v) nas concentrações de 5,0 e 2,5 mg/mL. O ensaio, realizado em triplicata, consiste em adicionar em cada cavidade da microplaca, na seguinte ordem: 90µL de água destilada, 10µL de padrão ou amostra, 10µL do reagente Folin-Ciocalteu e esperar 5 minutos. Logo após, adicionar 100µL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) 7% (em água destilada), 40µL de água destilada, misturar e incubar por 90 minutos. A leitura foi feita a 750nm em aparelho Biotek® KC4 e o conteúdo de fenólicos totais foi expresso em microgramas equivalentes de ácido gálico (EAG) por miligrama de amostra (µg de EAG/mg). Os resultados foram expressos como média seguida do seu respectivo erro padrão.

3.5 Determinação de flavonóides totais

Ensaio quantitativo em microplaca

Para a quantificação dos flavonóides totais de *M. rideliana* empregou-se o método colorimétrico que utiliza o cloreto de alumínio (AlCl₃) como agente complexante. Nesta metodologia, o cátion alumínio se complexa com os oxigênios vicinais presentes nos

flavonóides, ocorrendo um deslocamento dos seus máximos de absorção para regiões de maior comprimento de onda, possibilitando a determinação da quantidade de flavonoides (Marcucci et al. 1998).

Os extratos brutos e frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanólica foram dissolvidos em solução de metanol/água 80:20 (v/v) nas concentrações de 5,0 e 2,5 mg/mL, assim como a quercetina (Sigma Aldrich®) utilizada como padrão externo, nas concentrações de 150 a 20 µg/mL, para a construção da curva de calibração.

Em microplacas de 96 poços foram adicionados 20 µL das amostras e do padrão em 210 µL da solução de metanol 80%, e em seguida, 20 µL da solução de cloreto de alumínio foi acrescentado e homogeneizado. Após 30 minutos de reação no escuro com a microplaca coberta com folha de alumínio, as absorbâncias foram determinadas em um comprimento de onda de 427nm em espectrofotômetro Biotek® KC4. A solução de metanol 80% utilizada como branco, e os controles com 20 µL da amostra em 210 µL de metanol 80% foram realizados para corrigir (descontar) a absorbância a 427 nm.

O conteúdo de flavonóides totais foi expresso em microgramas equivalentes de quercetina por miligrama de amostra (µg de quercetina/mg). Todas as análises foram realizadas em triplicada, e os resultados expressos como média seguida do seu respectivo erro padrão.

3.6 Eficácia fotoprotetora *in vitro*: determinação do valor de proteção solar estimado (FPS) e proteção frente à radiação UV de extratos e frações de *M. riedeliana* e *A. simplex*

A preparação das formulações fotoprotetora consistiu em uma emulsão do tipo gel (Aristoflex, 1%) contendo os filtros solares: avobenzona (3%), octil dimetil Paba (8%) e metoxicinamato de octila (7,5%), utilizando-se o etanol 10% (p/v) nas frações de *M. riedeliana* e *A. simplex*, e foram incorporadas na emulsão e esta foi diluída em álcool etílico absoluto PA (Merck) na concentração de 0,2µl/mL.

A eficácia fotoprotetora *in vitro* das formulações foi determinada por meio da espectrofotometria de refletância difusa com esfera de integração. Para o ensaio, alíquotas das formulações foram pesadas e aplicadas uniformemente, sob a forma de filme de 1,3 mg/cm², sobre a superfície de placas de polimetilmetacrilato (PMMA) de 25 cm²,

substrato internacionalmente empregado por mimetizar as características de rugosidade da superfície da pele humana (Cosmetics Europe, 2011; United States, 2011). A razão de aplicação adotada para a análise é de 0,75 mg/cm² (32.5mg) (Springsteen et al. 1999; Diffey et al.2000).

Após secagem de 30 minutos, as placas foram submetidas à leitura espectrofotométrica, utilizando uma placa de PMMA sem produto como branco de leitura. Triplicatas foram empregadas com repetições de nove pontos de leituras de transmitância por placa avaliada.

Os resultados de transmitância das amostras foram tratados pelo programa UV-2000[®], em intervalo de comprimento de onda de 290 a 400 nm e taxa de progressão de 1,0 nm. Os dados foram convertidos em valores estimados de fator de proteção solar (FPS) e comprimento de onda crítico (λ crit) das formulações. (Cosmetics Europe, 2011; Diffey et al. 2000; Springsteen et al. 1999).

O FPS *in vitro* foi calculado por meio da **Equação 1**, a seguir (Springsteen et al. 1999):

$$FPS = \frac{\int_{290nm}^{400nm} E\lambda S\lambda d\lambda}{\int_{290nm}^{400nm} E\lambda S\lambda T\lambda d\lambda}$$

Equação 1. Fator de Proteção Solar *in vitro* (FPS). Onde: $E\lambda$ = eficácia eritematógena espectral da CIE (Commission Internationale de l'Eclairage); $S\lambda$ = irradiância solar espectral; $T\lambda$ = transmitância espectral da amostra; $d\lambda$ = intervalo dos comprimentos de onda (= 1 nm)

O comprimento de onda crítico estimado das amostras foi determinado pela **Equação 2** (United States, 2011).

$$\int_{290}^{\lambda_c} A(\lambda)d\lambda = 0.9 \int_{290}^{400} A(\lambda)d\lambda$$

Equação 2. Comprimento de onda crítico *in vitro*. Na qual:

$A(\lambda)$ = absorvância espectral da amostra;

$d(\lambda)$ = intervalo dos comprimentos de onda.

Os parâmetros foram determinados pelo *software* UV-2000, que acompanha o sistema UV-2000S. A comparação entre os dados de fator de proteção e onde crítica foram avaliados de acordo com o teste *t* de Student pareado (nível de significância = 0,05).

3.7 Análises

Análise Cromatográfica UHPLC – DAD - *Apoclada simplex*

As frações diclorometano, acetato de etila, n-butanol e aquosa de *Apoclada simplex* foram analisadas em um cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência (UHPLC) Ultimate3000, marca Dionex® equipado com duas bombas modelo DGP-3600RS, detector de arranjo de diodos (DAD) modelo DAD3000(RS), amostrador automático modelo WPS3000RS e software Chromeleon versão 6.80. A coluna utilizada para as análises foi Kinetex® C-18 (150 x 4,6 mm x 2,6 µm) da Phenomenex. A eluição foi realizada com solventes de grau cromatográfico em sistema gradiente, nas seguintes condições cromatográficas: Iniciou-se com 10% de metanol e 90% de água indo até 45 minutos para atingir 50% de metanol e 50% de água, depois mais 10 minutos para atingir 100% de metanol e permaneceu durante 5 minutos 100% de metanol, 5 minutos para voltar à condição inicial e então mais 15 minutos em 10% de metanol para condicionamento da coluna. Tempo de análise foi de 80 minutos. Vazão da bomba de 1mL/min e volume de amostra injetado de 20 µL. Os cromatogramas foram registrados em 350 nm e os espectros no UV-Vis adquiridos na faixa de 200 a 800 nm. Foi utilizada uma mistura de padrões contendo ácido cumárico, ácido clorogênico, ácido cafeico, orientina, isoorientina e vitexina foram usados para comparar o tempo de retenção e perfil espectral UV/Vis das flavonas e ácidos fenólicos.

Análise LC-DAD / ESI / MS / MS de *M. riedeliana*

O extrato aquoso e a fração acetato de etila de folha de *M. riedeliana* foram analisadas em sistema HPLC Shimadzu equipados com SCL 10A Controller, bombas LC-10AD, detector SPDM 10A e SIL - 10 auto-injetor AF (Shimadzu, Kyoto, Japão), e espectrômetro de massa Esquire 3000 Plus por captura de ions (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). A separação cromatográfica (LC) foi realizada utilizando uma coluna Phenomenex C-18 (250 x 4,6 mm, 5 mm) a 20 ° C, e os cromatogramas registrados a 280nm. A eluição consistiu de um gradiente linear de 95% de água (Milli-Q) com 0,1% de ácido acético glacial e 5% de acetonitrila até 100% acetonitrila em 30 min. fluxo de 0,9 mL / min. e volume de injeção de 20 uL. O processo de ionização foi por electrospray no modo positivo (ESI⁺), voltagem do capilar de 4,0 kV, seguido por nebulização com nitrogênio a 27 psi, com um fluxo de 7 L / min e temperatura de 320 ° C. Os resultados são espectros de massas (m/z) dos ions totais e os espectros de massas (MS2) são obtidos de scans dependentes de dados a partir de pico cromatográfico com m / z (massa / carga) de 100 a 3000.

Análise GC-MS de *A. simplex* e *M. riedeliana*

Extrato e frações de *A. simplex* e *M. riedeliana*

O extrato aquoso de folhas e as frações acetato de etila, *n*-butanol e aquosa de *A. simplex* e a fração acetato de etila de folha de *M. riedeliana* e padrões autênticos (5 mg) foram secos sob vácuo e submetidos a reação de sililação conforme procedimento padrão (Caccere et al. 2013). Os derivados de éter de trimetilsilila foram preparados utilizando reagentes BSTFA / TMS. As amostras foram analisadas em cromatografo a gás Agilent (série 6890) Hewlett-Packard, acoplado a espectrômetro de massas, com sistema quadrupolo (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector), com energia de ionização de 70eV. A coluna capilar utilizada foi DB-1701 (30m x 0,25mm de diâmetro interno, com 0,25µm de espessura), nas seguintes condições: injeção 1µl (com divisão de fluxo-split/splitless), temperatura inicial de 70°C e gradiente de temperatura de, de aquecimento da coluna de 70 a 280°C a 5°C/min e tempo total de análise 48 min. O Hélio foi utilizado como gás de arraste a uma pressão de 80 kpa e velocidade linear de 1 ml/min.

Óleos voláteis de folha de *A. simplex* e *M. riedeliana*

Os óleos voláteis foram obtidos por hidrodestilação e diluídos em acetona na razão de 1:100 (V/V). O volume de injeção foi de 1,0 µl e as amostras foram injetadas por um injetor automático Agilent modelo 7683 Series. As amostras foram analisadas por cromatografia à gás (Agilent, série 6890) Hewlett-Packard) acoplado a espectrômetro de massas, com sistema quadrupolo (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector), com energia de ionização de 70eV. A coluna capilar utilizada foi HP 5-MS (30m x 0,25mm de diâmetro interno, com 0,25µm de espessura). As condições de análise foram: injetor (com divisão de fluxo-split/splitless) a 250°C (razão de divisão 1: 20), temperatura de aquecimento da coluna de 40 a 240°C a 3°C/min, 240°C por 10 min (tempo total de análise 78 min) utilizando Hélio como gás de arraste a uma pressão de 80 kpa e velocidade linear de 1 ml/min. O índice de retenção de Kováts (IK) foi calculado em coluna HP 5-MS, utilizando uma série homóloga de alcanos (C8-C40) submetidas às mesmas condições de análise cromatográfica das amostras dos óleos.

A identificação dos componentes dos óleos voláteis foi baseada na comparação entre o índice de retenção e o espectro de massas destes com os das bibliotecas instaladas no equipamento (Wiley 275 e Adams 2007), de amostras autênticas e dados retirados da literatura ou, ainda, por comparação com espectros de massas registrados em banco de dados como NIST 08 (National Institute of Standards and Technology), onde são registrados mais de 65.000 compostos.

A fim de permitir uma comparação entre os tempos de retenção dos diferentes compostos obtidos com os dados da literatura, amostras autênticas e banco de dados, foi utilizado o índice de retenção de Kováts, que utiliza uma série de carbonos de alcano saturado normal, para evitar erros devidos a variações do tempo de retenção dos compostos, decorrentes de alterações como temperatura, fluxo e operador. O índice de retenção corrigido varia muito pouco e de maneira linear com a temperatura. Os índices de retenção calculados foram, então, comparados com os da literatura ou com amostras autênticas (Sandra & Bichi 1987; Collins & Braga 1988).

O índice de Kovats foi obtido através da seguinte equação:

$$KI = 100Z + \frac{100[(\log t'_R X) - (\log t'_R Z)]}{(\log t'_R Z + 1) - (\log t'_R Z)}$$

Onde:

X é o composto de interesse;

Z é o número de átomos de carbono do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente anterior ao tempo de retenção de X;

$t'_R X$, é o tempo de retenção ajustado de X;

$t'_R Z$, é o tempo de retenção ajustado de Z;

$t'_R Z + 1$, é o tempo de retenção ajustado do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente posterior ao tempo de retenção de X.

Os cromatogramas foram reintegrados com pico inicial de 0,5% para os compostos.

4. Resultados e Discussão

4.1 Obtenção e rendimento dos extratos brutos e frações de *A. simplex* e *M. riedliana*

O rendimento do extrato aquoso de folhas e colmos de *A. simplex* foi de respectivamente, 4,62% e 2,98%. O rendimento do extrato etanólico de folha e colmo foi, respectivamente, de 10,36% e 9,8%. O rendimento das frações obtidas após o fracionamento líquido-líquido dos extratos aquosos e etanólicos são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Dados dos rendimentos das frações (%) obtidos por partição líquido-líquido dos extratos aquosos e etanólicos de *A. simplex*

| Frações (%) | Hexano | Diclorometano | Acetato de etila | <i>n</i> -butanol |
|------------------|--------|---------------|------------------|-------------------|
| Folhas aquosa | 5,93 | 12,11 | 24,99 | 25,82 |
| Folhas Etanólica | 9,19 | 12,37 | 12,31 | 53,74 |
| Colmo aquoso | 14,83 | 5,07 | 11,78 | 19,81 |
| Colmo etanólico | 7,07 | 11,50 | 7,45 | 16,31 |

O rendimento do extrato aquoso de folhas e colmos de *M. riedeliana* foi de respectivamente, 4,16% e 2,43%. O rendimento do extrato etanólico de folha e colmo foi, respectivamente, de 9,34% e 9,73%. O rendimento das frações obtidas após o fracionamento líquido-líquido dos extratos aquosos e etanólicos são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Dados dos rendimentos das frações (%) obtidos por partição líquido-líquido dos extratos aquosos e etanólicos de *M. riedeliana*.

| Extratos (%) | Hexano | Diclorometano | Acetato de etila | <i>n</i> -butanol |
|------------------|--------|---------------|------------------|-------------------|
| Folhas aquosa | 4,77 | 16,23 | 32,40 | 28,57 |
| Folhas Etanólica | 15,81 | 26,46 | 28,43 | 41,65 |
| Colmo aquoso | 10,67 | 9,39 | 16,75 | 21,33 |
| Colmo etanólico | 12,78 | 15,49 | 17,34 | 23,45 |

A fração *n*-butanol de folhas dos extratos aquoso e etanólico apresentaram os maiores rendimentos para *A. simplex*. Em *M. riedeliana* a fração acetato de etila de folhas e a *n*-butanol de folhas e colmos apresentaram maior rendimento. Assim como em brotos de *P. pubescens* e *P. nigra*, os componentes solúveis tem afinidade por solventes de alta polaridade (Park & John 2010). Caracteres morfológicos e composição bioquímica diferencial entre as espécies podem explicar as diferenças entre o rendimento.

4.2 Determinação da capacidade antioxidante

Método Qualitativo - CCD - DPPH

A atividade sequestradora do radical livre DPPH em CCD dos extratos (Figura 7) e frações (Figura 8A E 8B) de folhas e colmo de *A. simplex* mostrou o potencial antioxidante desta espécie e sugeriu a presença dos padrões utilizados nesta análise em todos os extratos: ácido ferúlico (Rf=0,76) e ácido caféico (Rf= 0,47).

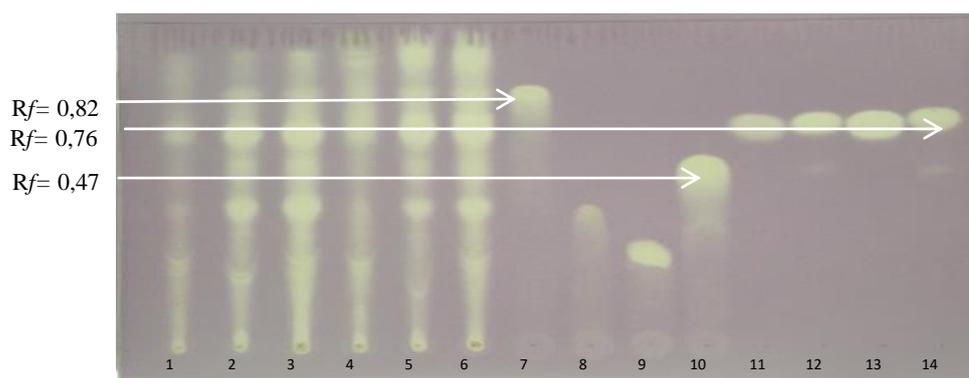


Figura 7. Perfil cromatográfico de extratos brutos de *A. simplex* (CCDC, em sílica gel F₂₅₄, clorofórmio: metanol: água (60:35:5). 1- Extrato Aquoso de folha, 2 - Extrato aquoso de colmo jovem, 3 - Extrato aquoso de colmo adulto 4 - Extrato etanólico de folha, 5 - Extrato etanólico de colmo jovem, 6 - Extrato etanólico de colmo adulto, 7 - quercetina, 8 - rutina, 9 - ácido clorogênico, 10 - ácido cafeico, 11 - ácido vanílico, 12 - ácido ferúlico, 13 - ácido siríngico, 14 - Ácido sináptico. Revelador solução metanólica do radical livre DPPH e visualizado sob luz branca.

A atividade sequestradora do radical DPPH das frações aquosas de folha e colmo de *A. simplex* são mostradas nas figuras 8A E8B e mostram o potencial antioxidante das frações diclorometano de folha (aquoso e etanólico). Os perfis das frações em relação aos padrões de referencia e dados de *R_f*s permitiram inferir a presença de quercetina (*R_f* 0,82). Os ácidos fenólicos, vanílico (*R_f* 0,70) e ferúlico (*R_f* 0,76) foram detectados nas frações acetato de etila e *n*-butanol dos extratos aquoso e etanólico de colmo.

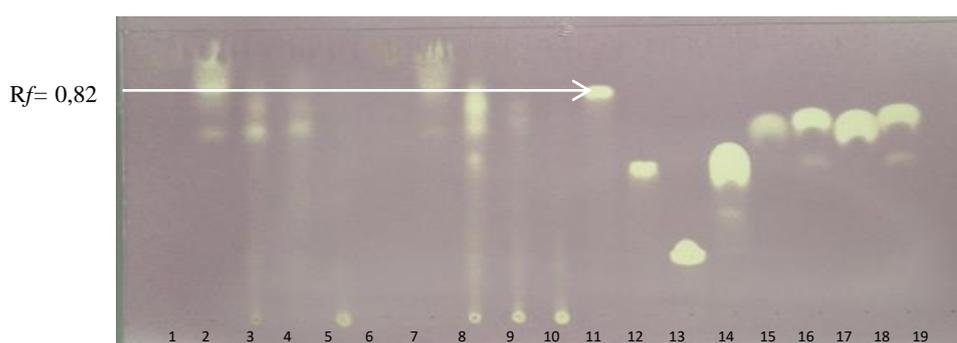


Figura 8A Perfil cromatográfico (CCDC, em sílica gel F₂₅₄, clorofórmio: metanol: água (60:35:5) 1 - Extrato Aquoso de folha, 2 - Fração hexânica; 3 - Fração diclorometano; 4 - Fração acetato de etila; 5 - Fração *n*-butanol; 6- Fração Aquosa; 7-Extrato etanólico de folha, 8 - Fração hexânica; 9- Fração diclorometano; 10 - Fração acetato de etila; 11 - Fração *n*-butanol; 12 - Fração Aquosa; 13-Quercetina, 14-Rutina, 15-Ácido cafeico, 16-Ácido clorogênico, 17-Ácido ferúlico, 18-Ácido vanílico, 19-Vitexina. Revelado com solução metanólica de DPPH e visualizados sob luz branca.

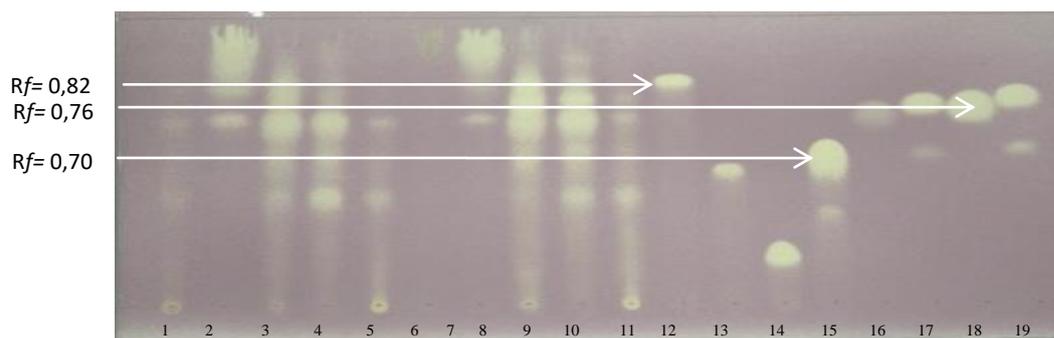


Figura 8B Perfil cromatográfico (CCDC, em sílica gel F₂₅₄, clorofórmio: metanol: água (60:35:5) 1 - Extrato Aquoso de Colmo, 2 - Fração hexânica, 3 - Fração diclorometano, 4 - Fração acetato de etila, 5 - Fração n-butanólica, 6- Fração Aquosa, 7- Extrato etanólico de Colmo, 8 - Fração hexânica, 9- Fração diclorometano 10 - Fração acetato de etila, 11 - Fração n-butanólica 12 - Fração Aquosa, 13- Quercetina, 14- Rutina, 15- Ácido cafeico, 16- Ácido clorogênico, 17- Ácido ferúlico, 18- Ácido vanílico, 19- Vitexina. Revelado com solução metanólica de DPPH e visualizados sob luz branca.

A atividade sequestradora do radical livre DPPH em CCD dos extratos e frações (Figura 9A E 9B) de folhas e colmo de *M. riedeliana* mostra o potencial antioxidante desta espécie e indica a presença dos padrões utilizados nesta análise em todos os extratos: ácido ferúlico (Rf=0,78) e ácido clorogênico (Rf= 0,68) nas frações acetato de etila e diclorometano de folhas e colmos.

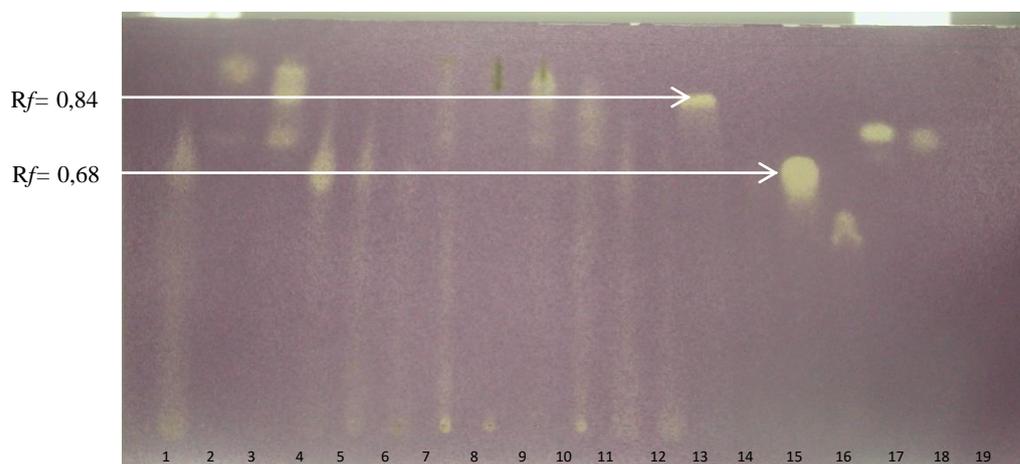


Figura 9A - Perfil cromatográfico (CCDC, em sílica gel F₂₅₄, clorofórmio: metanol: água (60:35:5) 1- Extrato Aquoso de folha, 2- Fração hexânica, 3- Fração diclorometano, 4- Fração acetato de etila, 5- Fração n-butanólica, 6- Fração Aquosa, 7- Extrato etanólico de folha, 8- Fração hexânica, 9- Fração diclorometano, 10- Fração acetato de etila, 11- Fração n-butanólica, 12- Fração Aquosa, 13- Quercetina, 14- Rutina, 15- Ácido cafeico, 16- Ácido clorogênico, 17- Ácido ferúlico, 18- Ácido vanílico; 19- Vitexina. Revelado com solução metanólica de DPPH e visualizados sob luz branca.

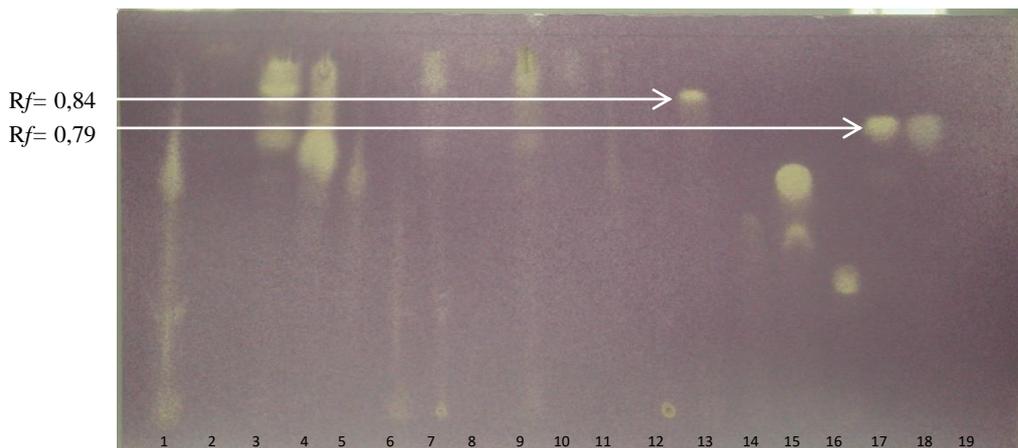


Figura 9B - Perfil cromatográfico (CCDC, em sílica gel F₂₅₄, clorofórmio: metanol: água (60:35:5) 1- Extrato Aquoso de Colmo, 2-Fração hexânica, 3-Fração diclorometano, 4-Fração acetato de etila, 5-Fração n-butanólica, 6-Fração Aquosa, 7-Extrato etanólico de Colmo, 8-Fração hexânica, 9-Fração diclorometano, 10-Fração acetato de etila, 11- Fração n-butanólica, 12-Fração Aquosa, 13-Quercetina, 14- Rutina, 15-Ácido cafeico, 16-Ácido clorogênico, 17-Ácido ferúlico, 18-Ácido vanílico; 19-Vitexina. Revelado com solução metanólica de DPPH e visualizados sob luz branca.

A análise visual comparativa das placas de CCD sugere que *M. riedeliana* apresenta um pontencial antioxidante menor que *A. simplex*.

Quantificação DPPH

Os resultados do ensaio com DPPH foram apresentados como valor de IC₅₀ (Tabela 4), definida como a concentração efetiva de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50%.

Tabela 3. Concentração efetiva (IC₅₀) dos extratos brutos e frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanólica de *M. riedeliana* obtida no ensaio de determinação de atividade antioxidante.

| Amostras | IC ₅₀ | R ² |
|--|------------------|----------------|
| Quercetina | 3,72±0,03 | 0,991 |
| Extrato <i>G. biloba</i> EGb 761® | 38,07±0,19 | 0,989 |
| Folhas Aquosa | | |
| Extrato bruto | 63,2±0,21 | 0,991 |
| Fração diclorometano | 36,07±0,18 | 0,986 |
| Fração acetato de etila | 33,96±0,16 | 0,990 |
| Fração <i>n</i>-butanólica | 57,52±0,20 | 0,983 |
| Colmos Aquoso | | |
| Extrato bruto | 68,87±0,39 | 0,992 |
| Fração diclorometano | 37,31±0,44 | 0,987 |
| Fração acetato de etila | 40,58±0,57 | 0,985 |
| Fração <i>n</i>-butanólica | 61,78±0,43 | 0,984 |

As maiores atividades sequestradoras do radical DPPH de *M. riedeliana*, foram encontradas nas frações acetato de etila de folhas (33,96 µg/mL), diclorometano de folhas (36,07 µg/mL), seguida pelas frações diclorometano de colmos 37,31±0,44 µg/mL e acetato de etila de colmos (40,58). Segundo Issa (2015) as maiores atividades antioxidantes de *A. simplex* foram encontradas na fração clorofórmica de colmos (24,02 µg/mL), seguido pela fração clorofórmica de folhas (26,34 µg/mL), e pela fração acetato de etila de colmos (30,55 µg/mL). Vale salientar que para *A. simplex*, todas as atividades sequestradoras do radical DPPH foram mais intensas do que aquela obtida para o extrato de *G. biloba* (EGB 761). Já para *M. riedeliana* somente as frações de folha tiveram atividade sequestradora do radical DPPH mais proeminente que o padrão .

Segundo a *Comissão Nacional de Saúde e Planejamento Familiar da República da China* (2014) a capacidade antioxidante é uma das mais importantes propriedades das folhas dos bambus estudados e plantados na China. Nossos resultados demonstram que as folhas de ambas as espécies estudadas apresentam padrão semelhante

O extrato metanólico de folhas de *B. textilis* apresentou atividade antioxidante pelos métodos de DPPH, Frap e inibição do ensaio de β-caroteno (Liu et al. 2016). Segundo os autores, os resultados obtidos com testes *in vitro* demonstraram que a orientina e isoorientina estão fortemente relacionadas com a atividade antioxidante.

Sabe-se que a isoorientina reduz o ROS induzidos por H₂O₂ e a produção de óxido nítrico. (Liu et al. 2016). Em *Phylostachys pubescens* e *Phylostachys nigra* a atividade sequestradora do radical DPPH mais intensa foi descrita para as frações acetato de etila (IC₅₀=40 e 80 µg /mL) e butanólica IC₅₀=70 e 80 µg /mL) que, segundo os autores são as s que possuem maior quantidade de fenólicos (Park & Jhon 2010). Vale salientar, neste caso, que os valores brutos não são comparáveis, tendo em vista que os padrões utilizados foram o BHT, BHA, ácido ascórbico e quercitina. Segundo os autores, nesta fração foram identificadas altas concentrações de compostos fenólicos como: ácidos caféico, siríngico, *p*-cumárico, ferúlico, protocatecuico e *p*-hidróxi-benzóico. Estes extratos também apresentaram alta capacidade de inibir a enzima conversora da angiotensina (ACE), indicando uma relação positiva entre capacidade antioxidante e inibição da ACE com os compostos fenólicos encontrados. (Park & John 2010).

O ensaio da atividade antioxidante *in vitro* é uma pratica comum em muitos laboratórios de produtos naturais; a atividade medida pelos ensaios muitas vezes são

reflexo da atividade sob condições específicas (Tan & Lin, 2015). O método DPPH• é bastante utilizado para avaliação da capacidade antioxidante, mas essa avaliação antioxidante não deve se basear apenas em uma única metodologia, sendo necessários outros métodos para caracterizar completamente um composto como antioxidante (Ciesla et al. 2012).

4.3 Quantificação de Fenólicos Totais

Método Qualitativo - CCD - NP-PEG

A fim de verificar a qualitativamente a presença de flavonoides e compostos fenólicos realizou-se a revelação química com NP-PEG com os extratos e frações de *A. simplex* (figura 10 e 11A e 11B) e *M. riedeliana* (Figuras 12A e 12B).

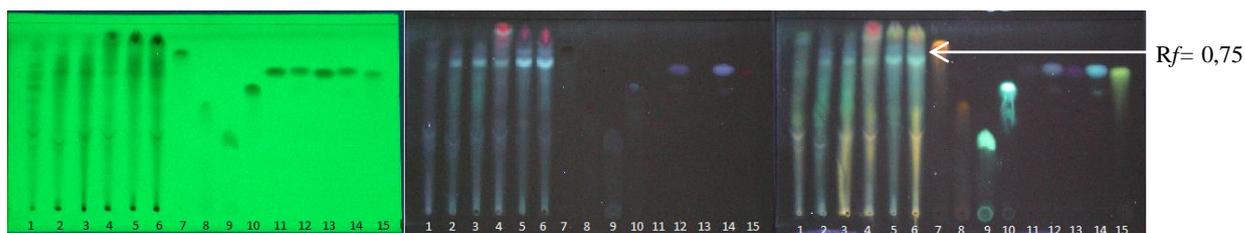


Figura 10. Perfil cromatográfico dos extratos brutos de *A. simplex* (CCDC, em sílica gel F₂₅₄, clorofórmio: metanol: água (60:35:5). 1- Extrato Aquoso de folha, 2 - Extrato aquoso de colmo jovem, 3 - Extrato aquoso de colmo adulto 4 -Extrato etanólico de folha, 5 -Extrato etanólico de colmo jovem, 6 - Extrato etanólico de colmo adulto, 7 - Quercetina, 8 - Rutina, 9 -Ácido clorogênico, 10 - Ácido cafeico, 11-Ácido vanílico, 12-Ácido ferúlico, 13-Ácido siríngico, 14 – Ácido sináptico. Revelador NP-PEG e visualizado 366nm.



Figura 11A Perfil cromatográfico (CCDC, em sílica gel F₂₅₄, clorofórmio: metanol: água (60:35:5) 1 - Extrato Aquoso de folha, 2 - Fração hexânica; 3 - Fração diclorometano; 4 - Fração acetato de etila; 5 - Fração *n*-butanol; 6- Fração Aquosa; 7-Extrato etanólico de folha, 8 - Fração hexânica; 9- Fração diclorometano; 10 - Fração acetato de etila; 11 - Fração *n*-butanol; 12 - Fração Aquosa; 13-Quercetina, 14-Rutina, 15-Ácido cafeico, 16-Ácido clorogênico, 17-Ácido ferúlico, 18-Ácido vanílico, 19-Vitexina. Revelador NP-PEG e visualizado 366nm.



Figura 11B Perfil cromatográfico (CCDC, em sílica gel F₂₅₄, clorofórmio: metanol: água (60:35:5) 1 - Extrato Aquoso de Colmo, 2 - Fração hexânica, 3 - Fração diclorometano, 4 - Fração acetato de etila, 5 - Fração n-butanólica, 6- Fração Aquosa, 7- Extrato etanólico de Colmo, 8 - Fração hexânica, 9- Fração diclorometano 10 - Fração acetato de etila, 11 - Fração n-butanólica 12 - Fração Aquosa, 13- Quercetina, 14- Rutina, 15- Ácido cafeico, 16- Ácido clorogênico, 17- Ácido ferúlico, 18- Ácido vanílico, 19- Vitexina. Revelador NP-PEG e visualizado 366nm.



Figura 12A - Perfil cromatográfico de extratos e frações de folhas de *M. riedeliana* (CCDC, em sílica gel F₂₅₄, clorofórmio: metanol: água (60:35:5) 1- Extrato Aquoso de folha, 2- Fração hexânica, 3- Fração diclorometano, 4- Fração acetato de etila extrato, 5- Fração n-butanólica, 6- Fração Aquosa extrato, 7- Extrato etanólico de folha, 8- Fração hexânica, 9- Fração diclorometano, 10- Fração acetato de etila, 11- Fração n-butanólica, 12- Fração Aquosa, 13- Quercetina, 14- Rutina, 15- Ácido cafeico, 16- Ácido clorogênico, 17- Ácido ferúlico, 18- Ácido vanílico; 19- Vitexina. Revelado com solução NP-PEG e visualizados sob 366nm.

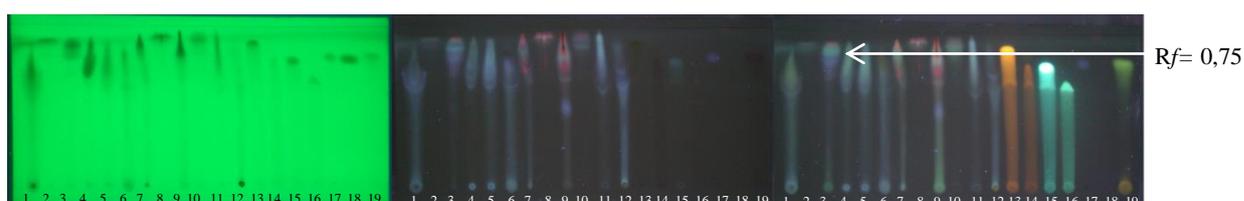


Figura 12B - Perfil cromatográfico de colmos de *M. riedeliana* (CCDC, em sílica gel F₂₅₄, clorofórmio: metanol: água (60:35:5) 1- Extrato Aquoso de Colmo, 2- Fração hexânica, 3- Fração diclorometano, 4- Fração acetato de etila, 5- Fração n-butanólica, 6- Fração Aquosa extrato, 7- Extrato etanólico de Colmo, 8- Fração hexânica, 9- Fração diclorometano, 10- Fração acetato de etila, 11- Fração n-butanólica, 12- Fração Aquosa extrato, 13- Quercetina, 14- Rutina, 15- Ácido cafeico, 16- Ácido clorogênico, 17- Ácido ferúlico, 18- Ácido vanílico; 19- Vitexina. Revelado com solução NP-PEG e visualizados sob 366nm.

As manchas de tonalidade laranja e amarelo indicam a presença de compostos fenólicos e flavonoides nas frações acetato de etila, diclorometano e *n*-butanol de folhas

e colmos de *A. simplex* e *M. riedeliana*. O valor de R_f (0,75 a 0,81) próximo ao do padrão quercitina sugere a existência de compostos fenólicos e flavonóides descritos como envolvidos em atividade antioxidante (Park & John 2010).

Quantificação dos compostos fenólicos totais

A quantificação de fenólicos totais foi realizada para os extratos brutos e frações de folhas e colmos *M. riedeliana* de acordo com o item (3.4), empregando o método de Folin-Ciocalteu. O ácido gálico foi utilizado para a construção da curva de calibração (Figura 13). Os resultados são expressos em EAG (equivalentes de ácido gálico).

Os resultados obtidos indicam uma maior quantidade relativa de fenólicos totais no extrato bruto nas frações diclorometano e acetato de colmos, seguida das frações acetato de etila e diclorometano de folhas (Tabela 4).

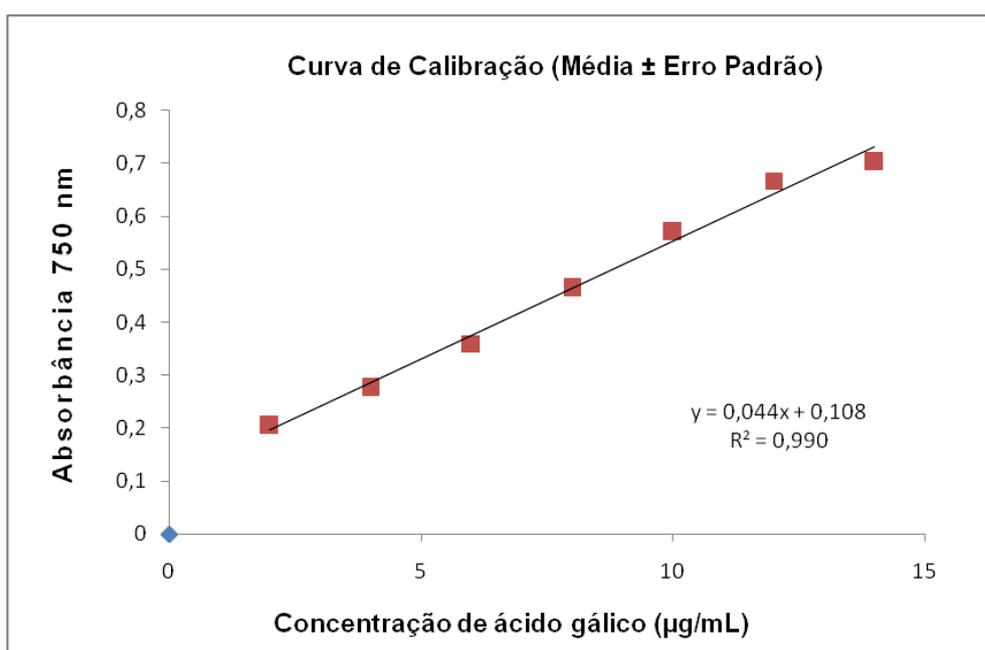


Figura 13. Curva de calibração do ácido gálico utilizado para a determinação da concentração de substâncias fenólicas nos extratos brutos das folhas e colmos e as frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanólica de *M. riedeliana*.

Tabela 4. Quantificação de substâncias fenólicas de *M. riedeliana* utilizando a metodologia de Folin-Ciocalteu. Os resultados estão expressos como média seguida do erro padrão.

| Amostras | Fenólicos totais ($\mu\text{g EAG}^*/\text{mg}$) |
|-----------------------------------|--|
| Folhas Aquosa | |
| Extrato bruto | 53,4 \pm 1,58 |
| Fração diclorometano | 98,3 \pm 2,33 |
| Fração acetato de etila | 102,7 \pm 1,92 |
| Fração <i>n</i>-butanólica | 69,5 \pm 2,99 |
| Colmos Aquoso | |
| Extrato bruto | 126,1 \pm 5,63 |
| Fração diclorometano | 114,2 \pm 1,27 |
| Fração acetato de etila | 105,2 \pm 2,39 |
| Fração <i>n</i>-butanólica | 87,7 \pm 0,88 |

*EAG = equivalentes de ácido gálico

Comparativamente os resultados encontrados para *A. simplex* são similares sendo que a maior quantidade relativa de fenólicos totais forma encontradas no extrato bruto e nas frações acetato de etila e clorofórmica de colmos (117,0 \pm 1,16 e 103,9 \pm 2,10 mg EAG/g) e nas frações clorofórmica e acetato de etila de folhas (108,0 \pm 2,37 e 100,5 \pm 1,90 $\mu\text{g EAG}/\text{mg}$) e nas mesmas frações de colmos (117,0 \pm 1,16 e 103,9 \pm 2,10 mg EAG/g) são muito próximas (Issa 2015).

O conteúdo de fenólicos totais encontrados em extratos aquosos e metanólicos de folhas *Sasa senanensis*, um bambu japonês, foram inferiores aos encontrados para ambas as nativas estudadas (respectivamente de 56,6 mg EAG/g e 93,8 mg EAG/g). (Khatun et al. 2013)

4.4 Quantificação dos flavonóides totais

Para a quantificação de flavonóides foi realizada para os extratos brutos e frações de folhas e colmos *M. riedelina* de acordo com o item (3.5), empregando o método de AlCl_3 quercetina como padrão externo para a construção da curva de calibração (Figura 14). Os resultados foram expressos como equivalentes de quercetina ($\mu\text{g}/\text{por miligrama de amostra}$) (Tabela 5).

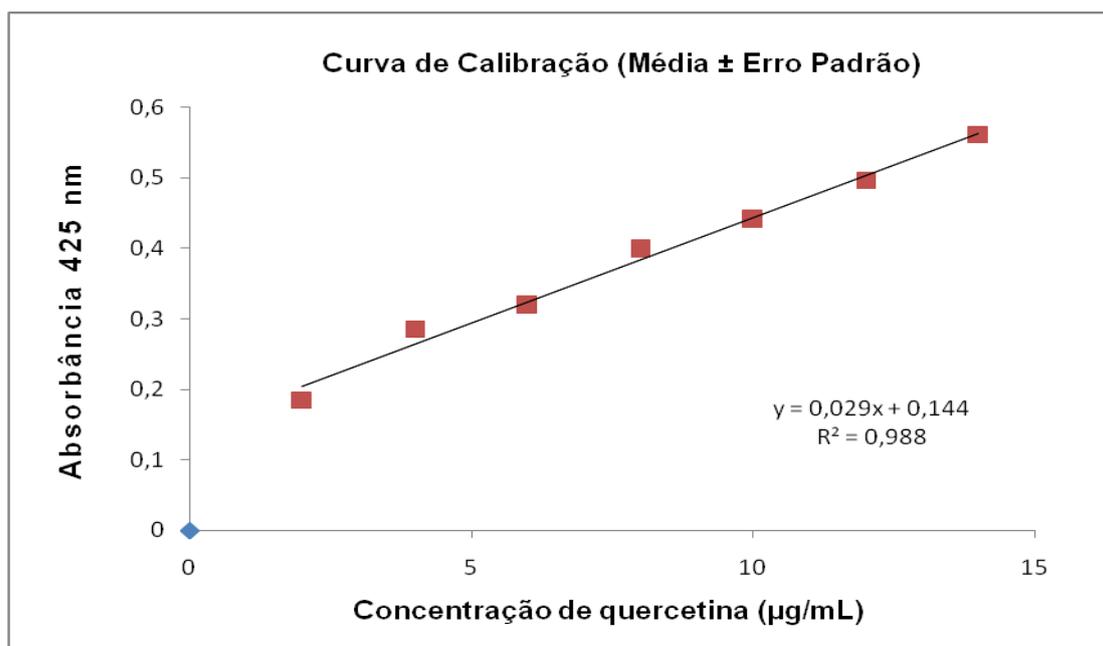


Figura 14. Curva de calibração do padrão externo quercetina, utilizada para a quantificação de flavonóides totais contidos nos extratos brutos das folhas e colmos e as frações clorofórmica, acetato de etila e *n*-butanólica de *M. riedeliana*.

Tabela 5. Quantificação de flavonóides totais de *M. riedeliana* foi realizada utilizando cloreto de alumínio como agente complexante. Os resultados de flavonóides totais e porcentagem estão expressos como média seguida do seu erro padrão.

| Amostras | Flavonóides totais (µg de quercetina/mg) |
|-----------------------------|---|
| Folhas Aquosa | |
| Extrato bruto | 8,68±0,44 |
| Fração diclorometano | 14,53±0,49 |
| Fração acetato de etila | 23,43±0,91 |
| Fração <i>n</i> -butanólica | 19,87±0,41 |
| Colmos Aquoso | |
| Extrato bruto | 3,29±0,31 |
| Fração diclorometano | 5,99±0,15 |
| Fração acetato de etila | 4,41±0,13 |
| Fração <i>n</i> -butanólica | 3,77±0,27 |

Os resultados obtidos indicam uma maior quantidade relativa de flavonóides totais no extrato bruto e nas frações acetato e *n*-butanol de folhas de *M. riedeliana*. (Tabela 5). Comparativamente, a maior quantidade relativa de flavonóides de *A. simplex* foi encontrada nas mesmas frações de folhas (Issa 2015).

Os teores de flavonoides totais em derivados vegetais dependem do processo de extração e suas variáveis, como o solvente utilizado (Guo et al. 2013). O conteúdo de fenólicos totais encontrados em extratos aquosos e metanólicos de folhas *Sasa senanensis*, um bambu japonês, foram inferiores aos encontrados para ambas as nativas estudadas (respectivamente de 11,80 µg de quercetina/mg e 18,46 µg de quercetina/mg) (Khatun et al. 2013).

4.5 Eficácia fotoprotetora *in vitro*: determinação do valor de proteção solar estimado (FPS) e proteção frente à radiação UV de extratos e frações de *M. riedeliana*

Os dados referentes à eficácia fotoprotetora estimada *in vitro* são apresentados na (Tabela 6 e 7).

Tabela 6. Caracterização fotoprotetora *in vitro* das frações de *M. riedeliana* antes e após irradiação UV artificial

| Formulação (Composição) | Irradiação | Fator de Proteção Solar | Valor de <i>p</i> | Comprimento de onda crítico (nm) | Valor de <i>p</i> |
|--------------------------------|------------|-------------------------|-------------------|----------------------------------|-------------------|
| F1 (Gel) | NI | N.A. | N.A. | N.A. | N.A. |
| | IR | N.A. | | | |
| F2 (Filtros) | NI | 30 ± 4,9 | 0,5623 | 377,1 ± 0,3 | 0,9883 |
| | IR | 27,4 ± 5,5 | | 377,4 ± 0,5 | |
| F3 (FAqD+filtro) | NI | 66,9 ± 12,1 | 0,0002 | 374,5 ± 0,5 | 0,0001 |
| | IR | 43,3 ± 7,4 | | 371,5 ± 1,2 | |
| F4 (FAqAc + filtro) | NI | 51,2 ± 10,5 | 0,0008 | 374,9 ± 1,0 | 0,0001 |
| | IR | 33,3 ± 7,8 | | 370,3 ± 1,8 | |
| F5 (FAqn-But+filtro) | NI | 36,7 ± 7,1 | 0,3806 | 375,5 ± 0,5 | 0,9221 |
| | IR | 47,3 ± 12,4 | | 370 ± 1,4 | |
| F6 (FEtD+filtro) | NI | 62,5 ± 9,2 | 0,004 | 373,2 ± 0,6 | 0,9574 |
| | IR | 47,3 ± 16,7 | | 370 ± 1,4 | |
| F7 (FEtAc+filtro) | NI | 58,7 ± 21 | 0,9879 | 374,2 ± 0,8 | 0,9678 |
| | IR | 51,7 ± 13,7 | | 371,6 ± 1,2 | |
| F8 (FEtn-But+filtro) | NI | 94,4 ± 11,7 | 0,0001 | 375,3 ± 0,5 | 0,9135 |
| | IR | 44,7 ± 0,6 | | 369,2 ± 0,4 | |

Legenda: **FAqD:** fração diclorometano do extrato aquoso; **FAqAc:** fração acetato de etila do extrato aquosos; **FAqn-but:** fração n-butanol do extrato aquosos; **FEtD:** fração diclorometano do extrato etanólico; **FEtAc:** fração acetato de etila do extrato etanólico; **FEtn-but:** fração n-butanólica do extrato etanólico; **OT** = octil triazona; **BT** = bemotrizinol; **NI** = amostra pré-irradiação; **IR** = amostra pós-irradiação; **N.A.** = não aplicável. Resultados expressos como média ± desvio padrão. Valores de *p* < 0,05 (em vermelho) representam diferenças estatisticamente significativas entre as amostras irradiadas e não irradiadas. Os resultados foram avaliados de acordo com o teste *t* de Student pareado (nível de significância = 0,05).

Tabela 7. Caracterização fotoprotetora *in vitro* das frações de *A.simplex* antes e após irradiação UV artificial

| Formulação (Composição) | Irradiação | Fator de Proteção Solar | Valor de <i>p</i> | Comprimento de onda crítico (nm) | Valor de <i>p</i> |
|--------------------------------|------------|----------------------------|-------------------|-------------------------------------|-------------------|
| F1 (Gel) | NI | N.A. | N.A. | N.A. | N.A. |
| | IR | N.A. | | | |
| F2 (Filtros) | NI | 28 ± 4,5 | 0,5231 | 382,6 ± 0,2 | 0,9675 |
| | IR | 26,3 ± 4,9 | | 368±0,4 | |
| F3 (FAqD+filtro) | NI | 10,1±6,9 | 0,0009 | 376,3±0,8 | 0,9391 |
| | IR | 7,3±5,6 | | 369,3±1,0 | |
| F4 (FAqAc + filtro) | NI | 64,4±11,3 | 0,0005 | 384,6±1,2 | 0,0001 |
| | IR | 35,3±9,8 | | 377±1,4 | |
| F5 (FAqn-But+filtro) | NI | 10,2±7,1 | 0,4526 | 382,5±0,5 | 0,9589 |
| | IR | 8,3±10,5 | | 379,6±0,8 | |
| F6 (FEtD+filtro) | NI | 97,5±11,5 | 0,0002 | 376,6±0,9 | 0,9782 |
| | IR | 42,7±13,2 | | 375±1,1 | |
| F7 (FEtAc+filtro) | NI | 72,9±14,3 | 0,0010 | 385,3±1,5 | 0,9772 |
| | IR | 41,4±12,2 | | 380±1,1 | |
| F8 (FEtn-But+filtro) | NI | 12,5±5,8 | 0,9383 | 380±0,9 | 0,9460 |
| | IR | 9,3±4,9 | | 376±0,6 | |

Legenda: **FAqD:** fração diclorometano do extrato aquoso; **FAqAc:** fração acetato de etila do extrato aquosos; **FAqn-but:** fração n-butanol do extrato aquosos; **FEtD:** fração diclorometano do extrato etanólico; **FEtAc:** fração acetato de etila do extrato etanólico; **FEtn-but:** fração n-butanólica do extrato etanólico; **OT** = octil triazona; **BT** = bemotrizinol; **NI** = amostra pré-irradiação; **IR** = amostra pós-irradiação; **N.A.** = não aplicável. Resultados expressos como média ± desvio padrão. Valores de *p* < 0,05 (em vermelho) representam diferenças estatisticamente significativas entre as amostras irradiadas e não irradiadas. Os resultados foram avaliados de acordo com o teste *t* de Student pareado (nível de significância = 0,05).

Os filtros isolados foram considerados fotoestáveis em função da manutenção do valor do FPS *in vitro* e do comprimento de onda crítico. As formulações contendo os filtros solares: avobenzona, octil dimetil Paba e metoxicinamato de octila associadas com as frações diclorometano, acetato de etila do extrato aquosos/etanólico de folha e a *n*-butanol do extrato etanólico de folhas apresentaram os maiores valores de FPS *in vitro*. A formulação 3 (diclorometano) de *M.riedelina* e a formulação 6(diclorometano) de *A.simplex*, após irradiação apresentou redução do FPS *in vitro*. Entretanto demonstrou ser superior a F2 evidenciando o potencial do extrato em atuar sinergicamente com os filtros UV. Embora tenha se constatado redução do valor do comprimento de onda crítico, este ainda é considerado de amplo espectro por estar acima de 370 nm, ademais do FPS *in vitro* ser superior a 30. A formulação 4 (acetato de etila) de *M.riedeliana* e a formulação 7 (acetato de etila) de *A.simplex* apresentaram resultados semelhante à F3 e F6 respectivamente, com resposta anti-UVB inferior, no entanto, aparentemente de maior magnitude quando esta se compara com F2. Este extrato obteve perfil fotoestável quanto ao comprimento de onda crítico.

As formulações que apresentaram maior atividade fotoprotetora *in vitro* (F3, F4 e F6, F7) são as mesmas que apresentaram no ensaio *in vitro* (CCD e microplapa) a maior atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) - frações diclorometano e acetato de etila. As mesmas frações são as que também obtiveram a maior quantidade relativa de flavonóides totais além conterem a presença de ácido ferúlico, descrito um antioxidante de eficácia comprovada (Alias et al. 2009; Zhang et al. 2010; Chen et al. 2012) .

Fenólicos e derivados podem ser eficientes substâncias para proteger a pele contra danos provocados pela radiação UV (Saija et al. 2000; Zhang et al. 2010). Embora alguns produtos denominados "alimentos funcionais", como o chá verde e o chocolate, contenham altos níveis de polifenóis com atividade antioxidante, tais moléculas são instáveis em sistemas biológicos e, portanto, permanecem por pouco tempo no organismo (Chen et al. 2012). Segundo estes autores, formulações tópicas com estabilização dos polifenóis têm sido propostas para reduzir a suscetibilidade da oxidação.

Ensaio desenvolvidos por Ramos e colaboradores (1996), com extratos brutos de *Hamamelis virginiana* L., *Matricaria recutita* L., *Aesculus hippocastanum* L., *Rhamnus prushiana* DC. e *Cinnamomum zeylanicum* Blume, que continham em sua composição química, substâncias como flavonoides, taninos e antraquinonas, quando

incorporados a uma formulação contendo 2% de metoxicinamato de octila, levaram a um aumento no fator de proteção solar (FPS), sugerindo potencialização.

Souza e colaboradores (2005) estudaram os extratos das flores e folhas da *Achillea millefolium*, planta que apresenta flavonóides em sua composição, mas não foram efetivos para o preparo de um produto fotoprotetor. Nascimento e colaboradores (2009) avaliaram *in vitro* a capacidade de incremento da atividade fotoprotetora em formulação comercial, de dois tipos diferentes de própolis, ambas ricas em substâncias fenólicas do tipo flavonoides. Os resultados sugerem sinergismo, indicando que os extratos poderiam ser utilizados para aumento do efeito fotoprotetor das formulações.

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que os flavonóides inibem enzimas que estão envolvidas na produção de EROs (Espécies reativas de oxigênio), atuam como agentes quelantes contra metais envolvidos no metabolismo do oxigênio que aumenta a produção de EROs e são capazes de reduzir os radicais livres gerados por meio da doação de elétrons a estes radicais (Souza, Campos, Packer, 2013; Cavalcanti et al., 2007), combatendo o fotoenvelhecimento.

A presença de flavonóides está associada à ação antieritematosa, que favorece a diminuição do eritema presente em peles sensíveis; esses produtos podem vir com o apelo de calmante e antiirritante e sua ação no processo de inflamação (Balogh, 2011). Neste caso, os flavonóides presentes nas frações que apresentaram atividade fotoprotetora poderiam também atuar na atividade antieritematosa o que caracteriza os bambus como produtos multifuncionais.

4.6 Análises

Análise Cromatográfica UHPLC – DAD

As frações extrato aquoso de *A. simplex* foram analisadas empregando cromatografia líquida de ultra-alta eficiência com detector de arranjo de diodos (UHPLC–DAD). O perfil cromatográfico das frações foi comparado com os tempos de retenção e espectros no UV de uma mistura de padrões de ácidos fenólicos e flavonas (Figura 15). Com base nos resultados, foi possível observar que os picos que eluíram entre 1-16 minutos mostraram espectro no UV característico de ácidos benzoicos (λ_{max} 261/292(*sh*)), ligeiramente diferente do perfil dos derivados de ácidos hidroxicinâmicos como o ácido clorogênico (9 minutos, λ_{max} 325 nm), confirmando que o ácido

clorogênico não está presente nos extratos analisados. Entretanto, os picos entre 18-25 minutos mostraram perfil espectral similar aos dos padrões de flavonas (λ_{max} 347/270, luteolina 6-*C*-glicosídeo), confirmando a presença de derivados de flavonas nos extratos, principalmente na fração *n*-butanólica.

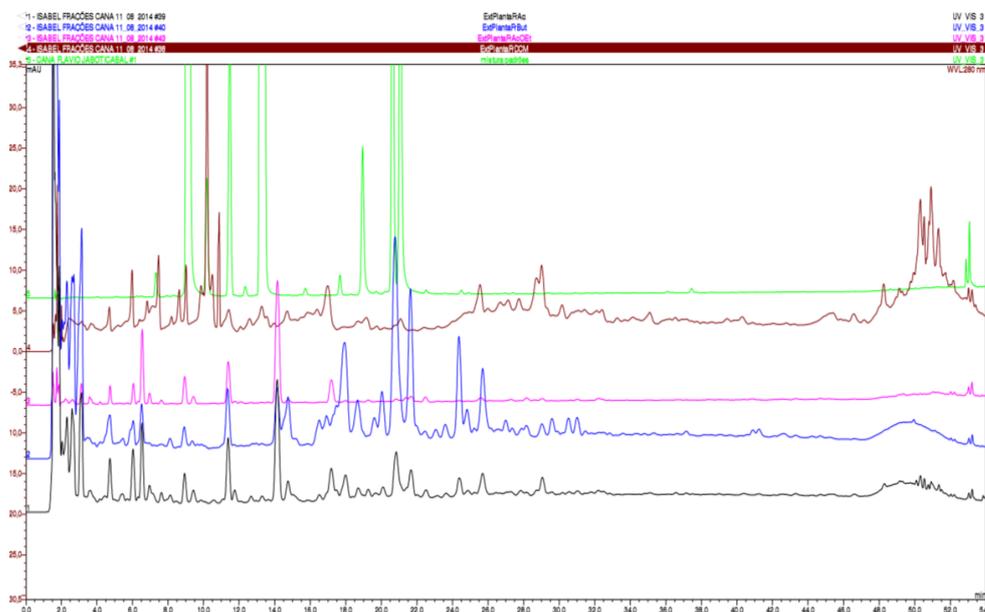


Figura 15. Perfis cromatográficos das diferentes frações de folhas de *A. simplex* em 280 nm. (1) mistura dos padrões: ácido *trans*-3-cafeoilquinico (9 minutos); ácido cafeico (9,8 minutos); ácido *p*-cumárico (13,2 minutos); luteolina 8-*C*-glicosídeo (18,8 minutos); luteolina 6-*C*-glicosídeo (20,6 minutos); apigenina 8-*C*-glicosídeo (21 minutos); (2) fração diclorometano, (3) fração acetato de etila, (4) fração *n*-butanol e (5) fração aquosa.

Análise LC-DAD / ESI / MS / MS de *M. riedeliana*

Tabela 8. Compostos identificados do extrato aquoso de folha e da fração acetato de etila de folha de *M. riedeliana* analisadas em LC-DAD / ESI / MS / MS

| Pico | Compostos | R _t (min) | Formula | m/z* | Referência |
|------|--|----------------------|---|------|--|
| 1 | Lactonica dímero de ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico ^a | 2.7 | C ₁₄ H ₈ O ₅ | 257 | Biblioteca |
| 2 | Luteolina C-hexose O-deoxihexose ^{a,b} | 4.6 | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ | 595 | Wojakowska et al. 2013; Ferreres et al. 2007 |
| 3 | Luteolina C-pentose C- hexosideo ^a | 4.7 | C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅ | 581 | Figueirinha et al. 2008 |
| 4 | Apigenina O-pentose C-hexosideo (C-8) ^{a,c} | 5.2 | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ | 595 | Figueirinha et al. 2008 |
| 5 | Apigenina C- hexose O-pentosideo ^{a,c} | 5.3 | C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄ | 565 | Figueirinha et al. 2008 |
| 6 | Apigenina C-pentose C-hexosideo (C-6) ^{a,b} | 5.7 | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ | 595 | Wojakowska et al. 2013; Ferreres et al. 2007 |
| 7 | Luteolina-6-C-glicosídeo ^{a,b} | 6.5 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ | 449 | Wojakowska et al. 2013; Ferreres et al. 2007 |
| 8 | Apigenina-6-C-glicosídeo ^{a,b} | 6.9 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ | 433 | Wojakowska et al. 2013; Ferreres et al. 2007 |
| 9 | Ácido 3,4-metilenodioximandelico ^a | 8.0 | C ₉ H ₈ O ₅ | 197 | Biblioteca |
| 10 | Trimetil quercetina éter 7-O hexosideo ^{a,b} | 11.6 | C ₂₄ H ₂₆ O ₁₂ | 507 | Wojakowska et al. 2013; Ferreres et al. 2007 |

* m/z m Daltons baseado no cromatograma de ions totais (TIC), utilizando LC-ESI / MS em modo positivo.

^a Primeiro ion [M+H]⁺ utilizado para determinar a formula molecular.

^b Compostos reportado por Ferreres et al. 2007 e Wojakowska et al. 2013.

^c A posição da O-pentose não foi determinada

Análise do extrato bruto e frações de *A.simplex* e *M.riedeliana* em GC-MS

Os dados dos compostos detectados são em GC-MS são apresentadas na **Tabela 9** (*A. simplex*) e na **Tabela 10** (*M. riedeliana*).

Tabela 9. Indetificação dos compostos no extrato aquoso (EA), fração acetato de etila (Ac Et) e fração n-butanol (*n*-But) de folhas de *A. simplex* em GC-MS.

| Pico | Composto * | R _t (min) | | | Formula | Indentificado por | MW** |
|------|----------------------------------|----------------------|-------|------------------|---|-------------------|------|
| | | EA | Fr Ac | Fr <i>n</i> -But | | | |
| 1 | Glicerol | 15.2 | 15.2 | 15.2 | C ₁₂ H ₃₂ O ₃ Si ₃ | Biblioteca NIST | 308 |
| 2 | Ácido acetil salicílico | nd | 16.84 | nd | C ₁₂ H ₁₆ O ₄ Si | Biblioteca NIST | 252 |
| 3 | Ácido Málico | 20.94 | 20.91 | 20.9 | C ₁₃ H ₃₀ O ₅ Si ₃ | Biblioteca NIST | 350 |
| 4 | Ácido p-hidroxi-benzoico | 23.04 | nd | nd | C ₁₃ H ₂₂ O ₃ Si ₂ | Padrão | 282 |
| 5 | Ácido vanílico | nd | 26.90 | nd | C ₁₄ H ₂₄ O ₄ Si ₂ | Padrão | 312 |
| 6 | Ácido Eritronico | 27.49 | nd | nd | C ₁₆ H ₄₀ O ₅ Si ₄ | Biblioteca NIST | |
| 7 | Ácido protocatequico | nd | 28.15 | nd | C ₁₆ H ₃₀ O ₄ Si ₃ | Biblioteca NIST | 370 |
| 8 | Àcido chiquimico | nd | 28.26 | nd | C ₁₉ H ₄₂ O ₅ Si ₄ | Padrão | 462 |
| 9 | Fructose | 28.48 | 28.48 | 28.3 | C ₂₁ H ₅₂ O ₆ Si ₅ | Biblioteca NIST | |
| 10 | Galactofuranose | 29.16 | 29.16 | 29.16 | C ₂₁ H ₅₂ O ₆ Si ₅ | Biblioteca NIST | 540 |
| 11 | β-D-Glucopiranosese ^a | 30.08 | nd | 30.09 | C ₂₁ H ₅₂ O ₆ Si ₅ | Biblioteca NIST | 540 |
| 12 | D-Galactopiranosose | 30.27 | 30.27 | 30.27 | C ₂₂ H ₅₅ NO ₆ Si ₅ | Biblioteca NIST | 569 |
| 13 | D-Glucose ^a | 31.92 | 31.9 | 31.87 | C ₂₁ H ₅₂ O ₆ Si ₅ | Biblioteca NIST | 540 |
| 14 | Acido vanil mandélico | nd | 32.25 | nd | C ₁₈ H ₃₄ O ₅ Si ₃ | Biblioteca NIST | 414 |

| | | | | | | | |
|-----------|---|-------|--------------------|-------|-----------------------|-----------------|-----|
| 15 | 2,6-dihidroxi metil benzoato | nd | nd | 32.3 | $C_{14}H_{24}O_4Si_2$ | Biblioteca NIST | 312 |
| 16 | Ácido Ferulico | nd | 33.29 ^b | nd | $C_{16}H_{26}O_4Si_2$ | Padrão | 338 |
| 17 | Ácido 2-Metil-2(p-metoxico) mandelico | nd | 33.48 | nd | $C_{16}H_{28}O_4Si_2$ | Biblioteca NIST | 340 |
| 18 | Myo-Inositol | nd | 33.73 | 33.73 | $C_{24}H_{60}O_6Si_6$ | Biblioteca NIST | 612 |
| 19 | Àcido siringico | nd | 35.49 ^b | nd | $C_{15}H_{26}O_5Si_2$ | Padrão | 342 |
| 20 | Àcido Octadecanoico | 35.81 | 35.82 | nd | $C_{21}H_{44}O_2Si$ | Biblioteca NIST | 356 |
| 21 | Glicose ^a | nd | 36.39 | nd | $C_{21}H_{52}O_6Si_5$ | Biblioteca NIST | 540 |
| 22 | Esterilico do ácido 2-hidroximandelico | nd | 36.95 | nd | $C_{16}H_{28}O_4Si_2$ | Biblioteca NIST | 340 |
| 23 | Ácido vanil mandélico | nd | 41.84 | nd | $C_{18}H_{34}O_5Si_3$ | Biblioteca NIST | 414 |
| 24 | Hidroquinona-β-d-glucopiranosideo | nd | 42.00 | nd | $C_{27}H_{56}O_7Si_5$ | Biblioteca NIST | 632 |
| 25 | Estra-1,3,5(10)-trien-17-one, 2,3,4-trihidroxil | nd | 42.48 | nd | $C_{27}H_{46}O_4Si_3$ | Biblioteca NIST | 518 |

*Ácidos fenólicos foram identificados da derivatização com BSTFA/TMS. Índice de retenção (RI) foi utilizado da biblioteca NIST.

**MW = Peso Molecular

Tabela 10. Indetificação dos compostos na fração acetato de etila do extrato de folha de *M. riedeliana* analisadas em GC-MS.

| Pico | Composto * | R _f (min) | Formula | Indetificado por | MW** |
|------|---------------------------------------|----------------------|--|------------------|------|
| 1 | Ácido benzoico | 16.8 | C ₁₀ H ₁₄ O ₂ Si | Padrão | 194 |
| 2 | Ácido fenilacético | 18.5 | C ₁₁ H ₁₆ O ₂ Si | Biblioteca NIST | 208 |
| 3 | Ácido salicílico | 23.73 | C ₁₃ H ₂₂ O ₃ Si ₂ | Biblioteca NIST | 282 |
| 4 | Ácido 4-hidroxibenzoico | 26.5 | C ₁₃ H ₂₂ O ₃ Si ₂ | Padrão | 282 |
| 5 | Ácido 4-hidroxifenilacético | 26.9 | C ₁₄ H ₂₄ O ₃ Si ₂ | Biblioteca NIST | 296 |
| 6 | Ácido vanílico [§] | 29.7 | C ₁₄ H ₂₄ O ₄ Si | Padrão | 312 |
| 7 | Ácido <i>p</i> -Cumarico [§] | 30.3 | C ₁₅ H ₂₄ O ₃ Si ₂ | Padrão | 308 |
| 8 | Ácido protocateico | 30.4 | C ₁₆ H ₃₀ O ₄ Si | Biblioteca NIST | 370 |
| 8 | Ácido siríngico [§] | 32.7 | C ₁₅ H ₂₆ O ₅ Si ₂ | Padrão | 342 |
| 9 | Ácido gálico [§] | 32.8 | C ₁₉ H ₃₈ O ₅ Si ₄ | Padrão | 458 |
| 10 | Ácido <i>m</i> -Cumarico | 33.4 | C ₁₅ H ₂₄ O ₃ Si ₂ | Biblioteca NIST | 308 |
| 11 | Ácido vanil mandélico | 33.59 | C ₁₈ H ₃₄ O ₅ Si ₃ | Biblioteca NIST | 414 |
| 12 | Ácido 4-Metil mandelico | 34.06 | C ₁₅ H ₂₆ O ₃ Si ₂ | Biblioteca NIST | 310 |
| 13 | Ácido 3,4-metilenodioximandelico | 36.26 | C ₁₅ H ₂₄ O ₅ Si ₂ | Biblioteca NIST | 340 |
| 14 | Ácido <i>trans</i> -ferulico | 36.3 | C ₁₆ H ₂₆ O ₄ Si ₂ | Padrão | 338 |

*Ácidos fenólicos foram identificados da derivatização com BSTFA/TMS. Índice de retenção (RI) foi utilizado da biblioteca NIST.

**MW = Peso Molecular

A fração acetato de etila a mais ativa no ensaio de DPPH, foi analisada por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas e ionização por impacto eletrônico (GC-MS). Baseado no perfil do GC-MS foram identificados a presença do ácido benzóico, do ácido benzenoacético, ácido salicílico, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido *p*-hidroxifenilacético, v ácido anílico, *p*-cumárico, ácido protocateico, ácido siríngico, ácido gálico, ácido *m*-vanilmandélico cumárico, ácido 4-metil mandélico, ácido mandélico, o ácido *trans*-ferúlico e o ácido 3,4-metilenodioximandélico.

Folhas, ramos e brotos de bambus como *Phyllostachys pubescens*, *P. nigra*, *Dendrocalamus latifolius*, *Dendrocalamopsis oldhami*, *Sasa senanensis*, (Luo & Chen 2003; Lu & Liao 2003; Zhang et al. 2005, Park & John 2010, Lv et al. 2012; Khatun et al. 2013; Liu et al. 2016) são caracterizadas por serem ricas em ácido fenólicos e flavonóides. Um dos principais componentes funcionais de extratos de folhas de bambu são os flavonóides como as flavonas C-glicosiladas incluindo a orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina (Liu et al. 2016). A presença destes compostos estão associadas aos inúmeros efeitos biológicos e aos possíveis usos do bambu como alimento funcional (Park & John 2010) e suplemento farmacêutico para tratamento de doenças degenerativas associadas ao estresse oxidativo, como as doenças cardiovasculares e o câncer (Serafini 2006), além do uso dietético e cosmético (Zhang & Ding 1996a; 1996b; Tang et al. 1998; Lu & Liao 2003; Lu et al. 2002; 2005; Zhang et al. 2004; 2008).

Análise dos óleos voláteis

Os óleos voláteis extraído de folhas (320 g) de *A. simplex* (0,07%) e *M. riedeliana* (0,09%) foram analisados por GC-MS e os compostos identificados com base na biblioteca Adams 2007 são apresentados nas tabelas 10 e 11.

Tabela 11. Compostos voláteis encontrados na folha de *A. simplex* e identificados por GC-MS.

| Composto | IK | IK Ref. | <i>A. simplex</i> (%) |
|------------------------------|------|---------|--------------------------|
| δ-elemeno | 1313 | 1338 | 1,52 |
| (E)-β-damascenona | 1358 | 1364 | 4,83 |
| β-elemeno | 1368 | 1390 | 1,64 |
| (E)-α-ionona | 1398 | 1430 | 10,77 |
| α-amorpheno | 1451 | 1484 | 1,50 |
| (E)-β-ionona | 1455 | 1488 | 20,48 |
| α-muuroleno | 1474 | 1500 | 4,64 |
| γ-cadineno | 1487 | 1513 | 3,98 |
| δ-cadineno | 1492 | 1523 | 2,90 |
| cis-calameneno | 1495 | 1529 | 4,35 |
| α-bisabolol | 1659 | 1685 | 2,17 |
| 7,14-anidro-amorfa-4,9-dieno | 1738 | 1756 | 2,06 |
| Total identificado (%) | | | 60,84 |

Tabela 12. Compostos voláteis encontrados na folha de *M. riedeliana* identificados por GC-MS.

| Composto | IK | IK Ref. | <i>M.</i> <i>riedeliana</i> (%) |
|----------------------|------|---------|---------------------------------------|
| (E)-2-Hexanal | 847 | 855 | 1,35 |
| (Z)3-Hexanol | 850 | 859 | 4,05 |
| 1-Hexanol | 866 | 870 | 4,29 |
| Linalol | 1089 | 1096 | 4,70 |
| 1-Nonanol | 1092 | 1100 | 3,53 |
| 2-Propanil fenol | 1148 | 1150 | 1,31 |
| Salicilato de metila | 1181 | 1190 | 13,62 |
| β-Ciclocitral | 1209 | 1219 | 1,12 |
| Geraniol | 1245 | 1252 | 0,94 |
| (E)-β-damascenona | 1375 | 1384 | 4,36 |
| β-Damascone | 1380 | 1387 | 0,63 |

| | | | |
|--------------------------|------|------|-------|
| (E)- α -Ionona | 1419 | 1430 | 5,83 |
| (E)- β -ionona | 1475 | 1488 | 9,49 |
| (Z)3-Hexenil benzoato | 1556 | 1566 | 2,44 |
| (Z)-3-Hexenil salicilato | 1660 | 1669 | 1,04 |
| Ácido linoleico | 2126 | 2132 | 0,67 |
| Hexacosano | 2494 | 2600 | 0,70 |
| Heptacosano | 2692 | 2700 | 0,67 |
| Total identificado (%) | | | 45,73 |

Ao todo foram detectados 11 constituintes com área de pico superior a 0,5%, para *A. simplex* e 17 constituintes para *M. riedeliana* sendo que apenas 4 destes foram comuns a ambas espécies. Os compostos detectados com maior abundância relativa foram α -Ionona (10,77%) e β -Ionona (20,48%) em *A. simplex*, Salicilato de metila (13,62%), α -Ionona(5,83%) e β -Ionona(9,49%) em *M. riedeliana*.

(E)- β -ionona presente nas duas espécies tem demonstrado ser utilizada como intermediário na síntese industrial de fragrâncias e da vitamina A, além de funcionar como um aditivo alimentar, realçando o sabor e o aroma de alguns alimentos e bebidas (Ferreira, 2001). Recentemente, a composição química e a atividade antimicrobiana do óleo essencial de folhas de *Phyllostachys heterocycla* cv. *Pubescens*, *Phyllostachys heterocycla* cv. *Gracilis*, *Phyllostachys heterocycla* cv. *Heterocycla* e *Phyllostachys kwangsiensis*, foram estudadas (Jin et al. 2011). Foram identificadas 63 componentes do óleo essencial, sendo o mais abundante *cis*-3 Hexanol para *Pubescens* (27,11%), *Gracilis* (24,62%), *heterocycla* (30,51%) e *kwangsiensis* (34,65%) que apresentaram atividade antioxidante (DPPH) e antimicrobiana contra *Staphylococcus epidermidis* and *E. coli*. (Jin et al. 2011).

No óleo volátil dos colmos de *P. pubescens* foram detectados 89 compostos, representando um total 92,95% do total observado. Sendo que os componentes mais abundantes foram o ácido palmítico (16,5%), (*E*)-nerolidol (10,2%) e indol (8,1%). Desse total, 18 compostos eram os principais responsáveis pelo aroma, os mais intensos foram eugenol e (*E*)-2-nonenal (Takahashi, et al. 2010).

Embora os óleos de muitas espécies apresetam atividades biologicas descrita acima o baixo rendimento não viabiliza a exploração desses fitoconstituintes.

5. Conclusões

Este estudo apresenta evidências de que os bambus nativos (*A. simplex* e *M. riedeliana*), assim como os asiáticos, são fortes candidatos úteis para pesquisas de produtos naturais.

Os resultados obtidos pelo presente estudo sugerem que os fenólicos e flavonoides presentes tanto nas folhas como nos colmos de *A. simplex* e *M. riedeliana*, são os responsáveis pela atividade antioxidante e fotoprotetora, o que qualifica tais espécies como produtos multifuncionais.

Embora a determinação da atividade antioxidante e fotoprotetora *in vitro* apresentaram limitações elas podem ser um bom indicativo de uma potencial fonte de produtos naturais.

6. Referencias bibliográficas

Abdalla, A.E.; Roozen, J.P. 1999. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. *Food Chemistry, Barking*, v. 64, n. 3, p. 323-329.

Adams, R.P. 2007. Identification of essential oil components by gás chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation. Carol Stream. p .804.

Afaq, F.; Adhami, V.M.; Mukhtar H. 2005. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. *Mutat Res.* v.571, p.153-73.

Aguiar, R.M.; Rezende, L.C.; Queiroz, C.A.; Jorge, M.D.; Juceni, P.D. 2009. Relação estrutura atividade antioxidante de quercetina e seus derivados glicosilados. 3ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

Ainsworth, E.A.; Gillespie, K.M. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plants tissues using Folin-Ciocalteau reagent. *Nature Protocols*, v.2, n.4.

Alias, L.M.; Manoharan, S.L.; Vellaichamy, A.; Balakrishnan, S.; Ramachandran, C.R. 2009. Protective effect of ferulic acid on 7,12 dimethylbenz[a]anthracene-induced skin carcinogenesis in Swiss albino mice. *Experimental and Toxicologic Pathology* v.61, p. 205–214.

Almeida, I.F. 2009. Desenvolvimento de sistemas semi-sólidos contendo fitocompostos captadores de espécies reativas. Tese de doutorado, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Antolovich, M.; Prenzler, P.D.; Patsalides, E.; Mcdonald, S.; Robards, K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, v.127, p.183-198.

Arias, L. 2005. Avaliação da atividade antioxidante in vitro de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*). Tese de mestrado em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo, São Paulo – SP.

Armstrong, B.K.; Krickler, A. 2001. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol*, 63:8-18.

Balogh, T.S.; Pedriali, C.A.; Baby, A.R.; Velasco, M.R.V.; Kaneko, T.M. 2011. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, n. 4, p.732-742.

Bamboo Biodiversity. Disponível em <http://www.eeob.iastate.edu/research/bamboo/maps/world-total-woody.gif>. Acesso em: 21 dez. 2015.

Bamboo Phylogeny Group. 2012. An updated tribal and subtribal classification of the bamboos (Poaceae: Bambusoideae). In: *Proceedings of the 9th World Bamboo Congress*, 10–12, Antwerp, Belgium, p. 3–27.

Bansal, A.; Zoolagud, S.S. 2002. Bamboo Composites:Material of the Future, *Journal of Bamboo and Rattan*,1(2), p.119–130.

Bansal, L.S.; Choudhary, S.; Sharma, M.; Kumar, S.S.; Lohan, S.; Bhardwaj, V.; Syan, N.; Jyoti, S. 2013. Tea: An ative source of antimicrobial agents. *Food Research International*, v.53, p. 568–584.

Baron, E.D.; Kirkland, E.B.; Domingo, D.S. 2008. Advances in photoprotection. *Dermatol Nurs*.v.20(4), p.265-73.

Baskin, S.I.; Salem, H. 1997. *Oxidants, Antioxidants, and Free Radicals*. Washington: Taylor & Francis, p.1-21.

Benzie, I.; Wachtel, S. 2011. *Herbal medicine – biomolecular and clinical aspects*. 2nd edition, CRC Press. New York.

Bianchi, M.L.; Antunes, L.M.G. 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*, Campinas, maio/ago.

- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C.** 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity; *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v. 28, p. 25-30.
- Cavalcanti, A.S.S.; Rosa, J.A.B.; Lima, M.S.C.S.; Silva, A.G.** 2007. O uso de chá verde, *Camelliasinensis* L. (*Theaceae*) em produtos tópicos-uma revisão. *Natureza online*, v. 5, n. 2, p. 76-84.
- Caccere, R.; Teixeira, S.P.; Centeno, D.C.; Figueiredo-Ribeiro, R.C. L.; Braga, M.R.** 2013. Metabolic and structural changes during early maturation of *Inga vera* seeds are consistent with the lack of a desiccation phase. *Journal of Plant Physiology*.
- Campanello, P.I.; Gatti, M.G.; Ares, A.; Montti, L.; Goldstein, G.** 2007. Tree regeneration and microclimate in a liana and bamboo-dominated semideciduous Atlantic Forest. *Forest Ecology and Management* v.252, p.108–117.
- Cao, G.; Alessio, H.M.; Culter, R.** 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.*, v.14, p.303-311.
- Chen, L.; Hu, J.Y.; Wang, S.Q.** 2012. The role of antioxidants in photoprotection: a critical review. *J Am Acad Dermatol*, v.67, n. 5, p.1013-1024.
- Chou, C.H.; Hou, M.H.** 1981. Allelopathic researches of subtropical vegetation in Taiwan I. Evaluation of allelopathic potential of bamboo *Phyllostachys edulis* vegetation. *Proceedings of the National Science Council (ROC)*. [S.I.:s.n.], v.5, p.284-292.
- Chou, C.H.; Yang, C.M.** 1982. Allelopathic research of subtropical vegetation in Taiwan. II. Comparative exclusion of understory by *Phyllostachys edulis* and *Cryptomeria japonica*. *Journal of Chemical Ecology*, v.8, n.12, p.1489-1507.
- Chou, C.H.** 2010. Role of allelopathy in sustainable agriculture: use of allelochemicals as naturally occurring bio-agrochemicals. *Allelopathy Journal*. India: International Allelopathy Foundation, v.25, n.1, p.3-16.
- Chow, C.K.** 2001. *Vitamin E*. New York, Marcel Dekker.

Cieśła, L.; Kryszewski, J.; Stochmal, A.; Oleszek, W.; Waksmundzka-Hajnos, M. 2012. Approach to develop a standardized TLC-DPPH test for assessing free radical scavenging properties of selected phenolic compounds J. Pharm. Biomed. Anal., 70, p.126–135.

Clark, L.G. 2001. *Chusquea* In: H.M. Longhi-Wagner, V. Bittrich, M.G.L. Wanderley & G.J. Shepherd (orgs.). *Poaceae-Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*. Editora Hucitec, São Paulo.

Collins, C.H. & Braga, G.L. 1988. Introdução a Métodos Cromatográficos. 3ª ed. Campinas:Editora da UNICAMP.

Cosmetics Europe. 2011. *In vitro* method for the determination of the UVA protection factor and “critical wavelength” values of sunscreen products. Brussels, p.28.

Córdova, A.; Navas, F.J. 2000. Os radicais livres e o dano muscular produzido pelo exercício: papel dos antioxidantes. Rev. Bras. Med. Esporte, Rio de Janeiro, v.6, n.5.

Diffey, B.L.; Tanner, P.R.; Matts, P.J.; Nash, J.F. 2000. *In vitro* assessment of the broad-spectrum ultraviolet protection of sunscreen products. J Am Acad Dermatol, v.43, n.6, p.1024-1035.

D'Oliveira, M.V.N.; De S. Guarino, E.; Oliveira, L.C.; Ribas, L.A.; Acuña, M.H.A. 2013. Can forest management be sustainable in a bamboo dominated forest? A 12-year study of forest dynamics in western Amazonia. Forest Ecology and Management v.310, p.672– 679.

Donald, C.F. 2004. Synchrony and asynchrony: observations and hypotheses for the flowering wave in a long-lived semelparous bamboo. Journal of biogeography, v.31: p.733-786.

Donneli, J.K.; Robinson, D.S. 1995. Invited review free radical in foods. Free Radical Res. v.22, n.2, p.147-176.

Droge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Rev Physiology*, v.82, p.47-95.

El-Benna, J.; Dang, P.M.C.; Gougerot-Pocidaló M.A. 2008. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol, Berlim*, v.30, p.279–289.

Fang, M.Z.; Wang, Y.; Ai, N.; Hou, Z.; Sun, Y. Lu, H.; Welsh, W.; Yang, C.S. 2003. Tea Polyphenol (–)-Epigallocatechin-3-Gallate Inhibits DNA Methyltransferase and Reactivates Methylation-Silenced Genes in Cancer Cell Lines. *Cancer Research*, v.63, p.7563–7570.

Farmacopéia Brasileira. 2001. 4 ed. Parte II Fascículo 2. In: Diário Oficial, Suplemento n.1.

Fehrenback, E.; Niess, A.M. 1999. Role of Heat Shock Proteins in the exercise response. *Exec. Immunol. Rev.* 5 : p.57-77.

Ferguson, L.R. 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutation Research*, v.475, p.89-95.

Ferreira, A.L.A.; Matsubara, L.S. 1997. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. São Paulo, v.43, n.1, p.61-68.

Ferreira, V.; Lópes, R.; Aznar, M. 2001. Olfactometry and Aroma Extract Dilution Analysis of Wines. In: *Analysis of Taste and Aroma*, J. Jackson. Berlin: Springer Verlag, p.89-122.

Ferreira, I.C.F.R.; Abreu, R.M.V. 2007. Estresse Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise*, v.4, n.2, p.32-39.

Ferreres, F.; Gil-Izquierdo, A.; Andrade, P.B.; Valentao, P.; Tomas-Barberan, F.A. 2007. Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1161: 214-223.

Figueirinha, A.; Paranhos, A.; Perez-Alonso, J.J. 2008. *Cymbopogon citratus* leaves: Characterisation of flavonoids by HPLC-PDA-ESI/MS/MS and an approach to their potential as a source of bioactive polyphenols. *Food Chem* 110: 718-728.

Filgueiras, T.S. & Pereira, B.A.S. 1988. On the flowering of *Actinocladum verticillatum* (Gramineae: Bambusoideae). *Biotropica* v.20, p.164-166.

Filgueiras, T.S.; Santos-Gonçalves, A.P. 2004. A checklist of the basal grasses and bamboos in Brazil (Poaceae). *Sci Cult* v.18, p.7-18.

Filgueiras, T.S.; Canto-Dorow, T.S.; Carvalho, M.L.S.; Dórea, M.C.; Ferreira, F.M.; Mota, A.C.; Oliveira, R.C. de; Oliveira, R.P.; Reis, P.A.; Rodrigues, R.S.; Santos-Gonçalves, A.P.; Shirasuna, R.T.; Silva, A.S.; Silva, C.; Valls, J.F.M.; Viana, P.L.; Welker, C.A.D.; Zanin, A.; Longhi-Wagner, H.M. 2016. *Poaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB193>>. Acesso em: 18 Jan. 2016.

Finley, J.W.; Kong, A.N.; Hintze, K.J.; Jeffery, E.H.; Ji, L.L.; Lei, X.G. 2011. Antioxidants in foods: state of the science important to the food industry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.59, p.6837–6846.

Flora, S.; Ferguson, L.R. 2005. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat Res.* v.591(1-2): p.8-15.

Funari, C.S.; Ferro, V.O. 2005. Uso ético da biodiversidade Brasileira: necessidade e oportunidade. *Rev. Bras. Farmacogn.*, João Pessoa, v.15, n.2, p.178-182.

Garrot, R.A.; White, P.J.; White, C.A.V. 1993. Overabundance: an issue conservation biologists *Conservation Biology*, v.7 (4), p.946-949.

Giordano, C.V.; Sanchez, R.A.; Austin, A.T. 2009. Gregarious bamboo flowering opens a window of opportunity for regeneration in a temperate forest in Patagonia. *The New Phytologist* v.181, p.880–889.

González, M.E.; Veblen, T.T.; Donoso, C.; Valeria, L. 2002. Tree regeneration responses in a lowland *Notophagus*- dominated forest after bamboo dieback in South-Central Chile. *Plant ecology* v.161, p.59-73.

Granato, D. 2011. Associação entre atividades antioxidante *in vitro* e características química, sensoriais, cromáticas e comerciais de vinhos tintos Sul-Americanos. Tese de doutorado em Ciência dos Alimentos - Universidade de São Paulo, São Paulo – SP.

Greiter, F.; Gschnait, F. 2008. Effect of UV light on humans. *Photochem Photobiol.* V.39(1), p.869-73.

Griscom, B.W. & Ashton, P.M.S. 2003. Bamboo control of forest succession: *Guadua sarcocarpa* in southeastern Peru. *For. Ecol. Manage.*v.175,p.445-454.

Griscom, B. W.; Ashton, P. M. S. 2006. A self-perpetuating bamboo disturbance cycle in a neotropical forest. *Journal of Tropical Ecology, Cambridge*, v.22, n.5, p.587-597.

Griscom, B.W.; Daly, D.C.; Ashton, M.S. 2007. Floristics of bamboo-dominated stands in lowland terra-firma forests of southwestern Amazonia. *Journal of the Torrey Botanical Society* v.134, p.108–125.

Grombone-Guaratini, M.T.; Cardoso-Lopes, E.M.; Jensen, R.C.; Torres, L.M.B. 2009. Allelopathic potential of *Aulonemia aristulata* (Döll) MacClure, a native bamboo of Atlantic Rain Forest. *Allelopathy Journal*. India: International Allelopathy Foundation, v.24, n.1, p.183-190.

Grombone-Guaratini, M.T.; Cardoso-Lopes, E.M.; Fukuda, G.R.; Markowitsch, C.J.; Young, M.C.M. 2011. Avaliação do potencial alelopático de cinco espécies de bambu nativas: implicações para a dominância na estrutura florestal. *Anais do 2º Seminário Nacional do Bambu: Consolidação da Rede Brasileira do Bambu*; Brasília, DF, p.50-56.

Grombone-Guaratini, M.T.; Gaspar, M.; Oliveira, V.F.; Torres, M.A.M.G.; Nascimento, A.; Aidar, M.P.M. 2013. Atmospheric CO₂ enrichment markedly increases photosynthesis and growth in a woody tropical bamboo from the Brazilian Atlantic Forest. *Newzealand J. Bot.* v.51(4), p.275-285.

Guo, X.F.; Yue, Y.D.; Tang, F.; Wang, J.; Yao, X. 2013. Antioxidant properties of major flavonoids and subfractions of the extract of *phyllostachys pubescens* leaves. *Journal of Food Biochemistry* v.37, p.501–509.

Halliwell, B.; Aeschbach, R.; Lölinger, J.; Aruoma, O.I. 1995. The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, Oxford, v.33, n.7, p.601-617.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. 2000. *Free radicals in biology and medicine*. 3th ed. Oxford Science Publications, New York, p.936.

Hasenhuetti, G.L.; Wan, P.J. 1992. Temperature effects on the determination of oxidative stability with the Metrohm Rancimat. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.69, n.6, p. 525-527.

Hönigsmann, H. 2002. Erythema and pigmentation. *Photodermatol Photo*, v.18, p.75-81.

Issa, F.I.C. 2015. Avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos de *Apoclada simplex* McClure & Smith (*Poaceae: Bambusoideae*). Tese de Mestrado em Farmaco e Medicamentos – Universidade de São Paulo, São Paulo – SP.

Janzen, D.H. 1976. Why bamboos wait so long to flower. *Annual Review of Ecology and Systematic* v.7, p.347-391.

Jansen, R.; Wang, S. Q.; Burnett, M.; Osterwalder, U.; Lim, H. W. 2013b. Photoprotection. Part I. Photoprotection by naturally occurring, physical, and systemic agents. *J Am Acad Dermatol*, v.69, n.6, p.853.e1-12.

Jiao, J.J.; Zhang, Y.; Lou, D.D.; Wu, X.Q.; Zhang, Y. 2007. Antihyperlipidemic and antihypertensive effect of a triterpenoid-rich extract from bamboo shavings and vasodilator effect of friedelin on phenylephrine-induced vasoconstriction in thoracic aortas of rats. *Phytotherapy Research*, v.21, p.11-1141.

Jin, Y.C.; Yuan, K.; Zhang, J. 2011. Chemical Composition, and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil of *Phyllostachys heterocycla* cv. *Pubescens* Varieties from China. *Molecules*. v.16, p.4318–4327.

Judziewicz, E.J.; Clark, L.G.; Londoño, X.; Stern, M.J. 1999. American bamboos. Washington D. C.; Smithsonian Institution Press.

Kelchner, S.A. 2013. Bamboo phylogeny group, higher level phylogenetic relationships within the bamboos (*Poaceae: Bambusoideae*) based on five plastid markers. *Mol Phylogenet Evol*, v.67, p.404-413.

Khatun, A.; Nakajima, K.; Saito, M.; Giridharan, V.V.; Hara, H.; Konish, T. 2013. *In vitro* and *In vivo* Antioxidant Potential of Japanese Kumaisasa Bamboo Leaf (*Sasa senanensis* Rehd). *Journal of Biochemical and Pharmacological Research*, v.1 (4), p.236-244.

Koracevic, D.; Koracevic, G.; Jordjevic, V.D. 2001. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J Clin Pathol* v.54, p.356-361.

Kullavanijaya, P.; Lim, H.W. 2005. Photoprotection. *J Am Acad Dermatol*. V.52, p.937-58.

Larpkern, P.; Moe, S.R.; Totland, S.R. 2011. Bamboo dominance reduces in a disturbed tropical forest. *Oecologia* v.165, p.161–168.

Lautenschlager, S.; Wulf, H.C.; Pittelkow, M.R. 2007. Photoprotection. *Lancet*, v.370, p.528-537.

Li, Z.; Fu, M.; Xu, D. 2003. Bamboo ecosystem and carbon dioxide Sequestration [J]. *Journal of Bamboo Research*, v.22(4), p.1-6.

- Liese, W.; Tang, T.K.H.** 2015. Properties of the bamboo culm. In W. Liese & M. Kohl (Eds.), *Tropical forestry, bamboo: then plant and its uses*. p.227–256.
- Lima, R.A.F.; Rother, D.C.; Muler, A.E.; Lepsch, I.F.; Rodrigues, R.R.** 2012. Bamboo overabundance alters forest structure and dynamics in the Atlantic Forest hotspots. *Biological Conservation* v.147, p.32-39.
- Limón-Pacheco, J.; Gonsebatt, M.** 2009. The role of antioxidants and antioxidants-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v.67, p.137-147.
- Liu, H.; Zhao, Z.M.; Wang, J.J.; Li, L.S.; Ding, W.** 2000. Temperature-dependent development and reproduction of the spider mite, *Schizotetranychus bambusae* Reck (*Acari: Tetranychidae*). *Systematic & Applied Acarology*, v.5, p.33-39.
- Liu, M.H.; Ko, C.H.; Ma, N.; Tan, P.W.; Fu, W.M.; He, J.Y.** 2016. Chemical profiles, antioxidant and anti-obesity effects of extract of *Bambusa textilis* McClure leaves. *Journal of Functional Foods* v.22, p.533–546.
- Longhi-Wagner, H.M.** 2012. *Poaceae*: an overview with reference to Brazil. *Rodriguésia* v.63, p.89-100.
- Lu, P.; Woo, K.C.; Liu, Z.T.** 2002. Estimation of whole-plant transpiration of bananas using sap flow measurements *J. Exp. Bot.*, v.53, p.1771–1779.
- Lu & Liao, Z.K.; Lu, W. Liao.** 2003. Preliminary determination of chemical components for leaves of *Phyllostachys pubescens*. *Journal of Shanxi University (Nat. Sci. Ed.)*, v.26 (1) ,p.46–48.
- Lu, B.Y.; Tie, X.W.; Wu, X.Q.; Zhang, Y.; Zhang, Y.** 2005. Toxicology and safety of anti-oxidant of bamboo leaves. Part I: Acute and subchronic toxicity studies on anti-oxidant of bamboo leaves. *Food Chem Toxicol* v.43, p.783–792.

Lu, B.; Wu, X.; Shi, J.; Dong, Y.; Zhang, Y. 2006. Toxicology and safety of antioxidant of bamboo leaves. Part 2: developmental toxicity test in rats with antioxidant of bamboo leaves. *Food Chem Toxicol.* V.44, p.1739–1743.

Luo & Chen, J.Y.; Luo, X.Y. Chen. 2003. Study on extracting tea polyphenols from leaf of *Indocalamus* *Chemistry and Industry of Forest Products*, v.37,p.15–19.

Lv, Z.L.; Lin, X.; Miao, Z.H.; Guo, H.X.; Wang, J.A.H.; Lei, M.L.; Pan, Y.; Zhang, B.L. 2012. Antioxidant activity of bamboo-leaf extracts from the species *Dendrocalamopsis oldhami*. *Scientific Research and Essays*, v.7(44), p.3789-3796.

Maier, T.; Korting, H.C. 2005. Sunscreens – which and what for? *Skin Pharmacol. Physiol.*, Basel, v.18, n.6, p.253-262.

Marco, G.J. 1968. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.45, p.594-598.

Marcucci, M.C.; Woisky, R.G; Salatino, A. 1998. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides em amostras de própolis. *Mensagem Doce*, v.46, n.3, p.234-239.

Marinova, D.; Ribarova, F.; Atanassova, M. 2005. Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy.* v.40 (3), p.255-260.

Matsumoto, R. 2008. Atividade antioxidante de chá mate (*Ilex paraguariensis*). Tese de mestrado em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo, São Paulo – SP.

Matsumura, Y.; Ananthaswamy, H.N. 2006. Biotechnology in skin (V): UV and Sun protection. In: LAD, R. *Biotechnology in personal care*. New York: Taylor & Francis Group, cap.9, p.227-245.

Mazza, G.; Kay, C.D.; Cottrell, T.; Holub, B.J. 2002. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. *J. Agric. Food Chem.*, v.50, p.7731-7737.

McClure, F.A. 1993. The bamboos. (2nd edition). Smithsonian Institution Press, Washington and London. p.335.

Mensor, L.L.; Menezes, F.S.; Leitão, G.G.; Reis, A.S.; Santos, T.C.D.; Coube, C.S.; Leitão, S.G. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research*, v.15, n.2, p.27-130.

Miller, H.E. 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 48, p.91.

Miller, N.J.; Rice-Evans, C.; Davies, M.J.; Gopinathan, V.; Milner, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*. v.84, p.407-412.

Montti, L.; Villagra, M.; Campanello, P.I.; Gatti, M.G.; Goldstein, G. 2013. Functional traits enhance invasiveness of bamboos over co-occurring tree saplings in the Semideciduous Atlantic Forest. *Acta Oecol* (in press) doi: j.actao.03.004.

Morales-Molina, J.A.; Grau, S.; Jiménez-Martín, J.; Mateu-De, A.J.; Espona, M.; Bérge-Fraile, M.J.; Zarzuelo, A.; Salas, E. 2006. Queimaduras solares: fotoprotección y tratamiento. *Ars Pharm*. v.47(2), p.119-35.

Naik, E.; Michalak, E.M.; Villunger, A.; Adams, J.M.; Strasser, A. 2007. Ultraviolet radiation triggers apoptosis of fibroblasts and skin keratinocytes mainly via the BH3-only protein Noxa. *J Cell Biol* v.176(4), p.415-24.

Nascimento, C.S.; Nunes, L.C.C.; Lima, A.A.N.; Grangeiro, J.S.; Rolim, N.P.J. 2009. Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha. *Rev Bras Farm*.90(4):334-339.

Nishikawa, D.O.; Zague, V.; Pinto, C.A.S.O.; Vieira, R.P.; Kaneko, T.M.; Velasco, M.V.R.; Baby, A.R. 2007. Avaliação da estabilidade de máscaras faciais *peel-off* contendo rutina. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, Araraquara, v.28, n.2, p.227-232.

Palanisamy, U.D.; Ling, L.T.; Manaharan, T.; Appleton, D. 2011. Rapid isolation of geraniin from *Nephelium lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity. *Food Chemistry*. v.127 (1), p.21-27.

Park, E.J.; Jhon, D.Y. 2010. The antioxidant, angiotensin converting enzyme inhibition activity, and phenolic compounds of bamboo shoot extracts. *LWT – Food Sci Technol*. v.43, p.655-659.

Pathak, M.A. 1997. Photoprotection against harmful effects of solar UVB and UVA radiation: an update. In: **Lowe, N.J.; Shaath, N.A.; Pathak, M.A.** *Sunscreens: development, evaluation and regulatory aspects*. New York: Marcel Dekker, p.59-79.

Pinto, A.C.; Silva, D.H.S.; Bolzani, V.S.; Lopes, N.P.; Epifanio, R.A. 2002. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quim. Nova, São Paulo*, v.25, supl.1, p.45-61.

Pozzi, A.C.S. 2007. Desenvolvimento de métodos de análise espectrofométrica de flavonoides do “maracujá” (*Passiflora alata* e *Passiflora edulis*). São Carlos, Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP.

Prior, R.L.; Cao, G. 1999. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of diferente analytical methods. *Free Radic. Biol. Med.*, v.27, n.11/12, p.1173- 1181.

Rabe, J.H.; Mamelak, A.J.; Mcelgunn, P.J.; Morison, W.L.; Sauder, D.N. 2006. Photoaging: mechanisms and repair. *J Am Acad Dermatol*. v.55, p.1-19.

Ramos, M.F.S.; Santos, E.P.; Bizarri, C.H.B.; Mattos, H.A.; Padilha, M.R.S.; Duarte, H.M.; 1996. Preliminary studies towards utilization of various plant extracts as antisolar agents. *Int J Cosmet Sci* 18: 87-101.

Razavi, S.M.; Nazemiyeh, H.; Hajiboland, R.; Kumarasamy, Y.; Delazar, A.; Nahar, L.; Sarker, S.D. 2008. Coumarins from the aerial parts of *Prangos uloptera* (*Apiaceae*). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v18, p.1-5.

Rother, D.C.; Jordano, P.; Rodrigues, R.R.; Pizo, M.A. 2013. Demographic bottlenecks in tropical plant regeneration: A comparative analysis of causal influences. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* v.15, p.86–96.

Rother, D.C.; Pizo, M.A.; Siqueira, T.; Rodrigues, R.R.; Jordano, P. 2015. Community-Wide Spatial and Temporal Discordances of Seed-Seedling Shadows in a Tropical Rainforest . *PLoS ONE* 10(4): e0123346. doi:10.1371/journal.pone.0123346.

Saija, A.; Tomatino, A.; Trombetta, D.; De Pasquale, A.; Uccella, N.; Barbuzzi, T.; Paolino, D.; Bonina, F. 2000. *In vitro* and *in vivo* evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *Int J Pharm* v.199, p.39–47.

Saldanha, L.A. 2005. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de extratos de erva mate (*Ilex paraguayensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*). USP. Tese de Mestrado em Saúde Pública – Universidade de São Paulo, São Paulo – SP.

Sanchez-Moreno, C.; Larrauri, J.A.; Saura-Calixto, F. 1998. A procedure to measure the antiradical efficient polyphenols. *J. Sci. Food Agric.*, v.76, p.270-276.

Sanchez-Moreno, C. 2002. Review: Methods used to evaluate the free scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Technol*, v.8, p.121-137.

Sandra, P. & Bicchi, C. 1987. *Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis*. Huething. New York.

Scalfi, C.; Fogliano, V.; Pentagelo, A.; Graziani, C.; Giordano, I.; Ritieni, A. 2000. Antioxidant activity and general fruit characteristics in different ecotypes of corbarini small tomatoes. *J. Agric. Food Chem.*, v.48, p.1363- 1366.

Schlumpf, M.; Schmid, P.; Durrer, S.; Conscience, M.; Maerkel, K.; Henseler, M.; Gruetter, M.; Herzog, I.; Reolon, S.; Ceccatelli, R.; Faass, O.; Stutz, E.; Jarry, H.; Wuttke, W.; Lichtensteiger, W. 2004. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters – an update. *Toxicology, Amsterdam*, v.205, n.1/2, p.113-122.

Schulze, R.; Wirksamkeit, Von. 1963. UV absorbem und handelsüblichen sonnenschutzmitteln. J Soc Cosmet Chem. v.25, p.544-65.

Serafini, M. 2006. The role of antioxidants in disease prevention. Medicine, v.34, n.12, p.533-535.

Sheppard, F.R.; Kelher, M.R.; Moore, E.E.; Mclaughlin, N.J. D.; Banerjee, A.; Silliman, C. C. 2005. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. J. Leukoc. Biol, Betesda, v.78, p.1025–1042.

Shirasuna, R.T.; Filgueiras, T.S. 2013. Bambus nativos (*Poaceae, Bambusoideae*) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil. Hoehnea v.40(2), p.315-359.

Smith, L.B.; Wasshausen, D.C.; Klein, R.M. 1981. Gramíneas, Volume I. In: Reitz, R. (ed.). Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. p.435.

Soderstrom, T.R.; Judziewicz, E.J.L. & Clark, L.G. 1988. Distribution patterns in Neotropical bamboos. In Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns (W.R. Heyer & P.E. Vanzolini, eds.). Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, p.120-156.

Soehnge, H.; Ouhtit, A.; Ananthaswamy, H.N. 1997. Mechanisms of induction of skin cancer by UV radiation. Front Biosci, v.2, p.527-37.

Souza, T.M.; Moreira, R.R.D.; Rangel, V.L.B.I.; Pietro, R.C.L.R. 2005. Avaliação da atividade fotoprotetora de *Achillea millefolium* L. Rev Bras Farmacogn 15: 36-38.

Souza, W.P.; Queiroga, C.L.; Sartoratto, A.; Honório, S.L. 2006. Avaliação do teor e da composição química de óleo essencial de *Mentha piperita* (L.) Huds durante o período diurno em cultivo hidropônico. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais v.8, p.108-111.

Souza, F. P.; Campos, G. R.; Packer, J.F. 2013. Determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo o extrato de *Malpighia glabra* L. – Acerola. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 34, n. 1, p. 69-77.

Springsteen, A.; Yurek, R., Frazier, M.; Carr, K.F. 1999. *In vitro* measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. *Anal Chim Acta.* v.380(2-3), p.155-64.

Staszewski, M.V.; Pilosof, A.M.R.; Jagus, R.J. 2011. Antioxidant and antimicrobial performance of different argentinean green tea varieties as affected by whey proteins. *Food Chemistry*, v.125, p.186–192.

Steiner, D. 2002. Vitaminas antioxidantes e a pele. *Cosmetics e toaletries*, edição em português v.14, jul./ago.

Stern, M.J.; Goodell, K.; Kennard, D.K. 1999. Local distribution of *Chusquea tomentosa* (Poaceae: Bambusoideae) before and after a flowering event. *Biotropica* v.31, p.365–368.

Sucupira, N.R.; Silva, A.B.; Pereira, G.; Costa, J.N. 2012. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*; v.14 (4), p.263-9.

Sudhakara, K.; Jijeesh, C.M.; Shine, G. 2015. Seed source and size variation influences the germination and seedling growth of *Strychnos nux-vomica*. *Journal of Tropical Agriculture* v.53 (1), p.85-90.

Sungkaew, S.; Stapleton, C.M.A.; Salamin, N. & Hodkinson, T.R. 2009. Nonmonophyly of the woody bamboos (*Bambuseae; Poaceae*): A multi-gene region phylogenetic analysis of *Bambusoideae* s.s. *Journal of Plant Research* v.122, p.95-108.

Takahashi, T.; Mizuib, K.; Miyazawa, M. 2010. Volatile compounds with characteristic odour in moso-bamboo stem (*Phyllostachys pubescens* Mazel ex Houz. De ehaie), *Phytochemical Analysis* v.21, p.489-495.

Tan, J.B.L & Lin Y.Y. 2015. Critical analysis of current methods for assessing the *in vitro* antioxidant and antibacterial activity of plant extracts. *Food Chemistry* v.172, p.814-822.

Tang, L.L.; Xu R.R.; Ding, X.L. 1998. The inhibitory effect of bamboo leaf polysaccharide on implanted *Sarcoma 180* tumor Journal of Wuxi University of Light Industry, v.17 (3) , p.62–65.

Taylor, S.C. 2005. Photoaging and pigmentary changes of the skin. In: Burgess CM. Cosmetic dermatology. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag Berlin. p.29-49.

Tsai, C.S.; Young, C.C. 1993. Allelochemicals in rhizosphere soils of flowering and nonflowering bamboo plants. Bot Bull Acad Sin v.34, p.223–234.

United States. 2011. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. 21 CFR parts 201 and 310. Labeling and effectiveness testing; sunscreen drug products for over-the-counter human use; Final Rule. Silver Spring, v.76, n.117, p.46.

Urbach, F. 2001. The historical aspects of sunscreens. J Photochem Photobiol B. v.64(2-3), p.99-104.

Vancini, R.L.; Lira, C.A.B. 2005. Radical livre, estresse oxidativo e exercício. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Wagner, H.; Blatt, S. 2001. Plant Drug Analysis A Thin layer Chromatography Atlas. 2.ed. New York: Springer,. p.195, 236.

Winterbourn, C.C.; Kettle, A.J. 2003. Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity. Biochem Biophys Res Commun. v.305, p.729- 736.

Wojakowsk A, A.; Piasecka, A.; García-López, P.M. 2013. Structural analysis and profiling of phenolic secondary metabolites of Mexican lupine species using LC-MS techniques. Phytochemistry v.92, p.71-86.

Yang, S.J.; Zhang, Y.J.; Sun, M.; Goldstein, G.; Cao, K.F. 2012. Recovery of diurnal depression of leaf hydraulic conductance in a subtropical woody bamboo species: embolism refilling by nocturnal root pressure. Tree Physiol. v.32, p.414–422.

Zhang Y, Ding X.L. 1996a. Studies on anti-oxidative fraction in bamboo leaves and its capacity to scavenge active oxygen radicals. *J. Bamboo Res.* v.15 (3), p.17-24.

Zhang Y, Ding X.L. 1996b. Studies on antioxidative fraction in bamboo leaves and capacity to scavenge active oxygen radicals. *J. Bamboo Res.* v.15(3), p.17-24.

Zhang, Y.X.; Liu, Q.-Y.; Lin, J.-Z.; Song, M.G.; Cai, Q.J.; He, X.Y. 1998. Studies on species distribution and damage by spider mites in bamboo trees in Fujian Province. *Journal of Fujian Academy of Agricultural Sciences*, v.12(3), p.11-15.

Zhang, Y.; Wu, X.; Ren, Y.; Fu, J.; Zhang, Y. 2004. Safety evaluation of a triterpenoid-rich extract from bamboo shavings. *Food and Chemical Toxicology*, v.42, p.1867–1875.

Zhang, Y.; Bao, B.; Lu, B.; Ren, Y.; Tie, X.; Zhang Y. 2005. 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*, v.1065, p.177–185.

Zhang, D.; Hui, D.; Luo, I.; Zhou, Y.G. 2008. Rates of litter decomposition in terrestrial ecosystems: global patterns and controlling factors. *Journal of Plant Ecology* v.1(2), p.85-93.

Zhang, L. W.; AL-Suwayeh, S. A.; Hsieh, P. W.; Fang, J. Y. 2010. A comparison of skin delivery of ferulic acid and its derivatives: evaluation of their efficacy and safety. *Int J Pharm*, v.399, p.44-51.