UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

**Atividade antioxidante e fotoprotetora de bambus nativos do
Sudeste brasileiro**

Katarzyna Barbara Wróblewska

São Paulo

2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

**Atividade antioxidante e fotoprotetora de bambus nativos do
Sudeste brasileiro**

Katarzyna Barbara Wróblewska

Versão original

Tese para obtenção do Título de Doutor

Orientador: Prof. Dr Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno

Co-orientador: Prof. Dr André Rolim Baby

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

W111a Wróblewska, Katarzyna Barbara
 Atividade antioxidante e fotoprotetora de bambus
 nativos do Sudeste brasileiro / Katarzyna Barbara
 Wróblewska. - São Paulo, 2019.
 172 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.
Orientador: Moreno, Paulo Roberto
Coorientador: Baby, Andre

1. Atividade antioxidante. 2. ação fotoprotetora.
3. bambus nativos do Brasil. 4. compostos fenólicos.
5. FPS in vivo. I. T. II. Moreno, Paulo Roberto ,
orientador. III. Baby, Andre, coorientador.

Katarzyna Barbara Wróblewska

Atividade antioxidante e fotoprotetora de bambus nativos do Sudeste
brasileiro

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de Doutor

Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno

Orientador/Presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2019.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Paulo R. H. Moreno, pelo acolhimento, conhecimento transmitido, paciência e compreensão durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. André Rolim Baby, pela orientação carinhosa na realização dos ensaios de fotoproteção.

À Professora Dra. Maria Tereza Grombone-Guaratini do Instituto de Botânica, pela parceria e auxílio na parte da coleta do material vegetal.

Às Professoras Dra. Telma M. Kaneko, Dra. Maria Cláudia Marx Young, Dra. Cristina Helena dos Reis Serra, Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros, Dra. Leticia Veras Costa Lotufo, pelos ensinamentos, companhia, apoio técnico e conselhos.

Aos caros Professores Dr. Felipe R. Lourenço e Dr. Marcelo José Pena Ferreira, pelos ensinamentos e ajuda na realização dos testes.

Ao Instituto de Pesquisa Clínica Integrada, pela parceria nos ensaios clínicos, em especial à Gerente de Pesquisa Clínica Fernanda Daud Sarruf.

Aos meus pais Małgorzata e Jacek, à minha irmã Ola, ao meu irmão Tomasz, à minha avó Halina, ao meu padrinho Jerzy, a toda família e aos amigos do país materno, pelo amor incondicional e apoio emocional durante o período da ausência.

Aos queridos: Kamilla, Danielle, Fabiana, Marcos, Felipe, Agnieszka, Tomas, Rafael, Thamires, Nádia, Alexandra, Luis, Miguel, Vanessa, Celso, Paola, André, Cynthia, Fabiola, Ki, Asia, Rosane, e outros companheiros não mencionados aqui, pelas amizades.

Aos alunos Leticia, Vinicius, Rafael, Matheus, e aos técnicos, Roberto, Claudinéia, Edgar, pela ajuda.

Ao Paulinho, pela presença.

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelo suporte técnico-científico e desenvolvimento humano, e ao CNPq, pelo financiamento deste projeto.

“A natureza é o único livro que oferece um conteúdo valioso em todas as suas folhas”

Johann Goethe

RESUMO

WROBLEWSKA, K. B. **Atividade antioxidante e fotoprotetora de bambus nativos do Sudeste brasileiro**. 2019. 172 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Os bambus nativos do Brasil, com exceção de seu uso como material de construção, têm encontrado poucas aplicações devido à falta de conhecimento abrangente sobre sua composição química e atividades biológicas. Neste projeto, foram pesquisados extratos etanólicos de colmos e folhas de cinco espécies de bambu do Sudeste brasileiro: *Aulonemia aristulata* (Döll) McClure., *Chusquea bambusoides* Rupr. Ex Döll, *Chusquea capituliflora* Trin. var. *pubescens* McClure, *Chusquea meyeriana* Rupr. e *Merostachys pluriflora* Munro ex E.G. Camus, para avaliar sua atividade antioxidante, composição química, e atividade foto-protetora. O potencial antioxidante das plantas foi avaliado através do método do sequestro do radical livre DPPH, onde os extratos apresentaram valores de CI_{50} entre 137 e 260 $\mu\text{g/mL}$. O teor de compostos fenólicos e flavonoides foi determinado através dos métodos com o reagente Folin-Ciocalteu e AlCl_3 . O conteúdo de fenólicos totais variou de 43 a 87 μg equivalentes de ácido gálico por mg de extrato seco. O extrato mais rico em flavonoides foi o de *C. bambusoides*, com 6,44 μg equivalentes de quercetina por mg da amostra. A análise preliminar da composição química dos extratos foi realizada por cromatografia em camada delgada, excluindo a presença de flavonoides comuns nos bambus asiáticos. A eficácia de proteção solar e a foto-estabilidade *in vitro* das formulações cosméticas com extratos de bambus (10%) e filtros solares comerciais foi estimada por espectrofotometria de reflectância difusa com esfera de integração em placas de polimetilmetacrilato. Os dados obtidos foram convertidos em fator de proteção solar (FPS) antes e depois da irradiação, que variaram respectivamente entre 34,52 – 86,15 e 14,33 – 44,44. A seguir, foi avaliada a citotoxicidade frente a uma linhagem de células epiteliais de retina humana (RPE) do extrato mais promissor de colmos de *M. pluriflora*, sendo o mesmo classificado como não-tóxico. O fracionamento desse extrato potencializou a ação antioxidante e foto-protetora, aumentando a concentração das substâncias ativas no extrato selecionado. Adicionalmente, foram realizados outros ensaios cromatográficos (CG-EM e CLAE), os quais identificaram ácidos graxos, ácidos fenólicos e produtos característicos de decomposição de ligninas como os compostos principais nas frações ativas. Uma amostra de formulação cosmética com extrato de colmos *M. pluriflora* (5%) e com filtros solares foi enviada para Instituto de Pesquisa IPCLin, onde foram realizados testes de FPS e foto-irritação *in vivo*. A média de FPS *in vivo* da formulação foi 23, enquanto, o FPS da formulação controle, 15. Devido a sua abundância, o ácido *p*-cumárico, pode ser o principal responsável pela atividade observada. O produto com o extrato não causou irritação da pele dos voluntários após a irradiação. Os resultados indicam que as espécies de bambu do Brasil aumentam o FPS dos filtros solares comerciais e são seguros para o uso externo, com potencial para a produção de cosméticos fotoprotetores.

Palavras-chave: Fator de proteção solar, *in vitro*, *in vivo*, bambu, antioxidantes, fenólicos.

ABSTRACT

WROBLEWSKA, K. B. **Antioxidant and photoprotective activity of native Brazilian bamboo species.** 2019. 172 p. PhD Thesis. Faculty of Pharmacy, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil, 2019.

Differently of Asian species, the native Brazilian bamboo species are mostly used in the construction industry, with no pharmaceutical applications described, as their chemical composition and biological effects are unknown. In this project, we evaluated the chemical composition, antioxidant and photoprotective activity of ethanolic extracts from five bamboos from the South of Brazil: *Aulonemia aristulata* (Döll) McClure., *Chusquea bambusoides* Rupr. Ex Döll, *Chusquea capituliflora* Trin. var. *pubescens* McClure, *Chusquea meyeriana* Rupr. and *Merostachys pluriflora* Munro ex E.G. Camus. DPPH radical scavenging activity assay was used to estimate the antioxidant potential of the plants, and the IC₅₀ received varied between 137 and 260 µg/mL. Total phenolics and flavonoids contents were determined using Folin-Ciocalteu and AlCl₃ reagents. The bamboo dry extracts showed between 43 - 87 µg gallic acid equivalents and up to 7 µg of quercetin equivalents per mg of the sample. Preliminary analysis of the chemical composition done by Thin Layer Chromatography in silica plates, indicated that the most common flavonoids found in Asian species were not present in the Brazilian bamboos. Photoprotective activity of the developed cosmetic formulations, containing commercial solar filters and 10% of the extracts, was evaluated by diffuse transmittance with an integrating sphere on PMMA plates. The samples presented Sun Protection Factor (SPF) from 34 – 86 before to 14 – 44 after the irradiation, and a broad spectrum of action. The most promising extract, *M. pluriflora* culms, was chosen for the second part of the project, which involved further studies on its composition and *in vivo* photoprotective activity. The selected extract had its cytotoxicity evaluated, to confirm its safety, against retinal pigmented epithelium (RPE) cells. The extract was fractioned, and the fractions were evaluated for their total phenolic and flavonoid contents. Fractions' separation increased the quantity of the active compounds and, consequently, their antioxidant and photoprotective effect. Additionally, Gas Chromatography-Mass Spectrometry and High-Performance Liquid Chromatography analysis of the fractions showed the presence of fatty acids, phenolic acids and products of lignin decomposition as the main compounds. Due to its abundance, *p*-coumaric acid might be responsible for the antioxidant activity and photoprotection of the bamboo extract. The photoprotective formulation with 5% of the extract was sent to a clinical research center, IPCLin, to have their SPF *in vivo* and photosensitivity effect estimated on healthy volunteers. The *in vivo* SPF was 23 for the extract formulation and 15 for the control with only commercial filters. These results indicated that native bamboo species can be a source of natural photoprotective substances, which would prevent the addition of high amount of synthetic solar filters, that can easily degrade and cause skin allergies and irritation.

Key words: Sun Protection Factor (SPF), *in vitro*, *in vivo*, bamboo, antioxidants, phenolics.

Lista de equações

Equação 1. Cálculo da absorbância.....	48
Equação 2. Relação entre absorbância (A) e transmitância (T).....	48
Equação 3. Cálculo de transmitância.	49
Equação 4. Rendimento da extração e do fracionamento	62
Equação 5. Fator de retenção calculado para as amostras submetidas a cromatografia em camada delgada	65
Equação 6. Índice de retenção linear empregado nos cálculos.	66
Equação 7. Cálculo da inibição do radical livre DPPH.	67
Equação 8. Fator de proteção solar (FPS) <i>in vitro</i>	74
Equação 9. Comprimento de onda crítico <i>in vitro</i>	74
Equação 10. Fator de proteção solar (FPS) <i>in vivo</i>	78

Lista de figuras

Figura 1. A mapa da riqueza de espécies de bambus lenhosos na América do Sul.	23
Figura 2. Principais características morfológicas tendo como exemplo a ilustração botânica para <i>Aulonemia viscosa</i> (Hitchc.) McClure.	24
Figura 3. Distribuição das espécies de <i>Aulonemia</i> Goudot no continente americano.....	25
Figura 4. Ilustração com as características morfológicas de <i>Chusquea meyeriana</i> Rupr. ex Döll.	26
Figura 5. Distribuição das espécies de <i>Chusquea</i> Kunth nas Américas.	27
Figura 6. Principais características das partes aéreas das espécies de <i>Merostachys</i> Spreng...	28
Figura 7. Densidade de espécies de <i>Merostachys</i> Spreng. na América-latina.	29
Figura 8. Biossíntese de lignina.	34
Figura 9. Esquema simplificado para a biossíntese de ligninas e flavonoides.....	34
Figura 10. Ácidos fenólicos presentes em bambus.	36
Figura 11. Flavonoides presentes em bambus.....	37
Figura 12. Triterpenoides presentes em bambus.....	38
Figura 13. Divisão da radiação eletromagnética.	40
Figura 14. Esquema de cadeia alimentar na Terra.	40
Figura 15. Relação de penetração da pele humana de radiação dependendo do comprimento da onda.	43
Figura 16. Filtros solares orgânicos.	46
Figura 17. Estrutura geral dos flavonoides.	48
Figura 18. Estruturas químicas de derivados de ácido hidroxicinâmico e flavonoides glicosilados e seus valores de $\lambda_{\max}$ e ϵ	50
Figura 19. Outros compostos derivados de plantas com atividade fotoprotetora.	52
Figura 20. Plano do projeto.	57
Figura 21. <i>Aulonemia aristulata</i> (Döll) McClure.	59
Figura 22. <i>Chusquea bambusoides</i> Rupr. ex Döll.....	60
Figura 23. <i>Chusquea capituliflora</i> Trin. var. <i>pubescens</i> McClure.....	60
Figura 24. <i>Chusquea meyeriana</i> Rupr.	60
Figura 25. <i>Merostachys pluriflora</i> Munro ex E.G. Camus.	61
Figura 26. Mudança de cor das soluções em teste após adição do reagente Folin-Ciocalteu.	63
Figura 27. Identificação dos flavonóides através do $AlCl_3$.~.....	64
Figura 28. Gradiente da atividade antirradicalar na presença do reagente DPPH com diminuição da concentração das amostras de bambu.	68
Figura 29. Curva de calibração de ácido gálico utilizada na determinação da concentração de substâncias fenólicas nas amostras de bambus.	85
Figura 30. Curva de calibração de quercetina utilizada para a determinação dos flavonoides nos extratos brutos das folhas e colmos dos bambus.	87
Figura 31. Cromatoplaça dos extratos brutos de folhas, dissolvidos em metanol. Eluente: acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético glacial e água (100:11:11:26). Visualização: luz UV 366 nm (I), 254 nm (II), e 366 nm após a nebulização com reagente NP (III).	90

Figura 32. Cromatoplaça dos extratos brutos de folhas de bambus, dissolvidos em metanol. Eluente: butanol, ácido acético glacial e água (3:1:1). Visualização: luz UV 366 nm (I), 254 nm (II), e 366 nm depois da pulverização com reagente NP (III).	91
Figura 33. Cromatoplaça dos extratos brutos de colmos de bambus, dissolvidos em metanol. Sistema 1: acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético glacial e água (100:11:11:26). Visualização: luz UV 366 nm (I), 254 nm (II), e 366 nm após nebulização com reagente NP (III).	93
Figura 34. Cromatoplaça dos extratos brutos de colmos de bambus, dissolvidos em metanol. Sistema 2: butanol, ácido acético glacial e água (3:1:1). Visualização: luz UV 366 nm (I), 254 nm (II), e 366 nm depois da pulverização com reagente NP (III).	94
Figura 35. Absorbância das formulações F1-F11 após antes (A) e depois (B) da irradiação.	101
Figura 36. Perfil cromatográfico da fração hexânica de colmo da <i>M. pluriflora</i> em visualização sob luz UV 366 nm (1) e 254 nm (2) com sistema usado: tolueno/éter 1:1.	107
Figura 37. Perfil cromatográfico da fração clorofórmica e de acetato de etila de colmo da <i>M. pluriflora</i> em visualização sob luz UV 366 nm (1) e 254 nm (2) com sistema usado clorofórmio/metanol 9:1.	108
Figura 38. Perfil cromatográfico da fração butanólica de colmo da <i>M. pluriflora</i> em visualização sob luz UV 366 nm (1) e 254 nm (2) com sistema usado: tetrahidrotolueno/tolueno/ácido fórmico 16:8:2:1.	109
Figura 39. Cromatograma obtido para a fração hexânica de colmo de <i>M. pluriflora</i> através de Cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.	110
Figura 40. Cromatograma obtido para a fração clorofórmica de colmo de <i>M. pluriflora</i> através da Cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.	112
Figura 41. Cromatograma obtido para a fração de acetato de etila de colmo de <i>M. pluriflora</i> através da Cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.	114
Figura 42. Cromatogramas obtidos para a fração de acetato de etila dos colmos de <i>M. pluriflora</i> através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa C18 em 280 (A) e 352 nm (B).	117
Figura 43. Espectro de absorção na região do UV para os compostos majoritários registrados no cromatograma em 280 nm para a f. acetato de etila dos colmos de <i>M. pluriflora</i> através da CLAE em fase reversa C18.	117
Figura 44. Cromatograma obtido para a fração clorofórmica dos colmos de <i>M. pluriflora</i> através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa C18 em 280 (A) e 352 nm (B).	118
Figura 45. Espectro de absorção na região do UV para os compostos majoritários registrados no cromatograma em 280 nm para a f. clorofórmica dos colmos de <i>M. pluriflora</i> através da CLAE em fase reversa C18.	119
Figura 46. Aspectos visuais das formulações desenvolvidas de colmo de <i>M. pluriflora</i> nas concentrações ajustadas.	124

Lista de tabelas

Tabela 1. Massa do material vegetal, massa e rendimentos obtidos para os extratos etanólicos 60% de bambus por extração em aparelho Soxhlet (extratos IQ).	83
Tabela 2. Massa do material vegetal, massa e rendimentos obtidos para os extratos etanólicos 60% de bambus por extrator automático Dionex-ASE 300 (extratos IB).	83
Tabela 3. Conteúdo dos compostos fenólicos nos extratos de bambus usando a metodologia de Folin-Ciocalteu, expressos em μg equivalentes de ácido gálico (EAG) por mg de amostra (média $\pm$ desvio padrão).	85
Tabela 4. Conteúdo de flavonoides totais determinados através do método com AlCl_3 expressos em μg equivalentes de quercetina (EQ) por mg de amostra (média $\pm$ desvio padrão) para os extratos de folhas e colmos de cinco espécies de bambu.	87
Tabela 5. Valores de CE_{50} de sequestro do radical livre DPPH dos extratos de bambus expressos em $\mu\text{g/mL}$ (média $\pm$ desvio padrão).	95
Tabela 6. Características organolépticas das formulações com os filtros solares e extratos de bambus (F1-F10) e o controle (F11).	97
Tabela 7. Fator de proteção solar (FPS, média $\pm$ desvio padrão) e comprimento de onda crítico (λ_c) das formulações F1-F11 antes e após irradiação.	99
Tabela 8. Massa do material seco, da fração e o rendimento calculado de partição do extrato de colmo da <i>M. pluriflora</i>	104
Tabela 9. Teor dos compostos fenólicos das frações de colmo de <i>M. pluriflora</i> avaliado por meio do método com reagente de Folin-Ciocalteu. Os resultados expressos em microgramas equivalentes de ácido gálico (EAG) por miligrama de extrato seco (média $\pm$ desvio padrão).	105
Tabela 10. Teor de flavonoides nas frações de colmos de <i>M. pluriflora</i> avaliado através do método com AlCl_3 . Os resultados expressos em microgramas equivalentes de quercetina (EQ) por miligrama de extrato seco.	106
Tabela 11. Composição química da fração hexânica de colmo da <i>M. pluriflora</i> através da cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.	111
Tabela 12. Composição química da fração clorofórmica de colmo da <i>M. pluriflora</i> através da cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.	113
Tabela 13. Composição química da fração de acetato de etila de colmo da <i>M. pluriflora</i> através da cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.	115
Tabela 14. Potencial antioxidante das frações de colmo da <i>M. pluriflora</i> estimado através do método espectrofotométrico de sequestro do radical livre DPPH.	121
Tabela 15. Efeito citotóxico do extrato bruto de colmos de <i>M. pluriflora</i> frente a três linhagens de células humanas. Resultados expressos em percentagem de inibição do crescimento.	123
Tabela 16. Fator de proteção solar (FPS) e comprimento de onda crítico (λ_c) das formulações desenvolvidas com extrato bruto e frações de colmo de <i>M. pluriflora</i> antes e depois da irradiação (media $\pm$ desviõ padrão).	125
Tabela 17. Fator de proteção solar (FPS) <i>in vivo</i> das formulações: F12, com 5% de extrato de colmo de <i>M. pluriflora</i> , F11, o controle, e P2, o padrão interno.	127

Lista de quadros

Quadro 1. Atividades biológicas de bambus asiáticos.....	30
Quadro 2. Diferentes flavonoides e suas propriedades antirradiação UV.	51
Quadro 3. Sistemas de eluente e padrões utilizados em cromatografia em camada delgada com placas de sílica gel 60F ₂₅₄ para as frações de colmo de <i>M. pluriflora</i>	65
Quadro 4. Matérias-primas utilizadas no desenvolvimento das formulações cosméticas.	70
Quadro 5. As formulações fotoprotetoras F1 - F15 desenvolvidas no ensaio contendo os diferentes extratos ou frações de bambu e os filtros solares.	71
Quadro 6. Composição das formulações contendo os filtros solares e as amostras de bambu (F1-F10 e F12-F15).	72
Quadro 7. Composição da formulação de controle (F11), contendo apenas os filtros solares.	72
Quadro 8. Fototipos de pele segundo Fitzpatrick TB 1986.	77
Quadro 9. Composição do padrão interno, P2, usado no ensaio de avaliação de fator de proteção solar <i>in vivo</i>	78

Sumário

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	18
1. Introdução e justificativa	19
1.1. Papel das plantas na vida humana e medicina	19
1.2. Bambus	21
1.2.1. Uso mundial e nacional	21
1.2.2. Taxonomia e distribuição	22
1.2.2.1. <i>Aulonemia</i>	23
1.2.2.2. <i>Chusquea</i>	25
1.2.2.3. <i>Merostachys</i>	27
1.2.3. Atividades biológicas e composição química	29
1.2.3.1. Espécies Asiáticas.....	29
1.2.3.2. Espécies nativas do Brasil	32
1.2.4. Biossíntese de compostos presentes em bambus.....	33
1.3. Radiação solar	39
1.3.1. Radiação UV	41
1.3.1.1. Divisão e efeitos nas células	41
1.3.1.2. Mecanismo de ação e interações com as moléculas biológicas.....	43
1.3.1.3. Fotoproteção	45
OBJETIVOS	54
2. Objetivos.....	55
METODOLOGIA	58
3. Metodologia.....	59
3.1. Material Vegetal.....	59
3.2. Reagentes	61
3.3. Análises químicas	61
3.3.1. Extração das folhas e colmos de bambus	61
3.3.2. Fracionamento do extrato bruto de colmos de <i>M. pluriflora</i>	62
3.3.3. Determinação de compostos fenólicos totais dos extratos de folhas e colmos de bambus e das frações de colmo de <i>M. pluriflora</i>	62
3.3.4. Determinação de flavonoides totais de extratos de folhas e colmos de bambus e das frações de colmo de <i>M. pluriflora</i>	63
3.3.5. Análise dos perfis cromatográficos por cromatografia em camada delgada.....	64

3.3.6.	Cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas de frações de colmo de <i>M. pluriflora</i>	65
3.3.7.	Cromatografia líquida de alta eficiência de frações de colmo de <i>M. pluriflora</i> .	66
3.4.	Análises biológicas	67
3.4.1.	Atividade antirradicalar dos extratos de bambus e das frações de colmo de <i>M. pluriflora</i>	67
3.4.2.	Citotoxicidade do extrato bruto de colmos de <i>M. pluriflora</i>	68
3.5.	Análises de formulações cosméticas.....	69
3.5.1.	Preparo das formulações fotoprotetoras com amostras de bambus.....	69
3.5.1.1.	Método de obtenção das formulações fotoprotetoras de extratos de folhas e colmos de bambus (10, 5 e 2,5%) e controle	72
3.5.1.2.	Método de obtenção das formulações fotoprotetoras com as frações de colmos de <i>M. pluriflora</i> (0,1%).....	73
3.5.1.3.	Método de obtenção das formulações fotoprotetoras para os ensaios <i>in vivo</i>	73
3.5.2.	Ensaio <i>in vitro</i>	74
3.5.2.1.	Eficácia fotoprotetora	74
3.5.2.2.	Fotoestabilidade.....	74
3.5.3.	Ensaio <i>in vivo</i>	75
3.5.3.1.	Aspectos legais e éticos	75
3.5.3.2.	Avaliação do fator de proteção solar	77
3.5.3.3.	Potencial fotoirritante e fotossensibilizante.....	79
3.6.	Análise estatística dos ensaios	80
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
4.	Resultados e Discussão.....	82
4.1.	Triagem das espécies nativas de bambu	82
4.1.1.	Análises químicas.....	82
4.1.1.1.	Rendimentos dos extratos	82
4.1.1.2.	Determinação de compostos fenólicos totais.....	84
4.1.1.3.	Determinação do teor de flavonoides	86
4.1.1.4.	Comparação da composição química dos extratos brutos por cromatografia em camada delgada	88
4.1.2.	Análises biológicas.....	95
4.1.2.1.	Atividade antirradicalar	95
4.1.3.	Análises de formulações cosméticas	96
4.1.3.1.	Preparo das formulações fotoprotetoras	96

4.1.3.2.	Eficácia fotoprotetora e fotoestabilidade <i>in vitro</i> das formulações	98
4.2.	Análises adicionais com o extrato de colmos de <i>M. pluriflora</i>	104
4.2.1.	Análises químicas das frações	104
4.2.1.1.	Rendimentos	104
4.2.1.2.	Teor de fenólicos totais.....	105
4.2.1.3.	Teor de flavonoides	106
4.2.1.4.	Cromatografia em camada delgada	107
4.2.1.5.	Cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas	109
4.2.1.6.	Cromatografia líquida de alta eficiência.....	116
4.2.2.	Análises biológicas.....	121
4.2.2.1.	Atividade sequestradora das frações.....	121
4.2.2.2.	Citotoxicidade.....	122
4.2.3.	Análises de formulações cosméticas	124
4.2.3.1.	Eficácia fotoprotetora e fotoestabilidade <i>in vitro</i> das formulações fotoprotetoras de extratos e frações em concentrações ajustadas.....	124
4.2.3.2.	Eficácia fotoprotetora e fotossensibilidade <i>in vivo</i> das formulações fotoprotetoras com 5% do extrato.....	126
	CONCLUSÕES	129
5.	Conclusões.....	130
	REFERÊNCIAS.....	131
6.	Referências	132
	APÊNDICE – Resultados não incluídos na tese.....	147
	ANEXO A – Parecer substanciado para a Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo.....	148
	ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o ensaio de fotoproteção (FPS) <i>in vivo</i>	157
	ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e esclarecido para o ensaio de fotoirritação <i>in vivo</i>	160
	ANEXO C – Currículo Lattes	164
	ANEXO D – Ficha do Aluno.....	166
	ANEXO E – Publicações	169

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1. Introdução e justificativa

Anualmente, no mundo inteiro, aumentam os casos de câncer da pele e a preocupação da sociedade, dermatologistas e mercado de cosméticos com os danos da pele causados pela radiação ultravioleta. O uso dos filtros solares sintéticos tradicionais é questionado por seus efeitos adversos tais como alergias, irritação e fototoxicidade. A pouca estabilidade e o espectro de ação reduzido induziram a adição de misturas de compostos artificiais diferentes nas formulações cosméticas, cujas interações ainda não são conhecidas. Produtos naturais, como extratos vegetais, desde sempre foram uma alternativa à medicina convencional fornecendo agentes com diversas ações fisiológicas, relativamente seguras. Existe uma grande heterogeneidade de dados na literatura confirmando o efeito fotoprotetor para as substâncias fenólicas presentes em plantas, que em alguns casos, já estão sendo usados em cosméticos direcionados à proteção solar. Os bambus constituem uma fonte abundante e sustentável de material vegetal que pode providenciar esse tipo de compostos, satisfazendo a demanda do mercado. O Brasil possui a maior diversidade de espécies de bambu nas Américas, porém, seu uso se restringe como material de construção, diferentemente das espécies asiáticas que possuem diversas aplicações na indústria cosmética e farmacêutica. Com esse objetivo, foi pesquisado o potencial antioxidante e ação fotoprotetora para cinco espécies de bambu nativas pertencentes aos gêneros: *Chusquea* Kunth, *Aulonemia* Goudot. e *Merostachys* Spreng.

1.1. Papel das plantas na vida humana e medicina

A natureza sempre foi a fonte principal de “matérias primas” para os humanos. Os seres humanos, ao longo da sua evolução, procuravam nela a resposta para todas as necessidades da sobrevivência – comida, fogo, roupas, papel, materiais de construção, combustível e meios de transporte, energia, óleos, resinas, café, chá e outras bebidas, repelentes, sabores, fragrâncias, fertilizantes e medicamentos, e outros (ROBBINS, 1944). As plantas são consideradas como os medicamentos mais acessíveis e baratos, e continuam ser o “primeiro socorro” em todos os locais do mundo, especialmente naqueles que sofrem com a pobreza. Os primeiros textos antigos que documentam o uso dos produtos naturais na medicina são de 2600 A.C. e tiveram origem na Mesopotâmia (Oriente Médio). Os povos antigos desta região usavam os óleos de *Cedrus Trew spp.*, *Cupressus L. spp.* e *Commiphora Jacq. spp.*, e *Glycyrrhiza glabra L.* e *Papaver somniferum L.* para tratamento de infecções, tosse e inflamação. Embora, a medicina do Egito antigo possa ser um pouco mais velha, os textos que relatam o uso de cerca 700 medicamentos (a maioria derivados de plantas) e explicam as suas diversas formas de aplicação

são datados de 1500 A.C. (CRAGG; NEWMAN, 2005). A Medicina Chinesa, baseada nos produtos derivados de plantas e animais tem sua origem estimada em pelo menos 2200 anos atrás, com seus primeiros registros documentados no terceiro século A.C. (ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA, 2018). Já o sistema de medicina indiana, chamado de Ayurveda, com mais de 3000 anos de uso de tratamentos com ervas e óleos essenciais, tem seus os primeiros documentos escritos datados do sexto século A.C. (ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA, 2018, NARAYANASWAMY, 1981). Uma grande parte do conhecimento folclórico de plantas medicinais foi resultado do uso por “tentativa e erro” dos seres humanos (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Várias dessas espécies de uso na medicina popular, historicamente famosas, ainda são empregadas, dentre elas destacamos: *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz (anti-hipertensivo), *Erythroxylum coca* Lam. (anestésico, estimulante), *Atropa belladonna* L. (antiespasmódico, antiasmático e anticolinérgico), *Digitalis lanata* Ehrh. (cardiotônico), *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (antitumoral) e *Cinchona officinalis* L. (antimalárico) (ASLAM & AHMAD, 2016). Hoje em dia, sabe-se que as moléculas responsáveis pela ação farmacológica das plantas são os compostos denominados de metabólitos secundários, ou também denominados de metabólitos especiais. Esses metabólitos são compostos produzidos em certos grupos de plantas, frequentemente sob condições específicas, tais como a adaptação ao meio ambiente ou presença de perigos externos, tais como predadores, e são característicos para cada espécie (DEWICK, 2002).

Esses produtos naturais continuam ter um papel importante no desenvolvimento de novos fármacos para diversas aplicações terapêuticas. Compostos obtidos de microrganismos, plantas e animais, constituem a fonte mais abundante de moléculas usadas na medicina. Antes do descobrimento do processo chamado de *high throughput screening* (HTS) (triagem de alta eficiência) e da era pós-genômica, 80% dos fármacos eram produzidos a partir de produtos naturais ou inspirados nas suas estruturas moleculares, que servem como modelos de substâncias sintéticas ou semissintéticas com uma ação fisiológica desejada (HARVEY, 2008). Já no período pós-HTS, entre 1981 e 2014, 71 antibióticos (mais de metade do número total) e 38 antineoplásicos (21% do total de medicamentos anticancerígenos) registrados ainda eram derivados de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016). Somente ano 2017, nos Estados Unidos, entre os medicamentos introduzidos no mercado para problemas de saúde atuais, que também foram baseados em moléculas naturais, temos: ertugliflozina (SteglatroTM) contra diabetes tipo 2; naldemedina (SymproicTM) - antagonista do receptor μ -opioide usado no tratamento de constipação induzida por opioides e deflazacort (EmflazaTM) para distrofia

muscular (TORRE; ALBERICIO, 2018). De acordo com análises estatísticas, os 90000 compostos que ocorrem na natureza constituem 40% dos potenciais fármacos, enquanto, os milhões de moléculas sintéticas contribuem para os demais 60% (DAR et al., 2017).

Um dos problemas na medicina moderna, é busca por novos fotoprotetores naturais para a prevenção do câncer de pele. As plantas, em sua evolução, desenvolveram vários métodos de autoproteção contra a radiação solar, entre eles a produção de compostos fenólicos. A obtenção desse tipo de compostos com capacidade fotoprotetora, de amplo espectro e alta eficácia, é o foco das pesquisas atuais. Os bambus, ricos em ácidos fenólicos e flavonoides, e por serem as plantas com o crescimento mais rápido do mundo (até 1 m por noite) (LIESE, 1987), são uma fonte de produtos naturais promissora, abundante e aceitável ecologicamente.

1.2. Bambus

1.2.1. Uso mundial e nacional

O bambu, “presente dos Deuses” (HIDALGO-LÓPEZ, 2003), desde os tempos antigos, vem sendo usado no sudeste da Ásia como material de construção e como embalagem de alimentos, protegendo contra a deterioração. Nessa região, a medicina tradicional emprega também as folhas de bambu no tratamento de hipertensão, arteriosclerose, doença cardiovascular, e certas formas de câncer (HONG et al., 2010). As propriedades terapêuticas foram relacionadas principalmente com a atividade antioxidante dos bambus. Na China, um produto derivado de folhas de bambu, chamado de antioxidante das folhas de bambu (inglês: Antioxidant of Bamboo leaves - AOB), tem seu uso permitido pelo Ministério da Saúde local como antioxidante em alimentos. Este preparado de bambu contém flavonoides, lactonas e ácidos fenólicos, onde os compostos mais abundantes foram as flavonas C-glicosiladas, tais como: orientina, homorientina, vitexina e isovitexina (ZHANG et al., 2005). Sal de bambu é outro produto alimentar desta planta, obtido a partir do cozimento de sal marinho com colmos de bambu, sendo usado também para fins medicinais. Este produto, abundante em minerais, tem várias atividades biológicas confirmadas, entre elas: antitumoral, hepatoprotetora, anti-inflamatória e antialérgica (ZHAO; KIM; PARK, 2013, YI et al., 2017, ZHAO et al., 2013, KIM et al., 2012,). Adicionalmente, uma ação anti-inflamatória foi reportada nos casos de dermatite atópica induzida em camundongos (YOOU et al., 2018). Além disso, na pele desses mamíferos o produto teve efeito contra o envelhecimento causado pela radiação UVB (ZHAO et al., 2018). Hoje em dia, existem aplicações para espécies asiáticas de bambu na produção de cosméticos

(MEJÍA et al., 2009), porém, seu uso ainda é limitado e não abrange as espécies nativas das Américas.

Na América Latina há cerca de 18 692 000 km² plantados com bambu, o que corresponde a 11 mil hectares cobertos com estas plantas (TAKAHASHI, 2006). O Brasil possui a maior diversidade de bambus nas Américas (FILGUEIRAS; SANTOS-GONÇALVES, 2004). O número das espécies brasileiras corresponde atualmente cerca de 17% das espécies conhecidas mundialmente (FLORA DO BRASIL, 2020, SORENG et al. 2017). No País, o bambu tem uso tradicional na produção de casas, barcos, ferramentas de agricultura, instrumentos musicais, armas e outros (TAKAHASHI, 2006). Grande quantidade do bambu tem sido cultivada em parques, jardins botânicos e institutos de pesquisa. Algumas espécies são usadas como fonte de matéria-prima para a indústria de papel, na habitação, como as plantas ornamentais ou para controle de erosão (FILGUEIRAS; SANTOS-GONÇALVES, 2004). Entretanto, as demais aplicações espécies brasileiras, especificamente seu uso medicinal, ainda permanecem desconhecidas. Nos últimos anos, o desenvolvimento socioeconômico e os benefícios ambientais têm aumentando o interesse geral sobre essas espécies. Mesmo assim, a gestão, transformação e seu uso na América Latina não atingem os níveis asiáticos (TAKAHASHI, 2006).

1.2.2. Taxonomia e distribuição

Os bambus são classificados dentro da família Poaceae, que são plantas conhecidas comumente como gramíneas, sendo uma das maiores famílias das Angiospermas. Este grupo corresponde a cerca de um quarto da população vegetal mundial (SODERSTROM; CALDERON, 1974), contando com 11.500 espécies distribuídas em 786 gêneros. Atualmente, é dividida em doze subfamílias (SORENG et al., 2017), entre elas *Bambusoideae*, que inclui os bambus verdadeiros.

Bambus são espécies que compõem e diversificam os habitats florestais, podem se adaptar e propagar em ambientes inóspitos, como topos de montanhas úmidas e frias, bem como os secos e quentes (FILGUEIRAS; SANTOS-GONÇALVES, 2004) e ocorrem naturalmente em todos os continentes, exceto na Europa (SODERSTROM; CALDERÓN, 1979). Essa subfamília divide-se em três tribos: Arundinarieae (bambus lignificados temperados), Bambuseae (bambus lignificados tropicais) e Olyreae (bambus herbáceos) (SORENG et al., 2017). Seus indivíduos são encontrados entre as latitudes 46 ° N e 47 ° S e em alturas que variam até 4300 metros do nível do mar (SODERSTROM; ELLIS, 1987). Bambuseae é

dividida em 11 subtribos, dentre quais *Arthrostylidiinae*, *Chusqueinae* e *Guaduinae* são endêmicas para as Américas (BURMAN; FILGUEIRAS, 1993, SORENG et al., 2017).

A abundância das espécies lenhosas de bambus da América do Sul pode ser visualizada na Figura 1.

Figura 1. A mapa da riqueza de espécies de bambus lenhosos na América do Sul.

Fonte: BYSTRIAKOVA; KAPOs; Lysenko, 2004.

Por causa da sua abundância, endemismo na região e falta de dados na literatura, algumas espécies dos gêneros *Aulonemia*, *Chusquea* e *Merostachys* foram escolhidas como alvo deste estudo.

1.2.2.1. *Aulonemia*

Aulonemia Goudot tem seu nome derivado da latinização de duas palavras gregas: *αυλος*: “tubo, flauta” e *νεμος*: “pastagem arborizada, clareira” ou “malha, filamento”, como sugerido por outros pode ser traduzido como *flauta dos campos*. O gênero pertence à subtribo *Arthrostylidiinae* e é composto de 38 espécies, dos quais a maioria está distribuída na América Latina (QUATTROCCHI, 2006; SHIRASUNA, 2012). No Brasil, 13 espécies crescem, onde a taxa do endemismo é muito alta (12 espécies). Os tipos de vegetações preferidos dessas espécies

de bambu são, entre outros: campos de altitude, Cerrado, florestas e savana Amazônica (FLORA DO BRASIL, 2020).

As espécies de *Aulonemia* se caracterizam pelas seguintes características:

- Rizoma - curto, grosso, paquimorfo ou anfimorfos
- Colmos - com várias folhas acima do meio, eretos ou junto com a vegetação
- Ramos medianos - solitários e quase tão grandes quanto o colmo principal
- Entrenós-cilíndricos, sólidos, glabros ou pilosos
- Folhas - largas, lanceoladas ou ovadas

Na Figura 2 observa-se a ilustração das características principais das partes aéreas para uma espécie de *Aulonemia*. Por outro lado, a distribuição dessas espécies no continente americano pode ser vista na Figura 3.

Figura 2. Principais características morfológicas tendo como exemplo a ilustração botânica para *Aulonemia viscosa* (Hitchc.) McClure.

A – panícula; **B** – espiguetas; **C** - entrenós do colmo com uma folha única.

Fonte: POHL, 1980.

Figura 3. Distribuição das espécies de *Aulonemia* Goudot no continente americano.

Fonte: BYSTRIAKOVA; KAPOs; LYSENKO, 2004.

1.2.2.2. *Chusquea*

Chusquea Kunth, incluído na subtribo *Chusqueinae*, é considerado o gênero mais abundante de bambus, com cerca de 200 espécies na América Central, América do Sul e Índia Ocidental (CLARK, 1996, 1997). A maioria das espécies ocorre em três grandes áreas de endemismo centradas no sudeste do Brasil, na Cordilheira dos Andes e na América Central (SODERSTROM; JUDZIEWICZ; CLARK, 1988; CLARK, 1989, 1997).

De acordo com FLORA DO BRASIL 2020, o Brasil possui 46 espécies de *Chusquea*, 42 endêmicas, distribuídas entre Amazônia, Caatinga e Mata Atlântica.

Aspectos gerais das partes principais das espécies do gênero *Chusquea*:

- Rizoma - paquimorfo, raramente leptomorfo e anfimorfo
- Colmos - eretos, arqueados ou decumbentes
- Entrenós - cilíndricos, sólidos, glabros, pilosos ou escabros
- Ramos - presença de um ramo central dominante
- Folhas - folhas do colmo distintas com as folhas dos ramos

As características mais relevantes das partes aéreas de *Chusquea* spp. são demonstradas na Figura 4, enquanto, a Figura 5 apresenta a distribuição deste gênero.

Figura 4. Ilustração com as características morfológicas de *Chusquea meyeriana* Rupr. ex Döll.

A – colmo; B – inflorescência e folhas; C – espiguetas; D – bainha do colmo: lâmina e lígula.

Fonte: POHL, 1980.

Figura 5. Distribuição das espécies de *Chusquea* Kunth nas Américas.

Fonte: BYSTRIAKOVA; KAPOs; LYSENKO, 2004.

1.2.2.3. *Merostachys*

Merostachys Spreng. pertencente à subtribo *Arthrostylidiinae* e as suas espécies têm a ocorrência na região entre México e Argentina em habitats florestais. O Centro e Sul do Brasil constituem os centros de diversidade deste gênero (OHRNBERGER; GOERRINGS 1984, JUDZIEWICZ et al. 1999, JUDZIEWICZ; CLARK, 2007), possuindo 46 espécies, entre quais, 44 são endêmicas (FLORA DO BRASIL, 2020).

As características morfológicas principais das espécies deste gênero são:

- Rizoma - pescoço curto (*short-necked*) ou raramente longo (*long-necked*), paquimorfo
- Colmos - eretos na base
- Entrenós - cilíndricos, glabros, pilosos ou velutinos
- Ramos medianos - vários, sem ramo dominante
- Inflorescência (panícula) - unilateral, densa, as espiguetas solitárias ou pareadas
- Folhas - com fimbrias apicais livres ou unidas na base ou nulas

A Figura 6 mostra os aspectos morfológicos das partes aéreas para as espécies de *Merostachys* e, a figura 7 ilustra a densidade delas nas Américas.

Figura 6. Principais características das partes aéreas das espécies de *Merostachys* Spreng.

A – ramo; **B** – um par de espiguetas; **C** – botão floral.

Fonte: POHL, 1980.

Figura 7. Densidade de espécies de *Merostachys* Spreng. na América-latina.

Fonte: BYSTRIAKOVA; KAPOŠ; LYSENKO, 2004.

1.2.3. Atividades biológicas e composição química

1.2.3.1. Espécies Asiáticas

As espécies asiáticas de bambu são aquelas para as quais se encontra a maioria dos estudos sobre atividades biológicas. Uma das atividades mais reconhecida para essas plantas é o potencial antioxidante (frequentemente avaliado como atividade antirradicalar) e, por

consequência ação neuroprotetora, que foram atribuídas principalmente à presença de grande quantidade de ácidos fenólicos e flavonoides (HU; ZHANG; KITTS, 2000, KWEON; HWANG; SUNG, 2001, AKAO et al., 2004, HONG et al. 2010, PANDE; KUMAR; VARSHNEY, 2018, KIM et al., 2009). Outros efeitos biológicos, como anti-inflamatório, antidiabético, hepatoprotetor e prebiótico foram relacionados com a presença de polissacarídeos específicos (CHEN et al., 2018, HUANG et al., 2017, LIU et al., 2018, DING et al., 1998). A presença de triterpenoides, como fridolina e lupeol (ZHANG et al, 2004) foi associada com a atividade antitumoral e o efeito antifadiga observado *in vivo* em ratos (LU et al, 2010, ZHANG et al., 2006), enquanto a ação antimicrobiana, antifúngica e antiparasitária foi justificada pela presença de derivados de benzoquinona (NISHINA and UCHIBORI, 1991) ou sequiterpenos (TAO et al., 2018). Além disso, foram ainda reportadas seguintes atividades biológicas para essas plantas: anticonvulsivante (ZHANG et al., 2018), cicatrizante (WEDLER et al., 2014), anti-hipertensiva (PARK e JHON, 2010) e hipomelanogênica (CHOI et al., 2018) as quais também foram atribuídas aos compostos fenólicos. O Quadro 1 apresenta um resumo das atividades biológicas descritas para os bambus asiáticos, incluindo nome das espécies, os compostos isolados e mecanismo de ação dos mesmos.

Quadro 1. Atividades biológicas de bambus asiáticos (cont.).

Atividade	Espécie de bambu	Classe	Composto	Mecanismo de ação	Referência
Anticonvulsiva	<i>Dendrocalamus asper</i> (Schult. & Schult. f.) Backer ex K. Heyne	Ácidos fenólicos (A)	ácido <i>p</i> -hidróxibenzoico (A)	Inativação de canal de potássio, diminuição de potencial da membrana neuronal	Zhang et al., 2018
Antifadiga	<i>Bambusa tuldoidea</i> Munro	Triterpenoides (B)	lupenona (B), friedelanona (B), lupenol (B), α -amirina (B), oleanano (B)	Modificação de níveis nitrogênio sérico, glicogênio hepático e ácido láctico no sangue de ratos	Zhang et al., 2006
Anti-inflamatória e cicatrizante	<i>Phyllostachys edulis</i> (Carrière) J. Houz.	Flavonas (C)	iso-orientina (C)	Diminuição de produção de citocinas pro-inflamatórias, indução de angiogênese	Wedler et al., 2014
Antimicrobiana	<i>Phyllostachys heterocycla</i> var. <i>pubescens</i> (Pradelle) Ohwi	Sesquiterpenos (D); alcanos lineares (E), ácido graxos (F)	cedrol (D); tricosano (E); ácido hexadecanóico (palmítico) (F)	Inibição de crescimento de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (mecanismo não conhecido)	Tao et al., 2018

Atividade	Espécie de bambu	Classe	Composto	Mecanismo de ação	Referência
Antioxidante	<i>Phyllostachys nigra</i> var. <i>henonis</i> (Mitford) Stapf ex Rendle	Ácidos fenólicos (A); flavonas (C)	ácido clorogênico (A), ácido caféico (A); derivado de luteolina (C)	Atividade antirradicalar e inibição de peroxidação lipídica	Hu; Zhang; Kitts, 2000
	<i>Bambusa nutans</i> Wall. ex Munro	Flavonas (C); flavonóis (G); e ácidos fenólicos (A)	vitexina (C), isovitexina (C), homo-orientina (C), luteolina (C), apigenina (C), tricina (C); quercetina (G), rutina (G); ácido caféico (A), ácido <i>p</i> -cumárico (A), ácido ferúlico (A), ácido sinápico (A)	Atividade sequestradora e efeito quelante	Pande; Kumar; Varshney, 2018
	<i>Phyllostachys nigra</i> (Lodd. ex Lindl.) Munro	Flavonas (C)	orientina (C), iso-orientina (C), vitexina (C), derivado de luteolina (C), tricina (C)	Atividade redutora de radicais livres	Kim et al., 2009
Antioxidante e anti-hipertensiva	<i>Phyllostachys pubescens</i> (Pradelle) Mazel ex J. Houz., <i>Phyllostachys nigra</i> (Lodd. ex Lindl.) Munro	Catequinas (H); ácidos fenólicos (A)	catequina (H); ácido <i>p</i> -cumárico (A), ácido caféico (A), ácido clorogênico (A), ácido ferúlico (A), ácido siríngico (A)	Atividade sequestradora, inibição de conversora de angiotensina	Park e Jhon, 2010
Antioxidante e hipo-melanogênica	<i>Phyllostachys nigra</i> var. <i>henonis</i> (Mitford) Stapf ex Rendle	Catequinas (H); ácidos fenólicos (A)	Catequina (H); ácido clorogênico (A), ácido caféico (A), ácido <i>p</i> -cumárico (A)	Atividade antirradicalar, supressão de tirosinase e outras enzimas participantes na produção da melanina	Choi et al., 2018
Antitumoral	<i>Phyllostachys nigra</i> var. <i>henonis</i> (Mitford) Stapf ex Rendle	Triterpenoides (B)	Friedelina (B), friedelinol (B), lupenona (B), lupenol (B)	Supressão da proliferação de células cancerígenas	Lu et al., 2010

Atividade	Espécie de bambu	Classe	Composto	Mecanismo de ação	Referência
Hepatoprotetora	<i>Indocalamus tessellatus</i> (Munro) Keng f.	Polissacarídeos (I)	(I) polímeros de ácido glicurônico, fucose, arabinose, xilose, ramnose, galactose, manose, glicose	Diminuição do malondialdeído, aumento da atividade da superóxido dismutase hepática	Ding et al., 1998
Hipoglicemiante	<i>Phyllostachys heterocycla</i> (Carrière) S. Matsum.	Polissacarídeos (I)	Arabinogalactano (I)	Inibição de assimilação de glicose	Liu et al., 2018
Imuno-moduladora, anti-inflamatória, anti-diabética, prebiótica	<i>Phyllostachys pubescens</i> (Pradelle) Mazel ex J. Houz.	Polissacarídeos (I)	Hemicelulose (I)	formação de hemolisina, ativação de células esplênicas e função fagocítica; integração da barreira intestinal, aumento de metabolismo de lipídeos e proteção contra resistência à insulina	Huang et al., 2017; Chen et al., 2018
Neuroprotetora	<i>Phyllostachys bambusoides</i> Siebold & Zucc.	Ácidos fenólicos (A)	derivados de lignina (A)	Inibição de caspase 3 e apoptose celular	Akao et al., 2004
	<i>Phyllostachys bambusoides</i> Siebold & Zucc., <i>Phyllostachys pubescens</i> (Pradelle) Mazel ex J. Houz., <i>Phyllostachys nigra</i> (Lodd. ex Lindl.) Munro	Ácidos fenólicos (A)	fenol, furfural, <i>o</i> -cresol, <i>o</i> -xilenol, guaiacol, siringol e seus derivados (produtos da pirólise das ligninas) (A)	Redução de apoptose e aumento da viabilidade das células neuronais, efeito anti-plasmático, antagonismo aos receptores NMDA	Hong et al., 2010

As letras significam classe de metabólito secundário. **A** – ácidos fenólicos, **B** – triterpenoides, **C** – flavonas, **D** – sesquiterpenos, **E** – alceno de cadeia linear, **F** – ácidos graxos, **G** – flavonóis, **H** – catequinas, **I** – polissacarídeos

1.2.3.2. Espécies nativas do Brasil

Apesar da importância para a dinâmica da floresta (DOS SANTOS; BUDKE; MULLER, 2012), não existem muitas informações da composição química e atividades biológicas das espécies de bambu brasileiras. Em alguns estudos, foi avaliado o potencial

alelopático dos extratos aquosos dos colmos, folhas e rizomas de *Chusquea meyeriana* Rupr. ex Döll, *Chusquea heterophylla* Nees, *Merostachys magellanica* Send. e *Merostachys speciosa* Spreng.. Análise química preliminar dos extratos de folhas de *C. meyeriana* e *M. magellanica* indicou a presença de ácido clorogênico, ferúlico e cafeico (GROMBONE-GUARATINI et al., 2011). Em ensaio semelhante, *Aulonemia aristulata* (Döll) McClure inibiu a germinação das sementes de alface devido à presença dos compostos fenólicos (GROMBONE-GUARATINI et al., 2009). Efeito parecido foi observado para esse grupo de compostos em *Merostachys riedeliana* (JOSE et al., 2016). *A. aristulata*, *C. meyeriana*, *M. magellanica* e *Merostachys pluriflora* Munro ex E.G. Camus e apresentaram certa atividade antioxidante, antimicrobiana e antifúngica (ISSA, 2015, MORENO et al., 2011, TORRES et al., 2014, GAGLIANO; FURLAN, 2015, GAGLIANO; GROMBONE-GUARATINI; FURLAN, 2018). Entre os compostos identificados nestas espécies podem ser destacados flavonoides: derivados de orientina, vitexina, isovitexina, apigenina, luteolina e os ácidos benzóico, salicílico, *p*-hidroxibenzóico, vanílico, *p*-cumárico, siringico, gálico, ferúlico e seus derivados (GAGLIANO; GROMBONE-GUARATINI; FURLAN, 2018, JOSE et al., 2016).

1.2.4. Biossíntese de compostos presentes em bambus

Os metabólitos mais frequentes em bambus são ácidos fenólicos, flavonoides e triterpenos. Os compostos fenólicos tais como ácidos fenólicos e flavonoides são produzidos pelas plantas pela via do ácido chiquímico, que dá origem aos aminoácidos aromáticos (*L*-fenilalanina, *L*-tirosina e *L*-triptofano), os quais via desaminação dão origem aos respectivos ácidos. Por exemplo, *L*-fenilalanina através da eliminação de amônia, forma o ácido cinâmico que por sua vez pode ser sofrer hidroxilações adicionais ou metoxilações dando origem ao ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico (ácidos C₆C₃). Estes ácidos, seguinte, podem ser reduzidos formando os álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico, que são o começo da rota biossintética para os grandes polímeros de ligninas (figura 8). Alternativamente, as substâncias como guaiacol e siringol são os produtos da degradação das ligninas.

Figura 8. Biossíntese de lignina.

L-Phe – L-fenilalanina; **L-Tyr** – L-tirosina; **PAL** – phenylalanine ammonia lyase (ing.), fenilalanina amônia-liase (port.); **NADPH** – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; **SAM** – S-adenosilmetionina.

Fonte: DEWICK, 2002

A biossíntese de flavonoides é mais complexa pois envolve a incorporação de dois anéis aromáticos na molécula. Além do anel aromático derivado do ácido chiquímico, os flavonoides possuem outro anel criado pela condensação de 3 unidades de malonil coenzima A (malonil-CoA), denominada via do acetato. Na figura 9 podemos ver a biossíntese de flavonoides e ligninas nas plantas de forma esquemática.

Figura 9. Esquema simplificado para a biossíntese de ligninas e flavonoides.

Fonte: adaptado de BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2015 (p. 349, 951).

Malonil-CoA e acetilcoenzima A (acetil-CoA), são produtos do metabolismo primário e também dão o começo para as cadeias de ácidos graxos tais como ácido palmítico ($C_{16}H_{32}O_2$) e alguns ácidos fenólicos simples pela reação de ciclização e enolização. Ácido produzido neste processo é por exemplo ácido 6-metilsalicílico, que dá origem ao cresol. Acetil-CoA também é o precursor do ácido mevalônico que forma as unidades de isopreno (C_5), que iniciam a produção de estruturas de sesqui- (C_{15}) e triterpenos (C_{30}). Os compostos mais comuns em bambus estão desenhados nas figuras 10 – 12.

Figura 10. Ácidos fenólicos presentes em bambus.

Figura 11. Flavonoides presentes em bambus.

Figura 12. Triterpenoides presentes em bambus.

A presença de ligações duplas e anéis aromáticos nas estruturas dos compostos de bambus confere a eles capacidade de absorção da radiação ultravioleta, e potencialmente uma ação fotoprotetora, como por exemplo, o ácido ferúlico, que foi capaz de aumentar o fator de proteção solar dos filtros sintéticos em 37% em um ensaio *in vivo* (PERES et al., 2018). Adicionalmente, há uma patente de protetor solar que usa acilgliceróis substituídos por grupos de ferulila ou cumarila de origem natural, e outra utilizando triterpenoides de bambu como componente antioxidante (ZHANG et al. 2010, COMPTON et al. 2012). No mercado de filtros solares, já apareceram os primeiros produtos, que contém extratos de bambus (por exemplo produto da marca: Boo bamboo[®]), porém, a sua eficácia não foi comprovada cientificamente. O emprego dessas espécies em formulações ainda necessita maiores estudos de suas propriedades biológicas, entre outras – fator de proteção solar (FPS) *in vitro* e *in vivo*.

1.3. Radiação solar

A radiação solar é uma radiação eletromagnética extremamente reativa, teve grande impacto na evolução da vida na Terra como um fator mutagênico (HESSEN, 2008). Ela contém todos os componentes do espectro eletromagnético, o qual é dividido em 7 bandas dependendo do seu comprimento de onda, de 10^{-14} m até 10^4 m: radiação γ gama, raios X, radiação ultravioleta (UV), luz visível, infravermelha, micro-ondas e ondas de rádio (esquema na figura 13). Porém, mais da metade desta energia chega na superfície da terra como luz visível, e quase todo o restante é composto pelo infravermelho próximo e radiação ultravioleta, a entrada dos demais componentes na atmosfera é reduzida. Esta radiação é quantizada por fótons, capazes de reagir com as células dos organismos terrestres (MATTS, 2006), e por causa disso, sempre foi conhecida de seus efeitos distintos: saudáveis e nocivos aos seres vivos.

Figura 13. Divisão da radiação eletromagnética.

γ – radiação gama; **X** – raios X; **UV** – radiação ultravioleta; **Vis** – radiação visível; **IV** – radiação infravermelha; **micro** – micro-ondas; **radio** – ondas de rádio.

Parte dessa radiação é responsável por fornecer a energia necessária para a fotossíntese, que ocorre nos organismos fotoautotróficos, aqueles que a usam para fixar o carbono atmosférico, tais como, algas, plantas e cianobactérias. Dessa maneira, a luz solar cria a base da cadeia alimentar e da vida para os animais superiores, chamados de consumidores (figura 14).

Figura 14. Esquema de cadeia alimentar na Terra.

Fonte: modificado de: <http://kiarats2.blogspot.com/2016/08/food-web-food-chain-black-rhino.html>.

A radiação UV é a parte mais estreita de toda faixa da radiação solar (aproximadamente: entre 200 - 400 nm), mas é a região que reage mais com os organismos vivos. Ela é fundamental para a formação da vitamina D dos vertebrados, que foi determinada como essencial para o a fixação do cálcio no esqueleto desses animais terrestres (HOLICK; TIAN; ALLEN, 1995). Além de sua participação na biossíntese da vitamina D, ela tem um efeito positivo em várias doenças da pele como psoríase, vitiligo, dermatite atópica e esclerodermia localizada, inibe os sintomas da esclerose múltipla e reduz a pressão de arterial através da indução da geração de óxido nítrico. Adicionalmente, tem uma função crucial no ritmo circadiano e no bem-estar, o que é relacionado a liberação de beta-endorfinas com ação antidepressiva (JUZENIENE; MOAN, 2012, JUSSILA et al., 2016, HOLICK, 2016, ROSENTHAL et al., 1984).

Não há dúvida que a radiação UV é essencial para a vida de todos organismos, porém, dados recentes sobre seus danos na saúde humana são preocupantes. Somente nos Estados Unidos, mais de 3 milhões de pessoas foram tratados para o câncer de pele no ano 2012, e quase 100 mil novos casos da doença foram previstos para ano 2018 (American Cancer Society, 2018). Neste país, o custo anual do tratamento de câncer da pele é estimado em mais de US\$ 8 bilhões (GUY et al., 2015). No Brasil, estão registrados cada ano aproximadamente 180 mil novos casos de câncer da pele (Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2017). A tendência para a ocorrência desta patologia de pele está crescendo (APALLA et al., 2017). A mudança do clima, principalmente o aquecimento global, aumentando a densidade da irradiação UV (BHARATH; TURNER, 2009) – o fator principal responsável por câncer de pele – torna a resolução deste problema uma questão da maior importância.

1.3.1. Radiação UV

1.3.1.1. Divisão e efeitos nas células

A radiação ultravioleta (UV) é dividida em três bandas, dependendo do seu comprimento de onda: UVA, $\lambda = 400 - 320$ nm, UVB, $\lambda = 320 - 290$ nm e UVC, $\lambda = 290 - 200$ nm. UVA é seguinte dividida em UVA-2 (320 – 340 nm) e UVA-1 (340 – 400 nm). A radiação UVA alcança a Terra quase inalterada, enquanto UVB e UVC são absorvidas em 90% ou mais (UVC até 100%) pela camada de ozônio (DIFFEY, 2002, ROY, et al. 1998, HORNECK, 1995).

A banda UVA compreende 90 – 95% de toda radiação UV que atinge a terra e é considerada como "fator de envelhecimento". Essa radiação penetra a pele humana chegando até a derme, aproximadamente 1000 μ m de profundidade. A exposição prolongada é um dos

fatores responsáveis pela formação de tumores e carcinogênese. Ao contrário do UVC e UVB, a radiação UVA produz baixa quantidade de dímeros de pirimidina e os seus efeitos mutagênicos são causados principalmente pela indução de produção de espécies reativas de oxigênio (Reactive Oxygen Species – ROS). ROS são divididos em dois grupos: radicais livres e não-radicais. As moléculas que possuem um ou dois elétrons não pareados são radicais livres. Um par de radicais que reage compartilhando os elétrons desemparelhados geram as formas não radicalares. As ROS mais importantes são: ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais de hidroxila ($\bullet OH$) e peroxila ($ROO\bullet$). Estas formas altamente reativas, criadas nas mitocôndrias ou peroxissomas, têm a função regulatória na sinalização das células, porém, em desequilíbrio estimulam o estresse oxidativo, processos inflamatórios e o enrugamento da pele (BACHELOR; BOWDEN, 2004, BIRBEN et al., 2012).

O UVB que constitui cerca de 5% da radiação UV solar e penetra a pele menos profundamente do que UVA (160 –180 μm), atravessando a camada da epiderme, mas não atinge o compartimento da derme. Sendo a radiação mais energética, é o fator principal responsável pelos danos no DNA e câncer da pele – melanoma. Além dos efeitos mutagênicos, o UVB também provoca estresse oxidativo, inflamação crônica e processos de envelhecimento na pele (SAEWAN; JIMTAISONG, 2013, DIFFEY, 2002; ROY, et al. 1998; HORNECK, 1996).

Embora a faixa da luz da UVC normalmente não atinja a terra, estes comprimentos de onda são fortemente mutagênicos. Essa radiação pode penetrar a pele a uma profundidade de 60 –80 μm e danificar gravemente as células da pele (PARK et al., 2013; DE GRUIJL; VAN DER LEUN, 1994).

A figura 15 mostra a relação entre UVB e UVA junto com a radiação próxima ao infravermelho, com comprimento de onda 760 – 1440 nm, qual também pode ter um impacto em envelhecimento da pele (SCHROEDER; HAENDELER; KRUTMANN, 2008).

Figura 15. Relação de penetração da pele humana de radiação dependendo do comprimento da onda.

Fonte: Polefka et al., 2012.

1.3.1.2. Mecanismo de ação e interações com as moléculas biológicas

Existem dois tipos de interações da radiação eletromagnética com as biomoléculas: diretas e indiretas. As interações diretas incluem a reação de absorção da radiação pelo DNA que diretamente será responsável pelos danos mutagênicos. As interações indiretas ocorrem quando outras moléculas, tais como melanina, DNA, ou proteínas absorvem a radiação UV e dissipam a energia absorvida com a geração de ROS, porfirinas, NADPH oxidase, riboflavinas e outras moléculas fotosensibilizadoras (BIRBEN et al., 2012, POLEFKA et al. 2012, MATSUMURA ANANTHASWAMY, 2004). As transformações diretas induzidas pela radiação UV na estrutura genética das células vêm pela formação de dímeros covalentes de pares de DNA e RNA, tais como dímeros de ciclobutano pirimidina (CPDs) e dímeros de pirimidina (6-4) pirimidinona (6-4 PPS). Estes compostos não são reconhecíveis pelas enzimas de polimerase, enzimas envolvidas na prorrogação do DNA, sendo eliminadas do código genético com o objetivo de permitir a replicação e transcrição dos ácidos nucleicos para manter a sobrevivência das células, formando uma mutação nesse local (BRITT; MAY, 2003).

O tempo de exposição à radiação UV é essencial para definir as potenciais ações fisiológicas. Após exposição aguda, podem ser destacados as seguintes reações em humanos: queimadura solar, danos no DNA e supressão do sistema imunológico. A queimadura solar, ou também denominada de eritema, em diferentes palavras vermelhidão de pele, é um dos primeiros sinais da irradiação da pele. Pode ocorrer imediatamente em contato com o sol, mas tem o seu pico entre 8 e 24 horas depois da exposição (SAUNDERS; DIFFEY, 1995). As modificações histológicas como edema cutâneo e hiperplasia começam a ocorrer logo depois da exposição, tendo seu pico após 24 – 48 horas (TEDESCO; MARTÍNEZ; GONZÁLEZ, 1997). O conjunto destes processos resulta na indução da proteína p53, que induz os mecanismos de reparo de DNA e apoptose celular, e inibe a angiogênese. Numa exposição crônica observa-se fotoenvelhecimento, danos no DNA, imunossupressão, mutações genéticas e carcinogênese (MATSUMURA ANANTHASWAMY, 2004). Um mecanismo de defesa do corpo humano contra radiação UV é a produção de melanina, um composto que absorve a radiação UV e, por sua coloração, causa o bronzeamento da pele (MOHANIA et al., 2017).

A radiação solar causa os danos genéticos e processos inflamatórios semelhantes nas plantas, porém, estes organismos vivos, em sua evolução, começaram a produzir uma série de moléculas capazes de absorver os raios UV. Já a presença de pequenas quantidades de CPDs induz nas plantas as modificações estruturais e a síntese de metabólitos secundários com capacidade fotoprotetora: flavonoides, taninas e ligninas (ROZEMA et al. 1997; BASSMAN 2004). Como anotado anteriormente, o que confere esta atividade para estas moléculas são as ligações duplas e anéis aromáticos. Por outro lado, para diminuir os efeitos malignos da irradiação não filtrada, os compostos fenólicos são também, devido a suas capacidades quelantes e redutoras, excelentes sequestradores de radicais livres e antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). O que foi comprovado é, que as plantas são capazes de aumentar a produção destes compostos com o aumento da intensidade da irradiação (WATSON, 2014). As plantas cultivadas em locais altamente expostos aos raios UV, por exemplo em baixas latitudes, produzem uma quantidade maior dos compostos fotoprotetores e apresentam a melhor resistência à radiação, do que as plantas que crescem em ambientes menos expostos (FROHNMEYER; STAIGER, 2003). Os compostos fenólicos são muito populares no mercado farmacêutico de fitoterapia por causa de suas outras diversas ações, entre outras: anti-inflamatória, antialérgica, antiviral e anticarcinogênica (NIJVELDT et al., 2001), o que potencializa seu valor em uso medicinal.

1.3.1.3. Fotoproteção

Para prevenir as alterações danificadoras do DNA, câncer e envelhecimento da pele, a proteção contra radiação solar é essencial no dia-dia de todos, especialmente nas pessoas mais expostas a luz solar. A prevenção inclui diminuição a exposição ao sol (quando possível), uso de roupa adequada e filtros solares (BALOGH et al., 2011).

Um bom protetor solar deve ter um amplo espectro de ação contra a radiação UV e a absorver em várias regiões – tais como UVA como UVB. Os filtros solares costumam ser separados em orgânicos ou inorgânicos. Os filtros orgânicos absorvem a radiação UV e têm espectro de atividade estreito, enquanto os inorgânicos podem a absorver, refletir ou dispersar. Os primeiros filtros orgânicos usados numa formulação fotoprotetora foram os ésteres salicilato e cinamato de benzila, logo depois seguidos pelo salicilato de fenila e derivados de ácido *p*-aminobenzóico (PABA). Atualmente, a maioria deles não está sendo mais usada por causar reações alérgicas e irritação na pele. As substâncias modernas do mesmo grupo, por exemplo, Avobenzona[®] e Ecamsule[®] (ácido tereftalideno dicamforil sulfônico), filtro solar exclusivo da marca L'Oréal, são conhecidos por serem instáveis, sofrendo rápida fotodegradação (ABID et al., 2017), o que é lhes dá uma grande desvantagem. Filtros orgânicos, frequentemente, são capazes de absorver uma faixa estreita faixa dos raios UV, e, por causa disso, usa-se misturas de duas ou mais substâncias para aumentar sua eficácia. Infelizmente, algumas destas combinações podem ser tóxicas para os tecidos humanos (BUTT; CHRISTENSEN, 2000). Alguns exemplos de filtros orgânicos estão demonstrados na figura 16.

Figura 16. Filtros solares orgânicos.

Os filtros inorgânicos agem como os bloqueadores físicos refletindo a radiação, e os exemplos mais comuns são: dióxido de titânio e óxido de zinco. Estes, por outro lado, dão a coloração (opaca ou branca) para as formulações cosméticas, o que limita ou as vezes impede seu uso (CEFALI et al., 2016). Adicionalmente, as últimas pesquisas relatam, que estes óxidos podem ainda originar as formas reativas de oxigênio, tais como radicais de hidroxila, catalisando a oxidação do DNA (DUNFORD et al., 1997).

Os organismos vivos contêm vários cromóforos, ou seja, as substâncias que tem capacidade de absorver a energia da luz UV, como ácidos nucleicos, proteínas (SVOBODOVÁ; PSOTOVÁ; WALTEROVÁ, 2003), e outras moléculas específicas para esta defesa, como melanina, nos humanos. No caso das plantas, são, entre outros, os compostos fenólicos, ácidos fenólicos e flavonoides, que inspiraram a obtenção dos filtros solares sintéticos (POLONINI; BRANDÃO; RAPOSO, 2014). Ácidos fenólicos, tais como derivados de ácido hidróxi-cinâmico, ácido *p*-cumárico, ferúlico e caféico, por conter apenas um anel aromático, possuem uma banda de absorção na região UV. A maioria deles, absorve a luz entre os comprimentos de onda 280 e 320 nm (GAGLIANO; GROMBONE-GUARATINI; FURLAN, 2018; AMAROWICZ; WEIDNER, 2001) e, por causa disso, são atenuadores de UVB. Os flavonoides

são as moléculas construídas por dois anéis de aromáticos (A e B) unidos por um anel heterocíclico de pirano ou pirona (com uma ligação dupla) (C) no meio. Por causa da presença dos dois cromóforos, eles apresentam duas bandas de absorção para a radiação UV: uma entre 240 e 285 nm, atribuída ao anel A, e outra entre 300 até 550 nm, correspondendo à ligação do anel C com B (WATSON, 2014; VIHAKAS, 2014). Dependendo da conexão entre anel B e C, estado de oxidação e grupos funcionais, são divididos em 6 subclasses: flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, flavanóis e antocianidinas (SAEWAN; JIMTAISONG, 2013), conforme a figura 17.

Cada subclasse tem as propriedades diferentes referindo à absorbância da luz UV. Flavonas, flavonóis e flavanóis absorvem em $\lambda = 280$ e 350 nm. Flavanonas e isoflavonas possuem seus máximos de absorção, respectivamente, entre $280 - 290$ e $236 - 262$ nm. Antocianidinas tem a segunda banda de absorção mais deslocada; entre 465 e 560 nm (WATSON, 2014). Assim, seus espectros de absorção no UV são muito amplos e podem providenciar a proteção contra UVA, UVB e UVC.

Figura 17. Estrutura geral dos flavonoides.

Flavanona: R_3 H, R_4 CO; **Flavanol:** R_3 OH, R_4 H; **Flavona:** $C_2=C_3$, R_3 H, R_4 CO; **Flavonol:** $C_2=C_3$, R_3 OH, R_4 CO; **Antocianidina** $O_1=C_2$, $C_3=C_4$, R_4 H ou OH + carga positiva em anel C; **Isoflavona:** migração de arila para C_3 , R_4 CO, R_1 / R_2 H ou OH.

Fonte: adaptado de STAFFORD, 1991.

Coefficiente molar (ϵ) é um parâmetro que descreve quanto a substância absorve a radiação em dado comprimento de onda. Na maioria dos casos, é um valor fixo, que depende das características da molécula e do solvente (TOLBIN; PUSHKAREV; TOMILOVA, 2018). De acordo com a lei de Lambert-Beer, a absorvância de uma substância é diretamente proporcional ao seu ϵ , concentração e a distância percorrida pela luz no recipiente com amostra conforme a equação 1.

Equação 1. Cálculo da absorvância.

$$A(\lambda) = \epsilon(\lambda) \times c \times d$$

Onde, **A** = absorvância em comprimento de onda (λ) = X; ϵ = coeficiente molar em comprimento de onda (λ) = X; **c** = concentração da amostra; **d** = distância percorrida pela luz.

A absorvância também está relacionada com a transmitância da luz, isto é a quantidade de luz que consegue passar pela amostra sem ser absorvida. A relação entre esses dois efeitos está representada abaixo (equação 2):

Equação 2. Relação entre absorvância (A) e transmitância (T).

$$-\log T(\lambda) = A(\lambda)$$

Por definição, a transmitância define o quanto da radiação incidente diminuiu após passar por uma substância de acordo com equação 3.

Equação 3. Cálculo de transmitância.

$$T(\lambda) = \frac{I_c(\lambda)}{I_{co}(\lambda)}$$

Onde, **T** = transmitância; **I_{co}** = intensidade da luz depois de passar solvente puro; **I_c** = intensidade da luz depois de passar o solvente com amostra.

Esses fatores são empregados na estimativa do valor do potencial fotoprotetor de uma substância química em meio líquido ou na formulação, *in vitro*, antes de submeter as amostras em ensaios com humanos (HERZOG; SCHULTHEISS; GIESINGER, 2018).

Os ácidos fenólicos têm o maior ϵ entre 310 e 325 nm, enquanto, os flavonoides têm o coeficiente molar máx. em comprimentos de onda igual ou acima de 350 nm (AGATI; TATTINI, 2010, TATTINI et al., 2004). A relação entre as estruturas de diferentes compostos fenólicos de plantas e os valores para os seus λ_{max} e ϵ estão apresentadas na figura 18.

Flavonoides são muito comuns no reino vegetal e dependendo da espécie, têm formas e atividades diferentes, frequentemente ocorrendo como glicosídeos. Conforme a sua estrutura molecular, elas têm mecanismo de ação diferente, e além de ser bloqueadores de radiação UV, diminuem seus efeitos deletérios nas células. As revisões disponíveis na literatura (SAEWAN; JIMTAISONG, 2013 AFAQ, 2011) explicam bem estas interações. Apigenina, como exemplo de uma flavona, tem atividade antioxidante e antirradicalar. Ela protege as células contra carcinogêneses induzida pelo UVA e UVB, e bloqueia a expressão de ciclo-oxigenase 2 (COX-2) - fator inflamatório. Um representante mais potente de flavonóis, quercetina inibe os processos oxidativos nas células, modulando a indução de enzimas tais como peroxidase e redutase de glutathione, catalase e superóxido dismutase. Silimarina, uma mistura de duas flavonolignanas diastereoisoméricos silibina A e silibina B, tem atividade antioxidante e antimutagênica. Por outro lado, os isoflavonoides (como genisteína) são conhecidos pelo seu efeito estrogênico e atividade contra enzima tirosina quinase inibindo a proliferação celular e da angiogênese. Nas catequinas (flavanóis) predomina o efeito antioxidante e sequestrador de radicais. Antocianinas, as moléculas capazes de absorver a radiação visível e responsáveis pelas cores de flores de várias plantas, têm atividades anti-inflamatórias, antioxidante e protetoras

contra danos de DNA. A antocianina delphinidina protege indiretamente contra os danos no DNA melhorando a estabilidade genômica. Outros polifenóis têm atividade imunomoduladora reduzindo a ativação do fator de transcrição NF- κ B provocado pela radiação UV, ou inibem a oxidação de proteínas e lipídeos. Um resumo de diversas atividades de flavonoides pode ser encontrado no quadro 2.

Figura 18. Estruturas químicas de derivados de ácido hidroxicinâmico e flavonoides glicosilados e seus valores de λ_{max} e ϵ .

Composto	Estrutura	λ_{max}	ϵ	
			$f_{290\text{ nm}}^{320\text{ nm}}$	$f_{321\text{ nm}}^{390\text{ nm}}$
<i>ácido p-cumárico</i>		312	4.5E+05	0.048E+06
<i>ácido caféico</i>		327	4.6E+05	0.66E+06
<i>apigenina-7-glicosídeo</i>		337	3.9E+05	0.92E+06
<i>luteolina-7-glicosídeo</i>		348	2.5E+05	0.81E+06
<i>quercetina-3-glicosídeo</i>		355	3.5E+05	1.0E+06
<i>kaempferol-3-glicosídeo</i>		351	3.9E+05	1.3E+06

Fonte: Agati et al. 2013.

Quadro 2. Diferentes flavonoides e suas propriedades antirradiação UV.

Flavonoide	Estrutura	Subclasse	Atividade	Proteção UV
Apigenina		Flavona	Anti-inflamatória, sequestradora	UVA, UVB
Quercetina		Flavonol	Antioxidante	UVA, UVC
Silimarina (mistura de dois isômeros de silibinina: A e B)		Flavanonol	Antioxidante, anti-inflamatória	UVB
Genisteína		Isoflavona	Antioxidante, anticancerígena	UVA, UVB
Catequina		Flavanol	Sequestradora	UVB
Cianidina		Antocianidina	Antioxidante, sequestradora	UVA, UVB

Outros metabólitos fotoprotetores podem ser encontrados em óleos vegetais. γ -Orizanol, um composto do óleo de farelo de arroz inibe a peroxidação lipídica causada pelos raios UV, sendo usado em formulações fotoprotetoras (PATEL; NAIK, 2004). A mesma ação foi confirmada para sesamol, um componente de óleo de gergelim que foi capaz de proteger os

linfócitos do sangue humano contra o estresse oxidativo (PRASAD et al., 2005). O α – tocoferol (vitamina E), presente entre outros no óleo de gérmen trigo (*Triticum sativum* var. *vulgare* Hack.), tem papel importante contra fotoeritema, fotocarcinogênese e fotoenvelhecimento, melhorando ao mesmo tempo o estado da pele reduzindo nível de colagenase, enzima que lisa o colágeno (FRYER, 1993, KORÁČ; KHAMBHOLJA, 2011). Carotenoides, precursores de vitamina A, como β e α -caroteno, e β -criptoxantina, responsáveis pela cor das frutas e legumes como cenoura, abóbora, laranja e papaia, foram reconhecidos por seu efeito anti-inflamatório contra prostaglandinas E2, antirradiação UV nos fibroblastos e aumento de dose mínima de radiação causando o eritema (DAYAN, 2008, ZUSSMAN; AHDOUT; KIM, 2010). Os carotenoides, possuindo cadeias de carbono longas na sua estrutura absorvem principalmente a luz visível, em torno de 455 nm (COCKELL; KNOWLAND, 1999). A figura 19 mostra exemplos de outros compostos vegetais com atividade fotoprotetora.

Figura 19. Outros compostos derivados de plantas com atividade fotoprotetora.

Além de substâncias isoladas, existem vários dados confirmando a atividade fotoprotetora de extratos vegetais. Extrato de *Punica granatum* L. (romã) possuindo dois tipos de polifenóis – taninas e antocianinas, exibe ação forte antioxidante, antitumoral e inibe as moderações mutagênicas e processos inflamatórios induzidos pela radiação UV. Tratamento tópico com extrato de *Prunus amygdalus* Batsch, popularmente conhecida como amendoeira, reduziu peroxidação lipídica e aumentou o nível de glutathione (um antioxidante endógeno) agindo contra o envelhecimento na pele dos ratos. Os polifenóis presentes no extrato foram mais provavelmente as moléculas responsáveis pelo este efeito. Curcuminoides do extrato de *Curcuma longa* L. têm impacto positivo nas células afetadas pela radiação UV inibindo a expressão do TNF- α (factor de necrose tumoral). Entre vários outros, *Ginkgo biloba* L., *Aloe vera* (L.) Burm. f. e *Vaccinium myrtillus* L. e própolis, substância resinosa produzida por abelhas, demonstraram potencial antioxidante e fotoprotetor em ensaios *in vivo* (ABURJAI, 2019). Os extratos de plantas, ricos em diferentes moléculas atuando simultaneamente, podem fornecer ação mais complexa contra a radiação UV. As plantas, absorvendo a luz UV e agindo como antioxidantes são capazes de expandir o efeito fotoprotetor, melhorando a estabilidade das formulações de filtros solares, protegendo a pele contra estresse celular e danos genéticos causados pela parte da radiação não-filtrada (LIM; ARELLANO-MENDOZA; STENGEL, 2017, BADEA et al., 2015). Lembrando das desvantagens de filtros solares sintéticos, os vegetais constituem uma alternativa promissora para o mercado de cosméticos voltados ao efeito anti-UV e rejuvenescedor.

OBJETIVOS

2. Objetivos

Devido à falta de informações sobre as propriedades biológicas e a composição química das espécies de bambus nativas do Brasil, o objetivo principal deste projeto foi avaliar o potencial antioxidante e fotoprotetor, *in vitro* e *in vivo*, além de comparar sua composição química, para seguintes espécies: *Aulonemia aristulata* (Döll) McClure., *Chusquea bambusoides* Rupr. ex Döll, *Chusquea capituliflora* Trin. var. *pubescens* McClure, *Chusquea meyeriana* Rupr., *Merostachys pluriflora* Munro ex E.G. Camus.

Objetivos específicos:

- Determinação do potencial antioxidante de todos os extratos pela inativação do radical livre DPPH.
- Avaliação do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais nos extratos através dos reagentes de Folin-Ciocalteu e $AlCl_3$.
- Avaliação preliminar da composição química das espécies nativas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), usando como padrões os componentes majoritários encontrados nas espécies asiáticas.
- Desenvolvimento de formulações fotoprotetoras contendo extratos de bambus e filtros solares comerciais para determinação *in vitro* de seu Fator de Proteção Solar (FPS) e fotoestabilidade e posterior seleção do mais promissor para os ensaios *in vivo*.
- Avaliação preliminar da segurança do extrato mais promissor através de sua citotoxicidade frente a células epiteliais humanas (RPE).
- Fracionamento líquido-líquido do extrato selecionado com uma série de solventes de diferentes polaridades.
- Determinação da capacidade sequestradora do radical DPPH, teor de compostos fenólicos e flavonoides das frações.
- Preparo de uma nova formulação com o extrato selecionado e as frações com maior potencial antioxidante e concentração de fenólicos, com

ajustes de concentração, segundo os resultados preliminares, para a avaliação *in vitro* da eficácia fotoprotetora e fotoestabilidade das mesmas.

- Análise da composição química do extrato selecionado e suas frações através de Cromatografia de Camada Delgada (CCD), Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).
- Avaliação *in vivo* do Fator de Proteção Solar (FPS) e fotoirritação das formulações com o extrato escolhido.

O esquema de trabalho delineado para o desenvolvimento do projeto está representado na figura 20.

Figura 20. Plano do projeto.

METODOLOGIA

3. Metodologia

3.1. Material Vegetal

As espécies de bambu foram coletadas em duas localidades distintas do estado de São Paulo (Brasil). As folhas e colmos de *Chusquea bambusoides* Rupr. ex Döll e de *Chusquea capituliflora* Trin. var. *pubescens* McClure foram coletados no Parque Natural Municipal das Nascentes de Paranapiacaba, região da Mata Atlântica localizada em Paranapiacaba em Santo André, (coordenadas 23°46'41''S e 46°18'16''W). O material vegetal de *Aulonemia aristulata* (Döll) McClure *Merostachys pluriflora* Munro ex E.G. Camus e *Chusquea meyeriana* Rupr. foram obtidos no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, na região sudeste do município de São Paulo, entre os paralelos 23°38'08''S e 23°40'18''S e os meridianos 46°36'48''W e 46°38'00''W.

Todas as espécies foram identificadas pelo Dr. Tarcísio Filgueiras do Instituto de Botânica de São Paulo, e os espécimes testemunha foram depositados no Herbário da mesma instituição sob a seguinte numeração de acordo com ocorrência no texto: Shirasuna et al. 672 (SP), Shirasuna, RT & Suzuki, R. 1580 (SP), Vinha, D. s/n. 398161 (SP), Shirasuna, RT 2619 (SP), Grombone, MT s/n 412118 (SP). O Instituto de Botânica de São Paulo foi responsável pelas permissões das coletas.

A Figuras 21 – 25 apresentam as fotografias das espécies coletadas.

Figura 21. *Aulonemia aristulata* (Döll) McClure.

Fonte: SHIRASUNA, 2012.

Figura 22. *Chusquea bambusoides* Rupr. ex Döll.

Fonte: SHIRASUNA, 2012.

Figura 23. *Chusquea capituliflora* Trin. var. *pubescens* McClure.

Fonte: SHIRASUNA, 2012.

Figura 24. *Chusquea meyeriana* Rupr.

Fonte: SHIRASUNA, 2012.

Figura 25. *Merostachys pluriflora* Munro ex E.G. Camus.

Fonte: SHIRASUNA, 2012.

3.2. Reagentes

O etanol usado na parte da extração do material vegetal foi adquirido da Synth[®]. A água destilada usada na toda parte experimental foi obtida através da osmose resersa (OS10XLE, GEHAKA). Os solventes, utilizados no fracionamento do extrato de colmos de *M. pluriflora* (hexano, clorofórmio, acetato de etila, *n*-butanol) foram obtidos da Synth[®]. O sulfato de sódio anidro grau p.a. foi fornecido por J.T. Baker. O metanol, acetato de etila e o éter usados nos ensaios cromatográficos foram da marca LS Chemicals. Os demais solventes (ácido formico, ácido acético glacial, *n*-butanol, clorofórmio, tertra-hidrofurano, tolueno) foram da marca Merck. Os padrões de flavnoides foram adquiridos da Sigma Aldrich[®]. O metanol utilizado para dissolução das amostras de ensaios químicos e biológicos foi da marca Synth[®]. Os reagentes - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), Folin-Ciocalteau e natural product polyethylene glycol (NP-PEG) reagent também foram da Sigma Aldrich[®]. O cloreto de alumínio utilizado no teste de teor dos flavonoides foi da marca Merck.

3.3. Análises químicas

3.3.1. Extração das folhas e colmos de bambus

O material vegetal foi submetido à secagem em temperatura ambiente, protegido de radiação solar. Para obtenção o pó, as folhas e os colmos foram triturados em moinho de facas, tipo te-580 (Tecnal, Brasil). O material pulverizado de foi pesado e extraído com etanol 60% em aparelho de Soxhlet no Instituto de Química da USP (extratos foram nomeados respectivamente “IQ”) e com o mesmo solvente no extrator automático Dionex - ASE 300 (Accelerated Solvent Extractor) no laboratório de Fisiologia do Instituto de Botânica (“IB”)

para avaliar a eficácia de dois tipos de equipamento de extração. Os extratos brutos preparados em ambos institutos foram concentrados em evaporador rotatório (BÜCHI Rotavapor R-124), liofilizados através de um liofilizador LABCONCO® e armazenados em temperatura de -20°C.

O rendimento de cada extrato foi calculado de acordo com a equação 4.

Equação 4. Rendimento da extração e do fracionamento

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do extrato/massa do material}) \times 100$$

3.3.2. Fracionamento do extrato bruto de colmos de *M. pluriflora*

30 g do extrato de colmo de *M. pluriflora* foi solubilizado em 750 mL da solução de 10% de metanol. Depois da dissolução do extrato, a solução foi transferida para funil de separação e foi adicionado 100 mL de hexano para começar o processo do fracionamento. A fase orgânica foi coletada e, depois, a fase aquosa foi novamente extraída com 100 mL do hexano. A segunda fase orgânica foi separada e misturada com primeira, sendo o processo repetido até a exaustão. Ao final do processo, todas as fases orgânicas foram reunidas, secadas com sulfato de sódio anidro e filtradas. O mesmo procedimento foi repetido para os demais solventes, em ordem crescente de polaridade: clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol. Os solventes foram eliminados das frações por evaporação sob a pressão reduzida. O rendimento das frações foi calculado através da equação 1, usada anteriormente no caso dos extratos.

3.3.3. Determinação de compostos fenólicos totais dos extratos de folhas e colmos de bambus e das frações de colmo de *M. pluriflora*

A quantidade de compostos fenólicos totais foi medida com o auxílio do reagente Folin-Ciocalteu de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Ainsworth e Gillespie (2007), com algumas modificações. As amostras foram dissolvidas em solução de 80% de metanol na concentração de 1 mg/mL. Soluções metanólicas de ácido gálico foram empregadas na construção de curva de calibração. Em microplacas de 96 poços, foram adicionados: 20 µL de amostra, 30 µL de água destilada, 50 µL do reagente Folin-Ciocalteu e 100 µL de solução de carbonato de sódio (700 mmol/L). No lugar das amostras em branco foi acrescentado: 20 µL de amostra, 80 µL de água destilada, 100 µL de solução de carbonato de sódio (700 mmol/L).

Depois de 2 horas da reação no escuro, as absorbâncias das amostras foram medidas em

espectrofotômetro SpectraMax M4 com $\lambda = 760$ nm.

O conteúdo dos compostos fenólicos foi expresso em microgramas equivalentes de ácido gálico (EAG) por miligrama de amostra ($\mu\text{g EAG/mg}$). As análises foram realizadas em triplicada, e os resultados foram mostrados como média seguida do seu desvio padrão. As absorbâncias das amostras em branco foram usadas nos cálculos para descartar as absorbâncias internas das amostras.

A Figura 26 demonstra a mudança de cor da solução em teste possuindo compostos fenólicos depois da adição do reagente Folin-Ciocalteu.

Figura 26. Mudança de cor das soluções em teste após adição do reagente Folin-Ciocalteu.

A – amostra teste; **B** – branco.

3.3.4. Determinação de flavonoides totais de extratos de folhas e colmos de bambus e das frações de colmo de *M. pluriflora*

Os flavonoides totais dos extratos de folhas e colmos de bambus e das frações de colmo da *M. pluriflora* foram quantificados através do método desenvolvido primeiramente pelos pesquisadores Christ e Müller (1960) e adaptado em 1998 (WOISKY; SALATINO, 1998). O ensaio utiliza cloreto de alumínio na detecção dos grupos funcionais de flavonoides e as medidas são realizadas espectrofotometricamente em $\lambda = 425$ nm.

Os extratos brutos e as frações de colmo de *M. pluriflora* foram dissolvidos em solução de metanol/água 80:20 (v/v) nas concentrações de 5,0 mg/mL. Quercetina foi empregada como padrão, nas concentrações de 12 – 0,8 $\mu\text{g/mL}$ (nos poços), para a construção da curva de calibração.

Nas microplacas de 96 poços foram adicionados 20 μL das amostras/padrão e 210 μL da solução de metanol 80%. A seguir, 20 μL da solução de cloreto de alumínio (2% m/V) foram acrescentados e as soluções foram homogeneizadas em vortex (Thermolyne®). Após 30

minutos de reação no escuro, as absorvâncias foram determinadas em $\lambda = 425$ nm, em espectrofotômetro SpectraMax M4. As soluções em branco das amostras, contendo 20 μ L da amostra e 210 μ L de metanol 80%, foram utilizadas para descartar as absorvâncias internas das soluções. O teor de flavonoides foi expresso como microgramas equivalentes de quercetina por miligrama de amostra (μ g EQ/mg). Todas as amostras foram preparadas em triplicata e os resultados apresentados como media seguida pelo deu desviõ padrão.

Na Figura 27 mostra a modificação da coloração após a complexação dos flavonoides com $AlCl_3$.

Figura 27. Identificação dos flavonóides através do $AlCl_3$.

A - amostra teste; B - branco.

3.3.5. Análise dos perfis cromatográficos por cromatografia em camada delgada

A análise preliminar da composição química dos extratos brutos obtidos através do aparelho de Soxhlet (IQ) e das frações de colmo de *M. pluriflora* foi realizada por CCD. Para todas as análises, a fase estacionária empregada foi placas de sílica gel 60 F254 (Merck). As amostras dissolvidas em metanol na concentração de 5 mg/mL para aplicação nas placas cromatográficas. No caso dos extratos, os seguintes sistemas de solventes foram utilizados como eluente: sistema 1 (S1) acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético glacial e água (100:11:11:26; v/v/v) e sistema 2 (S2) butanol, ácido acético glacial e água (3:1:1; v/v/v) (HARBORNE; MABRY, 1982). Orientina, iso-orientina, vitexina, umbeliferona, rutina, ácido clorogênico, ácido gálico e ácido ferúlico a 10% (m/v) em metanol (ZHANG; DING, 1996) foram usadas como substâncias de referência. Os sistemas de solvente e os padrões usados para a análise no caso das frações de colmos de *M. pluriflora* estão apresentados no quadro 3.

As placas foram visualizadas em luz UV 366 nm e 254 nm. A detecção dos compostos fenólicos nas placas com os extratos de bambus diferentes foi adicionalmente realizada por nebulização com reagente cromático NP (solução 1% de difenil borato de 2-amino etila em metanol) com visualização sob luz UV 366 nm (WAGNER; BLADT, 2001). A identificação

dos compostos detectados foi efetuada pela comparação dos fatores de retenção (R_f), cores e tamanhos das manchas de substâncias diferentes. Os fatores de retenção foram calculados de acordo com equação 5.

Quadro 3. Sistemas de eluente e padrões utilizados em cromatografia em camada delgada com placas de sílica gel 60F₂₅₄ para as frações de colmo de *M. pluriflora*.

Fração	Sistema	Padrões
Hexânica	tolueno/etér (1:1)	Cumarina, umbeliferona
Clorofórmica	clorofórmio/metanol (9:1)	Quercetina, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido cinâmico
Acetato de etila	clorofórmio/metanol (9:1)	Quercetina, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido cinâmico
Butanólica	tetra-hidrofurano/tolueno/ácido fórmico/água destilada (16:8:2:1)	Quercetina, orientina, iso-orientina, vitexina, isovitexina

Equação 5. Fator de retenção calculado para as amostras submetidas a cromatografia em camada delgada

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela amostra}}{\text{distância percorrida pelo solvente}}$$

3.3.6. Cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas de frações de colmo de *M. pluriflora*

As frações clorofórmica, acetato de etila e hexânica de *M. pluriflora* foram analisadas em cromatografo a gás Agilent (série 6890), acoplado ao espectrômetro de massas, com sistema quadrupolo (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector) de energia de ionização de 70eV no Instituto de Botânica de São Paulo. A coluna capilar utilizada foi DB-5 (30m x 0,25mm de diâmetro interno, com 0,25µm de espessura), nas seguintes condições: temperatura inicial de 100°C e gradiente de temperatura do forno de 10°C/min até 290°C. A temperatura final foi mantida por tempo de 15 minutos. Hélio foi utilizado como gás de arraste a uma pressão de 80 kpa e velocidade linear de 1 ml/min.

As amostras foram dissolvidas em metanol (1 mg/mL), e o volume de injeção com divisão de fluxo-split/splitless foi 1µL. O índice de retenção de linear (IR) foi calculado utilizando uma série homóloga de *n*-alcanos (C8-C40) submetidas às mesmas condições de

análise cromatográfica das amostras. O índice retenção linear foi calculado de acordo com Dool e Kratz (1963) e está mostrado na equação 6.

A identificação dos compostos voláteis foi realizada através da comparação entre o índice de retenção e o cromatograma obtidos com os padrões de bibliotecas instaladas no equipamento (Wiley) e por comparação com espectros de massas registrados em banco de dados como NIST 08 (National Institute of Standards and Technology) e outros dados da literatura citadas, tais como livro do Adams (2007).

Equação 6. Índice de retenção linear empregado nos cálculos.

$$IR = 100Z + \frac{100[(TR^X) - (TR^Z)]}{(TR^{Z+1}) - (TR^Z)}$$

X - composto de interesse; **Z** - número de átomos de carbono do alceno com tempo de retenção anterior ao tempo de retenção de X; **TR^X** - tempo de retenção do composto X; **TR^Z** - tempo de retenção de Z; **TR^{Z+1}** - tempo de retenção do alceno com tempo de retenção posterior ao tempo de retenção de X.

3.3.7. Cromatografia líquida de alta eficiência de frações de colmo de *M. pluriflora*

Para as análises das frações de *M. pluriflora* em CLAE, foram usados solventes grau HPLC, da marca T. J. Baker. As análises foram feitas em um cromatógrafo Agilent 1260 com detector de espectro ultravioleta por fotodiodos com célula de fluxo de 60 mm. Como fase estacionária foi utilizada uma coluna Zorbax Eclipse plus de fase reversa C18 (4,6 x 150 mm) 3,5 µm de diâmetro de partícula e um fluxo de 1,0 mL por minuto. O sistema de eluição das amostras foi elaborado de acordo com a polaridade das mesmas. Desta forma, para a fração clorofórmica, foi empregado como sistema de eluição em modo gradiente, começando com uma mistura de 90% de H₂O acidificada com 0,1% de ácido acético e 10% de acetonitrila (ACN), até 25% de ACN em 10 minutos (de 10 a 30 minutos), atingindo 50% de ACN em 30 minutos (de 30 a 50 minutos), atingindo 100% de ACN, o qual foi mantido por mais dez minutos (50 a 60 minutos). Por outro lado, para a fração em acetato de etila, o sistema de eluição em modo gradiente foi iniciado com uma mistura de 90% de H₂O acidificada com 0,1% de ácido acético e 10% de acetonitrila (ACN) até 6 minutos, até 7 minutos, 10 a 15% de ACN de 7 a 22 minutos, 15% de ACN de 22 a 23 minutos, 15 a 20% de ACN de 23 a 33 minutos, 20% de ACN de 33 a 34 minutos, 20 a 25% de ACN de 34 a 44 minutos, 25% de ACN de 44 a 54 minutos, 25 a 50% de ACN, 54 a 60 minutos e 50 a 100% de ACN. Para separações foi utilizada uma coluna Zorbax

eclipse plus LC-18 de fase reversa C18 (25cm x 10mm), com partículas de diâmetro de 5µm e um fluxo de 4,176 mL por minuto. O sistema de eluição empregado em modo gradiente, iniciado por uma mistura de 75% de H₂O acidificada com 0,1% de ácido acético e 25% de acetonitrila (ACN) por 2 minutos, de 2 a 7 minutos atingindo 50% de ACN, de 7 a 25 minutos, atingindo 90% de ACN, de 25 a 26 minutos, 100% de ACN, o qual foi mantido por mais um minuto.

3.4. Análises biológicas

3.4.1. Atividade antirradicalar dos extratos de bambus e das frações de colmo de *M. pluriflora*

O potencial antioxidante dos extratos de folhas e colmos de bambus e das frações de colmo de *M. pluriflora* foi determinado por um método comum do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Para esta finalidade, os extratos e as frações foram dissolvidas em metanol puro no banho de ultrassom (THORNTON T14). Após a solubilização, a partir da solução estoque, foram preparadas as diluições de diferentes concentrações com objetivo de desenvolver uma curva de inibição da atividade do radical para cada amostra. Todos os tubos foram homogeneizados antes do ensaio. As amostras foram transferidas para os poços em 50 µL e acrescidas com 150µL da solução metanólica de DPPH (200 µmol/L). O controle foi preparado usando 50µL de metanol e 150µL de radical DPPH. No lugar do controle em branco foi adicionado 200µL de metanol puro, e no branco da amostra: 50 µL da amostra + 150 µL do DPPH. O experimento foi preparado em triplicata. Quercetina, dissolvida em metanol, foi usada como substância de referência (padrão). Depois da reação na ausência de luz durante 30 minutos, a absorbância das amostras foi avaliada no leitor de microplacas SpectraMax M4, com $\lambda = 515$ nm. O cálculo de inibição percentual do radical DPPH foi efetuado de acordo com equação 7.

Equação 7. Cálculo da inibição do radical livre DPPH.

$$\text{Inibição (\%) do DPPH} = \frac{(\text{Abs c} - \text{Abs cb}) - (\text{Abs a} - \text{Abs ab})}{(\text{Abs c} - \text{Abs cb})} \times 100$$

Abs_c = absorbância do controle (da solução de DPPH); **Abs_{cb}** = absorbância do controle em branco (solução pura de metanol); **Abs_a** = absorbância da amostra (amostra de bambu com a solução de DPPH); **Abs_{ab}** = absorbância da amostra em branco (amostra de bambu sem reagente).

Os resultados foram expressos como Concentração Efetiva (CE_{50}), concentração necessária para eliminação do radical livre DPPH em 50%, e obtidos através das curvas de regressão linear desenvolvidas anteriormente para todas as amostras.

A Figura 28 apresenta o gradiente das concentrações das amostras de bambu com o radical nos poços de microplaca.

Figura 28. Gradiente da atividade antirradicalar na presença do reagente DPPH com diminuição da concentração das amostras de bambu.

3.4.2. Citotoxicidade do extrato bruto de colmos de *M. pluriflora*

O ensaio quantitativo, colorimétrico de atividade citotóxica com uso do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (MOSMANN, 1983) do extrato bruto de colmo da *M. pluriflora* foi desenvolvido no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais Marinhos (LAFARMAR) da Universidade de São Paulo.

O extrato seco em quantidade de 10 mg foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO) em duas soluções de estoque: 1 e 10 mg/mL. A atividade das amostras foi avaliada usando três tipos de células diferentes - duas carcinogênicas: HCT-116 (adenocarcinoma de cólon) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama), e uma não carcinogênica: RPE (células humanas de epitélio da retina). As linhas de células foram cultivadas no meio de RPMI 1640 (HCT – 116) e DMEM

Glutamax (RPE e MCF-7) com 10% de soro fetal bovino (v/v), 2 mM da glutamina, 100 U/mL da penicillina e 100 µg/mL de streptomicina. As condições foram mantidos em 37° e sob 5% CO₂ na atmosfera.

As células foram acrescentadas às microplacas de 96 poços e cultivadas por 24 horas antes da triagem. Depois deste período, 1 µL da amostra com extrato de bambu foi incorporado em duplicata (duas soluções de 5 e 50 µL no poço) e seguinte, as placas foram incubadas por 72 horas. Controle negativo foi a solução do DMSO e controle positivo do teste foi a doxorrubicina (5 µM). Três horas antes do fim da incubação, foi adicionado 150 µL do reagente de MTT aos todos os poços (5 mg/mL) com propósito de determinação da viabilidade das células em função do potencial redox (reagente colorimétrico). Após três horas da reação a resposta foi gravada por meio do equipamento Multiskan FC multiplate reader (Fisher Scientific) com comprimento de onda = 595 nm.

Os resultados foram expressos como a percentagem da inibição de crescimento das células em duas concentrações: 5 e 50 µg/mL. O resultado do controle positivo (doxorrubicina) foi calculado como CE₅₀ – a concentração inibitória necessária para impedir 50% do crescimento das células.

3.5. Análises de formulações cosméticas

3.5.1. Preparo das formulações fotoprotetoras com amostras de bambus

As formulações com extratos brutos de bambus e as frações de colmo de *M. pluriflora* foram preparadas com uso do Aristofex® AVC (PharmaSpecial), um polímero sintético que promove a formação de gel com capacidade emulsificante. As formulações desenvolvidas com este produto permitiram a adição de substâncias menos polares como filtros solares e o conservante utilizado (BHT). No experimento, foram empregados os seguintes filtros solares - Avobenzona (filtro UVA), *p*-metoxicinamato de octila e octil-dimetil PABA (filtros UVB) nas concentrações permitidas pela legislação vigente (3,0 %, 7,5% e 8,0% (m/m), respectivamente). Quadro 4 apresenta as matérias-primas usadas no preparo das formulações fotoprotetoras com amostras de bambu.

Quadro 4. Matérias-primas utilizadas no desenvolvimento das formulações cosméticas.

Ingrediente cosmético*	Nome comercial ou químico**	Fornecedor
<i>Co-Polímero do Ácido Sulfônico Acriloldimetiltaurato e Vinilpirrolidona</i>	Aristoflex® AVC	PharmaSpecial®
<i>BHT</i>	2,6-bis (1,1-dimetiletil) -4-metilfenol	Vital®
<i>Metoxidibenzoilmetano de butila</i>	Avobenzona	All Chemistry®
<i>Etilhexil dimetil PABA</i>	Octil dimetil PABA / 2-etilhexil 4- (dimetilamino) benzoato	Deg®
<i>Metoxicinamato de octila</i>	<i>p</i> -metoxicinamato de octila / (RS) -2-etil-hexil (2E) - 3- (4-metoxifenil) prop-2-enoato	Volp®
<i>Paraffinum Liquidum</i>	Óleo mineral	Volp®
<i>Fenoxietanol (e)</i> <i>metilparabeno (e)</i> <i>etilparabeno (e)</i> <i>propilparabeno (e)</i> <i>butilparabeno</i>	Phenonip® / 2- fenoxietanol + Metil 4-hidroxibenzoato+ Etil 4-hidroxibenzoato+ Propil 4-hidroxibenzoato+ Butil 4-hidroxibenzoato	PharmaSpecial®
<i>Propileno glicol</i>	Propilenoglicol/ Propano-1,2-diol	All Chemistry®

* Nomenclatura conforme INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients)

**Nomenclatura inglês conforme IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)

No total, foram preparadas 15 formulações fotoprotetoras, dez com extratos de bambus de espécies diferentes na concentração de 10% (m/m): F1 - F10, uma de controle contendo somente os filtros solares - F11, duas com extrato de colmo de *M. pluriflora* nas concentrações 5,0 e 2,5% (F12 e F13) e duas com frações clorofórmica e de acetato de etila de colmo de *M. pluriflora* na concentração 0,1% (F14 e F15). Quadro 5 representa a denominação e composição geral das formulações.

Quadro 5. As formulações fotoprotetoras F1 - F15 desenvolvidas no ensaio contendo os diferentes extratos ou frações de bambu e os filtros solares.

N	Espécie de bambu	Extrato/Fração	Filtros solares*
F1	<i>A. aristulata</i>	Etanólico de colmo (10%)	+
F2		Etanólico de folha (10%)	+
F3	<i>C. bambusoides</i>	Etanólico de colmo (10%)	+
F4		Etanólico de folha (10%)	+
F5	<i>C. capituliflora</i>	Etanólico de colmo (10%)	+
F6		Etanólico de folha (10%)	+
F7	<i>C. meyeriana</i>	Etanólico de colmo (10%)	+
F8		Etanólico de folha (10%)	+
F9	<i>M. pluriflora</i>	Etanólico de colmo (10%)	+
F10		Etanólico de folha (10%)	+
F11 (controle)	-	-	+
F12	<i>M. pluriflora</i>	Etanólico de colmo (5%)	+
F13		Etanólico de colmo (2,5%)	+
F14		Clorofórmica de colmo (0,1%)	+
F15		Acetato de etila de colmo (0,1%)	+

-- não incluído; + - incluídos.

As matérias-primas empregadas no preparo das formulações para a presente análise em escala laboratorial, junto com sua finalidade e as concentrações (m/m) usadas são incluídas nos quadros 6 e 7.

Quadro 6. Composição das formulações contendo os filtros solares e as amostras de bambu (F1-F10 e F12-F15).

Fase	Composição	Função	%*
Oleosa	BHT	Antioxidante	0,1
	Avobenzona	Filtro solar UVA	3,0
	Octil dimetil PABA	Filtro solar UVB	8,0
	p-Metoxicinamato de octila	Filtro solar UVB	7,5
	Óleo mineral	Emoliente e umectante, solvente	5,0
Aquosa	Arystoflex	Formação de gel	5,0
	Extrato Fração	Substância ativa	10,0/5,0/2,5/0,1
	Propilenoglicol	Emoliente e umectante	5,0
	Phenonip	Conservante	0,75
	Água	Veículo	q.s.

*% m/m

Quadro 7. Composição da formulação de controle (F11), contendo apenas os filtros solares.

Fase	Composição	Função	%*
Oleosa	BHT	Antioxidante	0,1
	Avobenzona	Filtro solar UVA	3
	Octil dimetil PABA	Filtro solar UVB	8
	p-Metoxicinamato de octila	Filtro solar UVB	7,5
	Óleo mineral	Emoliente e umectante, solvente	5
Aquosa	Arystoflex	Formação de gel	5
	Propilenoglicol	Emoliente e umectante	5
	Phenonip	Conservante	0,75
	Água	Veículo	q.s.

*% m/m

3.5.1.1. Método de obtenção das formulações fotoprotetoras de extratos de folhas e colmos de bambus (10, 5 e 2,5%) e controle

Primeiramente, foi realizada a solubilização dos compostos hidrofóbicos, em um béquer, reunindo os filtros solares, BHT e o óleo mineral, sob aquecimento a 70 °C com agitação manual com auxílio de bastão de vidro, até a obtenção de uma solução. Após a solubilização, permitiu-se o resfriamento da mistura até temperatura ambiente. Após, foi efetuado o preparo dos extratos para adição na fase aquosa. Com esta finalidade, a quantidade do extrato seco de bambu adequada foi pesada e triturada em almofariz, na sequencia foram

adicionados 50% do volume total de água e toda a massa de propilenoglicol e misturados até a obtenção de uma suspensão estável. Essa mistura contendo o extrato foi transferida para um béquer com toda a massa de Arystoflex. O volume restante de água foi utilizado para limpar o almofariz com a suspensão de extrato e mesclado com os demais ingredientes da fase aquosa. Finalmente, o conteúdo das duas fases foi misturado, adicionando fase oleosa na fase aquosa por partes, e o Phenonip® foi acrescentado por último. Todos os componentes da futura formulação foram submetidos à agitação mecânica (agitador mecânico IKA RW 20) com velocidade de 1000 rpm. A agitação foi mantida por cinco minutos ou até que as formulações se tornassem homogêneas.

As formulações de controle com filtros solares foram preparadas em modo semelhante, excluindo o passo da dissolução e dispersão do extrato de bambu no almofariz. Em vez disso, a água destilada foi adicionada, enquanto, as proporções dos demais ingredientes continuaram a ser as mesmas.

3.5.1.2. Método de obtenção das formulações fotoprotetoras com as frações de colmos de *M. pluriflora* (0,1%)

As formulações com as frações de *M. pluriflora* (clorofórmica e acetato de etila) foram preparadas em modo semelhante, porém na etapa da dissolução das formulações, o propilenoglicol foi adicionado primeiro, somente depois foi adicionada a água. Para facilitar a dissolução das frações, as soluções com propilenoglicol foram submetidas ao banho de ultrassom com aquecimento (Cristofoli, LAB1000). Após o resfriamento, foi adicionado Aristoflex e o resto da água. A fase oleosa foi mesclada devagar com a fase aquosa, e a solução final foi misturada com o conservante e homogenizada através da agitação mecânica com velocidade de 1000 rpm.

3.5.1.3. Método de obtenção das formulações fotoprotetoras para os ensaios *in vivo*

Na última parte do projeto, a formulação com extrato de colmo de *M. pluriflora*, na concentração de 5%, e a formulação de controle foram preparadas em maior quantidade com objetivo de submeter as amostras aos ensaios *in vivo*. O modo de preparo foi semelhante, porém as formulações foram preparadas manualmente sem uso do agitador mecânico, adicionando aos poucos a fase oleosa à fase aquosa, sob agitação com bastão de vidro constante em um béquer.

3.5.2. Ensaios *in vitro*

3.5.2.1. Eficácia fotoprotetora

A eficácia fotoprotetora *in vitro* foi determinada com espectrofotômetro de reflectância difusa com esfera de integração (Labsphere® UV Transmittance Analyzer-2000S). Durante este processo, as quantidades adequadas de formulações de bambus foram pesadas e aplicadas uniformemente na forma de filme (1,3 mg/cm²) na superfície de placas de polimetilmetacrilato (PMMA - HD Helioplate® 6 HelioScreen), as quais são internacionalmente usadas como substrato para mimetizar a característica de rugosidade da superfície de epiderme humana (COSMETICS EUROPE, 2011; UNITED STATES, 2011).

Depois da secagem por 20 minutos, as transmitâncias das placas foram medidas pelo programa de UV-2000® com comprimentos de onda entre 290 e 400 nm e taxa de progressão de 1,0 nm. Os valores foram medidos em 9 lugares diferentes da placa, e os dados recebidos foram automaticamente convertidos automaticamente pelo equipamento em valores de fator de proteção solar (FPS) e comprimento de onda crítico (λ_c) usando as equações 8 e 9 (COSMETICS EUROPE, 2011; DIFFEY, 2002; SPRINGSTEEN et al, 1999; UNITED STATES, 2011). Uma placa de PMMA com glicerina foi usada como amostra em branco. As placas com formulação F11, somente de filtros solares foram usadas como controle.

Equação 8. Fator de proteção solar (FPS) *in vitro*.

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

$E\lambda$ = eficácia eritematogênica espectral; $S\lambda$ = irradiância solar espectral; $T\lambda$ = transmitância espectral da amostra; $d\lambda$ = gama dos comprimentos de onda.

Equação 9. Comprimento de onda crítico *in vitro*.

$$\int_{290\text{ nm}}^{c\lambda} A(\lambda) d\lambda = 0.9 \int_{290\text{ nm}}^{400\text{ nm}} A(\lambda) d\lambda$$

$A(\lambda)$ = absorvância espectral da amostra; $d(\lambda)$ = gama dos comprimentos de onda

3.5.2.2. Fotoestabilidade

O ensaio da fotoestabilidade baseou nas mesmas condições como avaliação da eficácia de proteção solar, com o passo adicional de irradiação das placas com formulações com uma dose fixa de luz solar artificial (580,08 W/m² - 2088 J/m²) em uma câmara por 1 hora

na temperatura de 35°C (UNITED STATES, 2011).

Como anteriormente, os resultados da transmitância das amostras depois da irradiação foram medidos pelo programa UV-2000® no intervalo de comprimento de onda de 290 a 400 nm e a taxa de progressão de 1,0 nm. Nove medidas da transmitância foram gravadas para cada placa (DIFFEY, 2002; SPRINGSTEEN et al, 1999; UNITED STATES, 2011).

O coeficiente de variação para os valores obtidos individualmente foi monitorado e as análises foram conduzidas em triplicata.

3.5.3. Ensaios *in vivo*

3.5.3.1. Aspectos legais e éticos

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em função da realização dos ensaios *in vivo* e *ex vivo* com voluntários humanos (número de parecer: 2.528.318). Os testes foram realizados em acordo com a Legislação Brasileira vigente, baseada na Resolução Normativa 196/96 e Resolução 466/12 (CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE), após a obtenção da aprovação do CEP (anexo A), regulamentado pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Para cada voluntário que expressou a vontade de participar nesta pesquisa, foram fornecidas as informações e esclarecimentos necessários referentes (objetivos, possíveis riscos ou desconforto). O consentimento foi recebido por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexos B e C), mantendo-se o anonimato do voluntário e garantindo a possibilidade de sua saída do estudo em qualquer momento.

Os indivíduos foram pré-selecionados por meio da identificação do fototipo da pele como mencionado antes, e pela faixa etária. A seleção dos participantes foi conduzida pelo médico dermatologista qualificado através do questionário e exames clínicos. A exclusão do grupo de estudo foi automática nas seguintes condições: gravidez ou lactação, terapia potencialmente fotossensibilizante, administração de medicamentos anti-inflamatórios, patologias dermatológicas em geral, irregularidades superficiais da pele, participação prévia em estudos de eficácia fotoprotetora ocorrido no intervalo inferior a três meses e histórico de ocorrência de efeitos adversos após exposição solar. Todos os criterios de exclusão estão listados na página seguinte.

Critérios de exclusão dos voluntários:

- Marcas cutâneas na área experimental que interfiram na avaliação de possíveis reações cutâneas (distúrbios da pigmentação, malformações vasculares, cicatrizes, aumento de pilosidade, efélides e nevus em grande quantidade, queimaduras solares);
- Dermatoses ativas (local e disseminada) que possam interferir nos resultados do estudo;
- Gestantes ou lactantes;
- Antecedentes de reações alérgicas, irritação ou ou sensações de desconforto intensas a produtos de uso tópico: cosméticos e medicamentos;
- Participantes com histórico de alergia ao material utilizado no estudo;
- Antecedentes de atopia;
- Antecedentes de patologias agravadas ou desencadeadas pela radiação ultravioleta;
- Portadores de imunodeficiências;
- Transplantados renais, cardíacos ou hepáticos;
- Exposição solar intensa ou a sessão de bronzeamento até 15 dias antes da avaliação inicial;
- Previsão de exposição solar intensa ou a sessão de bronzeamento, durante o período de condução do estudo;
- Previsão de tomar banho de mar, piscina ou sauna durante o estudo;
- Participantes que praticam esportes aquáticos;
- Uso dos seguintes medicamentos de uso tópico sistêmico: imunossupressores, anti-histamínicos, anti-inflamatórios não hormonais, e corticoides até duas semanas antes da seleção;
- Tratamento com vitamina A ácida e/ou seus derivados via oral ou tópica até 1 mês antes do início do estudo;
- Previsão de vacinação durante a realização do estudo ou até 03 semanas antes do estudo;
- Estar participando de outro estudo;
- Qualquer condição não mencionada acima que, na opinião do investigador, possa comprometer a avaliação do estudo;
- Histórico de ausência de aderência ou de indisposição em aderir ao protocolo de estudo;
- Profissionais diretamente envolvidos na realização do presente protocolo e seus familiares.

3.5.3.2. Avaliação do fator de proteção solar

No ensaio de FPS *in vivo* foram submetidas a formulação de extrato de *M. pluriflora* em 5% (F12) e a formulação de controle (F11). O teste foi realizado no Instituto de Pesquisa Clínica Integrada (IPclin), na rua Leonardo Cavalcante, 314 em Jundiaí, SP. Utilizou-se o protocolo baseado na norma da International Standard Organization (ISO), número 24444:2010 (2010). Para a participação no estudo, foram convidados 10 voluntários de ambos sexos, na idade entre 18 até 70 anos, de fototipo I a III de acordo com classificação de Fitzpatrick (quadro 8). Os voluntários compareceram no Instituto durante dois dias, 4 horas no primeiro dia e meia hora no segundo dia. No primeiro dia, foi efetuada uma avaliação clínica da pele dos voluntários por médico dermatologista, com posterior aplicação das duas formulações fotoprotetoras (F11 e F12) nas suas costas numa área pre-definida de 35 cm² (2 mg / cm²). O padrão interno, P2 (quadro 9), foi utilizado como substância de referência interna de acordo com as recomendações da mesma legislação. Após a secagem, a área marcada foi exposta a uma fonte emissora de luz -lâmpada de arco de xenônio de 300 W (Multiport 601, Solar Light Co Inc), reproduzindo a radiação solar por um tempo calculado de acordo com valor de mínima dose eritematogênica (MED) de cada voluntário e do FPS *in vitro* das formulações. Os sinais de vermelhidão, ou seja eritema, foram determinados depois de um período de 16-24 horas após a exposição a irradiação (pico de eritema) através de um exame dermatológico.

Quadro 8. Fototipos de pele segundo Fitzpatrick TB 1986.

Coloração	Tipo	Queimadura	Bronzeamento
Branca	I	Sim	Não
Branca	II	Sim	Mínimo
Branca	III	Sim	Sim
Branca/Morena clara	IV	Não	Sim
Morena	V	Não	Sim
Escura	VI	Não	Sim

Quadro 9. Composição do padrão interno, P2, usado no ensaio de avaliação de fator de proteção solar *in vivo*.

Fase	Ingrediente	Nome IUPAC	% (m/m)
1	Lanolina	-	4,5
	Manteiga de cacau (<i>Theobroma cacao</i> L.)	-	2,0
	Monostearato de glicerol	2,3-di-hidroxipropila octadecanoato	3,0
	Ácido esteárico	ácido octodecanóico	2,0
	Octil dimetil PABA	2-etilhexil 4- (dimetilamino) benzoato	7,0
	benzofenona-3	(2-hidroxi-4-metoxifenil) - fenilmetanona	3,0
2	Água	-	71,6
	Sorbitol (líquido, 70%)	(2S,3R,4R,5R)-Hexano-1,2,3,4,5,6-hexol	5,0
	Triethanolamine	2,2',2"-Nitrilotri(etan-1-ol)	1,0
	Metilparabeno	Metil 4-hidroxibenzoato	0,3
	Propilparabeno	Propil 4-hidroxibenzoato	0,1
3	Álcool benzílico	Fenilmetanol	0,5

- : não incluído

Para estimar o FPS *in vivo* das formulações foi calculada a mínima dose eritematogênica (MED) na pele dos voluntários com aplicados produtos em comparação com a pele desprotegida. Com este objetivo, a exposição à luz ultravioleta foi aumentada em progressão geométrica, sendo cada exposição graduada com aumento de 12% em relação à anterior. O fator FPS *in vivo* foi assim calculado através da equação 10.

Equação 10. Fator de proteção solar (FPS) *in vivo*.

$$FPS = \frac{MED_{pele\ protegida}}{MED_{pele\ não\ protegida}}$$

O valor recebido para cada participante foi FPS médio com adequado desvio padrão.

3.5.3.3. Potencial fotoirritante e fotossensibilizante

A avaliação do potencial fotoirritante e fotossensibilizante (modificado de KLIGMAN; WOODING, 1967), das mesmas formulações (F11 e F12) também foi realizado no Instituto de IPCLin, como no caso do ensaio anterior. Foram selecionados 30 voluntários de ambos os sexos, com idade entre 18 e 65 anos, e fototipo I a IV. O ensaio de fotoirritação e fotossensibilização cutânea teve duração de 5 semanas, as primeiras duas semanas foram classificadas como fase de indução, 2 semanas seguintes como fase de descanso e a última semana como a fase de desafio. Os participantes compareceram no instituto nas terça-e quinta-feiras por aproximadamente 30 minutos.

As duas formulações (F11 e F12) foram aplicadas sobre apósitos semi-oclusivos de tamanho de 5 cm². A água destilada foi utilizada como controle do ensaio. Os apósitos foram colocados nas costas dos participantes e permaneceram na pele durante 48 horas. Segue, foi realizada a irradiação da região afetada com UVA com dose de 4 J/cm². Utilizou-se Simulador Solar (ProLumina) com lâmpadas de radiação ultravioleta (Phillips) de 100 Watts. A intensidade de radiação da lâmpada foi de 10 mW/cm², e o tempo de exposição: 6 min 40 s, o que corresponde uma hora de exposição solar, ao meio dia de um dia ensolarado de verão. Após a irradiação, o médico dermatologista responsável avaliou os sinais clínicos e sensações de desconforto junto com a intensidade delas nos voluntários. Finalmente, os apósitos foram trocados, mantendo sempre a mesma localização ao longo de todo o teste.

A aplicação, a exposição à fonte de irradiação com avaliação médica dos possíveis reações de fotoirritação acumulada foi repetida em dias estabelecidos. Após do período da fase de indução (duas semanas), houve um período de repouso de duas semanas (fase de descanso), enquanto nenhuma visita dos voluntários ocorreu no instituto.

Na última semana, os participantes retomaram ao instituto para a aplicação final das formulações em área virgem das costas. Depois de 48 horas, foi realizada a irradiação da pele com mesma dose de luz ultravioleta como anteriormente, e seguinte a avaliação médica dos sinais de fotossensibilização.

3.6. Análise estatística dos ensaios

Todas as análises estatísticas foram efetuadas no programa Minitab® 17. Os resultados recebidos nos ensaios químicos e biológicos para todas as espécies de bambus pesquisadas, dependendo do tipo de extração e da parte da planta (1.3.5, 1.3.6, 1.4.1), foram avaliados pelo teste de Anova General Linear Model com comparação de Tukey. Os dados obtidos nas mesmas avaliações somente para as frações de *M. pluriflora* foram tratados por teste Anova One-Way com comparação de Tukey. Os resultados de fator de proteção solar (FPS) e comprimento de onda crítico (λ_c) das formulações cosméticas com amostras de bambus antes e depois da irradiação foram comparados com teste de t-Student pareado. Os mesmos valores, foram adicionalmente comparados independente através do Anova One-Way com teste de Tukey, com objetivo de identificar o produto mais eficaz. Os resultados recebidos no ensaio de atividade fotoprotetora *in vivo* para a formulação com extrato de *M. pluriflora* (5%) e a controle foram comparados por meio do teste de equivalência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

4.1. Triagem das espécies nativas de bambu

4.1.1. Análises químicas

4.1.1.1. Rendimentos dos extratos

Compostos fenólicos e glicosídeos de flavonoides são os principais metabólitos secundários em espécies de bambu, sendo reconhecidos por suas atividades antioxidante e de absorção da radiação UV. Estes compostos são extraídos habitualmente com água, álcoois ou as misturas dos dois. Entretanto, as maiores quantidades de álcool na mistura de solventes providenciam a melhor eficácia do processo extrativo, aumentando a quantidade desses compostos (MACWAN; PATEL; KALIA, 2010). Para o caso dos bambus, em estudos anteriores, a maior quantidade de fenóis e flavonoides foi obtida usando especificamente soluções aquosas de etanol invés de água pura ou as misturas de metanol (NAGAI et al., 2009). A proporção de etanol empregada no solvente extrator, no caso de bambus, pode variar, mas a faixa mais comum é de 50 até 70% (XU et al., 2017), justificando a escolha de etanol 60% como no presente estudo.

Para a obtenção dos extratos, foram comparados 2 métodos, com aparelho de Soxhlet (IQ) e com extrator automático (IB). As massas do material vegetal empregado e dos extratos secos obtidos e seus respectivos rendimentos expressos em % (m/m), para todas as espécies de bambu em cada método de extração, encontram-se nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Massa do material vegetal, massa e rendimentos obtidos para os extratos etanólicos 60% de bambus por extração em aparelho Soxhlet (extratos IQ).

Nome de bambu	Massa do material[g]	Massa do extrato [g]	Rendimento [%]
Folhas			
<i>A. aristulata</i>	43,09	4,33	10,1
<i>C. bambusoides</i>	37,93	5,37	14,2
<i>C. capituliflora</i>	44,59	9,88	22,2
<i>C. meyeriana</i>	38,16	5,40	14,2
<i>M. pluriflora</i>	44,45	6,19	13,9
Colmos			
<i>A. aristulata</i>	50,47	4,98	9,9
<i>C. bambusoides</i>	60,72	7,38	12,2
<i>C. capituliflora</i>	58,20	4,97	8,6
<i>C. meyeriana</i>	60,28	4,70	7,8
<i>M. pluriflora</i>	62,67	4,74	7,6

Tabela 2. Massa do material vegetal, massa e rendimentos obtidos para os extratos etanólicos 60% de bambus por extrator automático Dionex-ASE 300 (extratos IB).

Nome de bambu	Massa do material [g]	Massa do extrato [g]	Rendimento [%]
Folhas			
<i>A. aristulata</i>	39,04	2,64	6,8
<i>C. bambusoides</i>	48,51	4,58	9,4
<i>C. capituliflora</i>	37,55	5,77	15,4
<i>C. meyeriana</i>	40,40	2,79	6,9
<i>M. pluriflora</i>	49,92	2,89	5,8
Colmos			
<i>A. aristulata</i>	73,92	4,22	5,7
<i>C. bambusoides</i>	81,86	7,88	9,6
<i>C. capituliflora</i>	46,56	3,42	7,4
<i>C. meyeriana</i>	74,80	4,20	5,6
<i>M. pluriflora</i>	84,56	3,68	4,4

De acordo com os resultados obtidos o método de extração que forneceu os maiores rendimentos foi com o aparelho de Soxhlet, tanto para as folhas como para os colmos. Nesse método convencional, para as folhas, a espécie, que apresentou o maior rendimento foi *C. capituliflora* (22,2%) e o menor *A. aristulata* (10,1%). O maior rendimento de colmos foi observado no caso de extrato de *C. bambusoides* (12,2%), e o menor de *M. pluriflora* (7,6%). No caso dos extratos obtidos com o aparelho ASE, os rendimentos foram menores, tanto para

as folhas (5,8 – 15,4%), como para os colmos (4,4 – 9,6%). O menor rendimento nesse método foi para *M. pluriflora*, enquanto, as espécies *C. bambusoides* e *C. capituliflora*, apresentaram o maior rendimento, semelhante aos resultados com o aparelho de Soxhlet. O tipo de extração teve impacto nos valores de rendimentos obtidos, o que pode ser devido aos diferentes tempos e temperaturas empregados no processo de extração (XU et al., 2017). Contudo, para o caso de compostos fenólicos, as temperaturas mais altas empregados no aparelho de Soxhlet não iriam afetar a qualitativamente os extratos obtidos, pois estes compostos são estáveis com temperaturas de extração de até 200°C (CHENG et al., 2014). Os rendimentos obtidos para os bambus brasileiros foram parecidos com aqueles relatados para as espécies de asiáticas, como, por exemplo, o extrato metanólico das folhas de *Bambusa textilis* McClure, que teve um rendimento de 16% (WANG et al., 2012).

4.1.1.2. Determinação de compostos fenólicos totais

O conteúdo dos compostos fenólicos dos extratos de bambu foi obtido pelo método espectrofotométrico com uso do reagente de Folin-Ciocalteu. Este método não é seletivo para os compostos fenólicos, reagindo em modo semelhante com outras substâncias com propriedades redutoras, como algumas formas de nitrogênio (IKAWA et al., 2003). Mesmo assim, continua a ser o método mais comum, especialmente na identificação destes componentes, por permitir a avaliação e comparação rápida dos resultados entre espécies diferentes. Os valores da quantificação foram expressos em microgramas equivalentes de ácido gálico (EAG) por miligrama de extrato seco, e para esta finalidade foi desenvolvida uma curva de calibração com ácido gálico, a qual pode ser vista abaixo (Figura 29). O teor de compostos fenólicos totais encontrados nos extratos de folhas e colmos das cinco espécies alvo estão listadas na Tabela 3.

Figura 29. Curva de calibração de ácido gálico utilizada na determinação da concentração de substâncias fenólicas nas amostras de bambus.

Tabela 3. Conteúdo dos compostos fenólicos nos extratos de bambus usando a metodologia de Folin-Ciocalteu, expressos em μg equivalentes de ácido gálico (EAG) por mg de amostra (média $\pm$ desvio padrão).

Espécie	IQ	IB
Folhas	EAG ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	
<i>A. aristulata</i>	$49,54 \pm 0,74^{\text{d,e,f,g}}$	$26,07 \pm 1,01^{\text{j}}$
<i>C. bambusoides</i>	$59,53 \pm 4,83^{\text{c}}$	$50,31 \pm 1,27^{\text{d,e,f,g}}$
<i>C. capituliflora</i>	$57,00 \pm 4,49^{\text{c,d}}$	$73,40 \pm 1,00^{\text{b}}$
<i>C. meyeriana</i>	$71,03 \pm 3,61^{\text{b}}$	$43,48 \pm 3,82^{\text{g,h,i}}$
<i>M. pluriflora</i>	$47,34 \pm 0,62^{\text{e,f,g}}$	$53,52 \pm 3,47^{\text{c,d,e,f}}$
Colmos		
<i>A. aristulata</i>	$55,02 \pm 0,47^{\text{c,d,e}}$	$36,59 \pm 1,01^{\text{i}}$
<i>C. bambusoides</i>	$43,64 \pm 2,24^{\text{g,h,i}}$	$24,40 \pm 2,46^{\text{j}}$
<i>C. capituliflora</i>	$46,31 \pm 0,95^{\text{f,g}}$	$38,12 \pm 2,87^{\text{h,i}}$
<i>C. meyeriana</i>	$87,81 \pm 2,14^{\text{a}}$	$45,02 \pm 2,65^{\text{g,h}}$
<i>M. pluriflora</i>	$54,40 \pm 2,30^{\text{c,d,e}}$	$46,11 \pm 1,30^{\text{f,g}}$

IQ – extratos preparados através do aparelho de Soxhlet no Instituto de Química; **IB** – extratos preparados através do aparelho de ASE no Instituto de Botânica.

As letras minúsculas (a,b,c,d,e,f,g,h,i,j) apresentam as diferenças significativas de acordo com Anova One-Way e comparação de Tukey. Os valores que não dividem as letras iguais são diferentes.

A maior quantidade de compostos fenólicos foi obtida para o extrato IQ de colmos de *C. meyeriana* ($87,81 \pm 2,14 \mu\text{g EAG/mg}$ de extrato). Para a mesma espécie, o extrato IB apresentou um teor quase duas vezes menor ($45,02 \pm 2,65 \mu\text{g EAG/mg}$). Logo depois, *C. meyeriana* e *C. capituliflora* demonstraram os melhores valores nas folhas, respectivamente, $71,03 \pm 3,61$ (extrato IQ) e $73,40 \pm 1,00 \mu\text{g EAG/mg}$ de amostra (extrato IB). Os menores resultados foram obtidos para *A. aristulata* e *C. bambusoides*, entre $24,40 - 59,53 \mu\text{g EAG/mg}$. De acordo com os testes estatísticos, concluiu-se que os extratos preparados no aparelho de Soxhlet (IQ) tiveram os maiores teores de fenólicos totais do que aqueles preparados pelo outro método (IB), porém, não foi relatada uma diferença significativa entre os resultados de colmos e folhas. As espécies asiáticas parecem ter uma quantidade menor de compostos fenólicos do que as espécies brasileiras. Por exemplo, *Bambusa arundinacea* (Retz.) Willd., apresentou $14,6 \mu\text{g EAG/mg}$ de planta, teor menor a qualquer um dos bambus aqui descritos (MACWAN; PATEL; KALIA, 2010). Semelhante, outras espécies, *Schizostachyum lumampao* (Blanco) Merr. e *Sasa senanensis* Rehd, apresentaram menos de $1 \mu\text{g EAG}$ em 1 mg de extrato seco, para os extratos metanólicos e aquosos (TONGCO; AGUDA; RAZAL, 2014; KHATUN et al., 2013). O último exemplo, é um outro indicativo de que o etanol é um solvente mais adequado para extração destas substâncias, como discutido anteriormente. Alta quantidade de compostos fenólicos é um fator promissor, que pode futuramente ter impacto positivo na ação antioxidante e fotoprotetora dos extratos.

4.1.1.3. Determinação do teor de flavonoides

A presença dos flavonoides nos extratos de bambu, foi avaliada através do método quantitativo, colorimétrico, empregando AlCl_3 como reagente quelante dos grupos hidroxílicos destes componentes. O teor de flavonoides totais foi expresso em microgramas equivalentes de quercetina por miligrama de extrato seco ($\mu\text{g EQ/mg}$), e com este objetivo, foi preparada a curva de calibração do padrão (Figura 30). Os valores do conteúdo de flavonoides calculados a partir desta curva estão mostrados na Tabela 4.

Figura 30. Curva de calibração de quercetina utilizada para a determinação dos flavonoides nos extratos brutos das folhas e colmos dos bambus.

Tabela 4. Conteúdo de flavonoides totais determinados através do método com AlCl_3 expressos em μg equivalentes de quercetina (EQ) por mg de amostra (média $\pm$ desvio padrão) para os extratos de folhas e colmos de cinco espécies de bambu.

Espécie	IQ	IB
Folhas	EQ ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	
<i>A. aristulata</i>	$3,65 \pm 0,40^{e,f,g,h,i}$	$3,32 \pm 0,70^{g,h,i,j}$
<i>C. bambusoides</i>	$6,44 \pm 0,25^b$	$8,41 \pm 0,30^a$
<i>C. capituliflora</i>	$3,87 \pm 0,31^{e,f,g,h}$	$3,37 \pm 0,42^{f,g,h,i,j}$
<i>C. meyeriana</i>	$5,93 \pm 0,27^{b,c}$	$8,73 \pm 0,97^a$
<i>M. pluriflora</i>	$4,08 \pm 0,04^{e,f,g}$	$5,82 \pm 0,47^{b,c,d}$
Colmos		
<i>A. aristulata</i>	$3,16 \pm 0,38^{g,h,i,j}$	$3,62 \pm 0,48^{e,f,g,h,i}$
<i>C. bambusoides</i>	$2,22 \pm 0,25^j$	$2,40 \pm 0,55^{i,j}$
<i>C. capituliflora</i>	$4,83 \pm 0,25^{c,d,e}$	$3,48 \pm 0,25^{f,g,h,i,j}$
<i>C. meyeriana</i>	$4,01 \pm 0,33^{e,f,g,h}$	$2,73 \pm 0,20^{h,i,j}$
<i>M. pluriflora</i>	$4,60 \pm 0,16^{d,e,f}$	$4,31 \pm 0,19^{e,f,g}$

IQ – extratos preparados através do aparelho de Soxhlet no Instituto de Química; **IB** – extratos preparados através do aparelho de ASE no Instituto de Botânica.

As letras minúsculas (a,b,c,d,e,f,g,h,i,j) apresentam as diferenças significativas de acordo com Anova One-Way e comparação de Tukey. Os valores que não dividem as letras iguais são diferentes.

Os valores obtidos neste ensaio variam entre 2,22 e 8,73 $\mu\text{g EQ/mg}$ por miligrama de amostra. O maior valor para os colmos foi para o extrato de *C. capituliflora* (IQ), 4,83 $\mu\text{g EQ/mg}$, enquanto nas folhas os extratos (IB) de *C. meyeriana* e *C. bambusoides* atingiram valores acima de 8 $\mu\text{g EQ/mg}$. De acordo com os testes estatísticos, observa-se uma diferença significativa entre os resultados para os extratos de colmos e folhas (maior teor), mas não foi confirmada uma diferença entre os extratos IB e IQ. O teor de flavonoides encontrado para os extratos de colmos de bambus, foi um pouco menor do que para os extratos de folhas de espécies de *Phyllostachys*, que variou entre 17,79 e 25,56 μg equivalentes de rutina (ER) em 1 mg de amostra. Por outro lado, os brotos e cascas de colmos destas espécies tinham apenas 1,94 – 4,09 $\mu\text{g ER/mg}$ e 1,29 – 6,33 $\mu\text{g ER/mg}$, respectivamente (LI et al., 2013). Em contrapartida, nas folhas de outras espécies asiáticas, *S. senanensis* e *S. lumampao*, a quantidade de flavonoides foi menor do que nas nossas espécies (TONGCO; AGUDA; RAZAL, 2014; KHATUN et al., 2013). A única espécie desta região, que teve o valor de flavonoides próximo aos bambus aqui pesquisados, foi a *B. arundinacea*. As frações aquosa, metanólica e butanólica dela atingiram os valores de EQ entre 2,54 e 6,71 $\mu\text{g/mg}$ (MACWAN; PATEL; KALIA, 2010). O conteúdo de flavonoides pode ser influenciado pelas variações sazonais relacionadas a diferente intensidade de radiação UV (NI et al., 2012), o que pode explicar a variabilidade entre as espécies aqui citadas. A presença destes compostos nos extratos de bambus aumenta o valor das futuras formulações cosméticas, pois, estes metabólitos além de ter a capacidade de absorção de radiação UV, podem gerar efeitos antioxidante, anti-inflamatório, antienvelhecimento e proteger as células da pele contra os danos mutagênicos.

4.1.1.4. Comparação da composição química dos extratos brutos por cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada é um método preliminar de separação, identificação, quantificação e isolamento de compostos químicos em diversos meios. Neste trabalho, ela foi usada para comparar a composição química das espécies nativas do Brasil com as espécies asiáticas. As placas cromatográficas desenvolvidas para as amostras pesquisadas e os padrões (flavonoides e ácidos fenólicos comuns em bambus asiáticos) podem ser vistas nas figuras 4 a 7. As cromatografias foram elaboradas para folhas e colmos em dois sistemas de eluentes distintos, e as placas foram visualizadas em luz UV (254 e 360 nm) e após a nebulização com reagente NP.

A identificação da composição química dos extratos brutos de plantas é uma tarefa bastante desafiadora, pois estes são misturas de diversas moléculas desconhecidas, frequentemente em concentrações baixas. As placas cromatográficas dos extratos brutos das espécies apresentaram uma quantidade muito elevada de manchas, ou seja, os extratos têm a uma grande diversidade de compostos. A presença de flavonoides e outras substâncias com capacidade de absorver a radiação UV, como ácidos fenólicos, cumarinas e antocianinas, pode ser vista na placa de CCD nos dois comprimentos de onda da luz UV aqui usadas (366 e 254 nm). As manchas destes compostos, dependendo da estrutura molecular exata, têm a cor azul, verde, amarela, laranja ou vermelha. Os flavonoides, depois da nebulização com reagente NP-PEG apresentam uma coloração que varia de laranja, laranja avermelhada a amarela esverdeada, sendo melhor visualizados no comprimento de onda 365 nm, enquanto as cumarinas apresentam coloração verde a verde azulada (PASCUAL et al., 2002).

Os extratos de folhas desenvolvidos nos sistemas 1 e 2, depois da nebulização com reagente NP, apresentaram várias manchas amarelas e verde azuladas (figuras 31 e 32), o que pode significar a presença de flavonoides e cumarinas. Algumas das manchas amarelas da placa 1, com fator de retenção, $R_f = 0,78$ foram parecidas com a da vitexina, o que podia indicar a presença deste composto nas folhas de *C. meyeriana* e *M. pluriflora*. Porém, no sistema 2 (placa 2, Fig. 4), este flavonoide teve a migração diferente, semelhante somente à mancha amarela grande de *M. pluriflora* ($R_f \approx 0,80$). Nos dois sistemas de eluente, para as folhas de *C. bambusoides*, *C. capituliflora* e *C. meyeriana* foram observadas várias manchas amarelas com R_f entre 0,60 e 0,70, e todos os extratos tinham manchas amareladas grandes começando com $R_f = 0,47$ (sistema 1) e $R_f = 0,40$ (sistema 2), quais não correspondiam a nenhum dos padrões empregados. Manchas azuis apareceram com $R_f = 0,60$, nas folhas de *M. pluriflora* e *A. aristulata* no sistema 1, e em todas as espécies com $R_f \approx 0,15 - 0,10$, visíveis no sistema 2.

Figura 31. Cromatoplaça dos extratos brutos de folhas, dissolvidos em metanol. Eluente: acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético glacial e água (100:11:11:26). Visualização: luz UV 366 nm (I), 254 nm (II), e 366 nm após a nebulização com reagente NP (III).

Rf = 0,78
 Rf = 0,70 - 0,60
 Rf = 0,47
 Rf = 0,15 - 0,10

III

A – *Chusquea bambusoides*; **B** – *Chusquea capituliflora*; **C** – *Chusquea meyeriana*; **D** – *Merostachys pluriflora*; **E** – *Aulonemia aristulata*; **1** – umbeliferona; **2** – vitexina; **3** – iso-orientina; **4** – orientina; **5** – rutina; **6** – ácido clorogênico; **7** – ácido fenólico; **8** – ácido gálico.

Figura 32. Cromatoplaça dos extratos brutos de folhas de bambus, dissolvidos em metanol. Eluente: butanol, ácido acético glacial e água (3:1:1). Visualização: luz UV 366 nm (I), 254 nm (II), e 366 nm depois da pulverização com reagente NP (III).

$R_f = 0,78$

$R_f = 0,70 - 0,60$

$R_f = 0,40$

$R_f = 0,04$

III

A – *Chusquea bambusoides*; B – *Chusquea capituliflora*; C – *Chusquea meyeriana*; D – *Merostachys pluriflora*; E – *Aulonemia aristulata*; 1 – orientina; 2- umbeliferona; 3 – vitexina; 4 – iso-orientina; 5 – rutina; 6 – ácido clorogênico; 7 – ácido fenólico; 8 – ácido gálico.

A comparação das manchas nas placas de CCD dos extratos de colmos de todas as espécies de bambu com as substâncias referência também não indicou a presença de nenhum dos padrões usados, nos dois sistemas de eluentes. No sistema 1 representado na figura 33, em todas as amostras, foi possível ver uma mesma substância com $R_f = 0,85$ de cor amarela. Os colmos de *C. bambusoides*, *C. meyeriana*, *M. pluriflora* e *A. aristulata* adicionalmente, exibiram uma substância de cor azul com $R_f = 0,58$. As manchas amarelas com $R_f = 0,28$ apareceram nas faixas para de *C. capituliflora*, *C. meyeriana* e *M. pluriflora*, e as manchas azuis com $R_f = 0,15 - 0,05$ no caso de *C. bambusoides* e *A. aristulata*. Com o sistema 2 (figura 34), observou-se uma separação menos efetiva dos compostos. Neste sistema, as amostras de colmos mostraram as manchas amarelas com $R_f = 0,79$, mais visível para *C. capituliflora* e *A. aristulata*. Nas espécies *A. aristulata* e *C. meyeriana* foram observadas manchas azuis semelhantes com $R_f = 0,57$, enquanto, todos os colmos, exceto os de *M. pluriflora*, ainda exibiram uma mancha azul forte com $R_f = 0,03$.

Os resultados indicaram que as espécies nativas pesquisadas podem ter uma composição química semelhante entre elas, porém, não se observou a presença de nenhum composto típico para as espécies asiáticas (ZHANG et al., 2005). Mesmo assim, a característica das placas obtidas sugere a presença de compostos, que pertencem aos mesmos grupos de metabólitos, sendo os compostos fenólicos, que constituem o foco deste projeto.

Figura 33. Cromatoplaça dos extratos brutos de colmos de bambus, dissolvidos em metanol. Sistema 1: acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético glacial e água (100:11:11:26). Visualização: luz UV 366 nm (I), 254 nm (II), e 366 nm após nebulização com reagente NP (III).

Rf = 0,85
Rf = 0,58
Rf = 0,28
Rf = 0,15 – 0,05

III

A – *Chusquea bambusoides*; **B** – *Chusquea capituliflora*; **C** – *Chusquea meyeriana*; **D** – *Merostachys pluriflora*; **E** – *Aulonemia aristulata*; **1** – umbeliferona; **2** – vitexina; **3** – iso-orientina; **4** – orientina; **5** – rutina; **6** – ácido clorogênico; **7** – ácido fenólico; **8** – ácido gálico.

Figura 34. Cromatoplaça dos extratos brutos de colmos de bambus, dissolvidos em metanol. Sistema 2: butanol, ácido acético glacial e água (3:1:1). Visualização: luz UV 366 nm (I), 254 nm (II), e 366 nm depois da pulverização com reagente NP (III).

Rf = 0,79

Rf = 0,57

Rf = 0,03

III

A – *Chusquea bambusoides*; **B** – *Chusquea capituliflora*; **C** – *Chusquea meyeriana*; **D** – *Merostachys pluriflora*; **E** – *Aulonemia aristulata*; **1** – rutina; **2** – orientina; **3** – umbeliferona; **4** – vitexina; **5** – iso-orientina; **6** – ácido clorogênico; **7** – ácido fenólico; **8** – ácido gálico.

4.1.2. Análises biológicas

4.1.2.1. Atividade antirradicalar

Existem vários métodos de avaliação do potencial antioxidante nos extratos de plantas. A maioria dos métodos preliminares (*in vitro*) está baseada nas reações de redução da substância oxidante tal como um radical ou um íon de carga maior com antioxidante. Frequentemente, durante estas reações ocorre uma mudança da coloração (que envolve a troca de absorção da radiação) da solução de amostra, qual é facilmente detectada por espectroscopia UV-Visível. Os principais testes usados no caso de extratos de bambus são sequestro do radical DPPH, ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico) ou redução de ferro (FRAP, *ing.* Ferric Reducing Antioxidant Power), dos quais, o primeiro é o mais comum. Os valores de CE₅₀ permitem a comparação rápida entre as amostras de origem diferente e triagens, como neste projeto.

Tabela 5. Valores de CE₅₀ de sequestro do radical livre DPPH dos extratos de bambus expressos em µg/mL (média ± desvio padrão).

Espécie	IQ	IB
Folhas	CE ₅₀ (µg/mL)	
<i>A. aristulata</i>	260,17±42,14 ^b	393,65±15,07 ^a
<i>C. bambusoides</i>	218,16±34,56 ^{b,c,d,e}	239,50±11,65 ^{b,c}
<i>C. capituliflora</i>	137,55±15,62 ^e	148,12±3,8 ^{d,e}
<i>C. meyeriana</i>	205,48±38,14 ^{b,c,d,e}	245,60±10,22 ^{b,c}
<i>M. pluriflora</i>	222,52±20,05 ^{b,c,d}	218,58±10,80 ^{b,c,d,e}
Colmos		
<i>A. aristulata</i>	205,68±31,22 ^{b,c,d,e}	248,26±15,69 ^{b,c}
<i>C. bambusoides</i>	236,59±42,22 ^{b,c}	374,96±41,21 ^a
<i>C. capituliflora</i>	244,36±50,30 ^{b,c}	260,65±11,73 ^b
<i>C. meyeriana</i>	168,18±21,79 ^{c,d,e}	239,71±20,14 ^{b,c}
<i>M. pluriflora</i>	174,17±12,88 ^{c,d,e}	243,03±10,07 ^{b,c}

IQ - extratos preparados através do aparelho de Soxhlet no Instituto de Química; **IB** - extratos preparados através do extrator automático ASE-300 no Instituto de Botânica.

As letras minúsculas (a,b,c,d,e) identificam as diferenças significativas entre os resultados no teste Anova One-Way com análise comparativa de Tukey. Os valores que não dividem a mesma letra são diferentes.

Como pode ser observado na tabela 5, os valores de CE₅₀ obtidos dos extratos variavam entre 137,55 µg/mL e 393,65 µg/mL. Os melhores resultados de folhas foram para de *C.*

capituliflora, que demonstrou alta atividade nos ambos tipos de extratos, IQ e IB (135,55 – 148,22 µg/mL, respectivamente). As folhas de *A. aristulata* (extrato IB) caracterizaram-se com o menor potencial antirradicalar. A maior atividade redutora do DPPH nos extratos de colmos foi obtida para as amostras de *C. meyeriana* e *M. pluriflora*, nos extratos preparados em aparelho de Soxhlet – 168,18 e 174,17 µg/mL. Os extratos destas espécies, obtidos através do ASE-300 apresentaram valores de CE₅₀ maiores: 239,71 e 243,03 µg/mL, e o que foi confirmado pelo teste estatístico (GLM), indicando que este método de extração foi responsável pela menor atividade sequestradora. Por outro lado, mesmo observando as diferenças entre os resultados para as folhas e os colmos, estas, não foram significativas. Na literatura, relata-se uma grande variabilidade dos valores de CE₅₀ do sequestro do DPPH entre as diversas partes da planta. Por exemplo, os brotos de bambus asiáticos *Phyllostachys pubescens* (Pradelle) Mazele x. J. Houz e *Phyllostachys nigra* (Lodd. Ex. Lindl.) Munro., usados como alimento funcional, apresentaram CE₅₀ = 400 – 5300 µg/mL (PARK e JHON, 2010). Já os extratos de folhas e colmos da segunda espécie demonstraram valores menores, mais próximos das espécies aqui descritas, 88,50 – 353,80 µg/mL (TANAKA et al., 2014). O extrato de folhas de outro bambu asiático, *Sasa borealis* (Hack.) Makino & Shibata, expressou atividade sequestradora de DPPH ainda melhor, para inibir 50% do radical, precisou-se somente 51,00 µg/mL da sua fração butanólica. Uma maior atividade pode ser vista para os óleos essenciais ou as substâncias isoladas de bambus, as quais, são mais eficazes que extratos ou frações (KWEON; HWANG; SUNG, 2001; PARK et al., 2007; JIN; YUAN; ZHANG, 2011; HU et al., 2011). A relativamente boa atividade antirradicalar para os extratos de bambus pode ser associada ao grande número de compostos fenólicos diferentes, quais, futuramente podem também providenciar um efeito positivo na ação fotoprotetora e outras ações biológicas desejadas.

4.1.3. Análises de formulações cosméticas

4.1.3.1. Preparo das formulações fotoprotetoras

Como os extratos IQ apresentaram melhores resultados de atividade sequestradora do radical DPPH e de fenólicos totais, eles foram selecionados para os testes de proteção solar. As formulações preparadas com os filtros solares e amostras de bambus apresentaram características diferentes de acordo com a tabela 6.

Tabela 6. Características organolépticas das formulações com os filtros solares e extratos de bambus (F1-F10) e o controle (F11) (cont.).

N	Composição	Aspecto	Características organolépticas
F1	AVO+MCO+ODP+EB (<i>A. aristulata</i> colmo)		Emulsão parcialmente homogênea, de coloração marrom e odor característico de ervas
F2	AVO+MCO+ODP+EB (<i>A. aristulata</i> folha)		Emulsão homogênea, de coloração marrom e odor característico de ervas
F3	AVO+MCO+ODP+EB (<i>C. bambusoides</i> colmo)		Emulsão parcialmente homogênea, de coloração amarelada e odor característico de ervas
F4	AVO+MCO+ODP+EB (<i>C. bambusoides</i> folha)		Emulsão homogênea, de coloração verde escura e odor característico de ervas
F5	AVO+MCO+ODP+EB (<i>C. capituliflora</i> colmo)		Emulsão parcialmente homogênea, de coloração amarelada e odor característico de ervas
F6	AVO+MCO+ODP+EB (<i>C. capituliflora</i> folha)		Emulsão homogênea, de coloração verde e odor característico de ervas
F7	AVO+MCO+ODP+EB (<i>C. merostachys</i> colmo)		Emulsão parcialmente homogênea, de coloração amarelada e odor característico de ervas
F8	AVO+MCO+ODP+EB (<i>C. merostachys</i> folha)		Emulsão homogênea, de coloração marrom e odor característico de ervas
F9	AVO+MCO+ODP+EB (<i>M. pluriflora</i> colmo)		Emulsão parcialmente homogênea, de coloração amarela e odor característico de ervas

N	Composição	Aspecto	Características organolépticas
F10	AVO+MCO+ODP+EB (<i>M. pluriflora</i> folha)		Emulsão parcialmente homogênea, de coloração marrom-laranja e odor característico de ervas
F11 (controle)	AVO+MCO+ODP		Emulsão homogênea, de coloração amarela clara e odor característico de base

AVO – Avobenzona (3%); **MOC** - *p*-metoxicinamato de octila (7,5%); **ODP** - octil dimetil PABA (8%); **EB** - extrato bruto de bambu (10%).

Todas as formulações fotoprotetoras obtidas com os extratos brutos e os filtros solares se apresentaram como pouco estáveis. Os emulgéis formados tiveram uma pequena separação de parte da fase oleosa imediatamente após o preparo, ou até 2-3 horas depois. Isto pode indicar alguma reação entre os ingredientes das fases e compostos químicos nos extratos. A maioria das formulações contendo os extratos de folhas demonstraram melhor aspecto visual, sendo mais homogêneas do que as com extratos de colmos. Todas apresentaram coloração diferente, suavemente amareladas ou esverdeadas, porém, muito distintas da formulação controle (branca). A cor forte, pode ser o resultado da incorporação de uma concentração grande do extrato (10%). O odor das formulações com os extratos foi agradável, com notas herbais. Os problemas observados durante a formação dos emulgéis (dificuldades na parte de adição dos extratos à fase aquosa e seguinte separação de fases), pode ser relacionada com as propriedades químicas e físicas diferentes dos compostos presentes nos extratos, ou de sua concentração elevada.

4.1.3.2. Eficácia fotoprotetora e fotoestabilidade *in vitro* das formulações

O fator de proteção solar (FPS) é um parâmetro principal para expressar a eficácia de um produto fotoprotetor. Tradicionalmente, avaliação do valor de FPS envolve estudos *in vivo*, pois ele define o aumento da dose necessária de irradiação para produzir eritema na pele na presença do filtro solar, em comparação com a pele não protegida (EBRAHIMZADEH et al., 2014). Recentemente, um teste *in vitro* baseado na medida de transmitância da irradiação em placas de PMMA, através da espectroscopia de reflectância difusa, confirmou uma boa correlação com o método *in vivo* (JUNIOR; KOLLIAS; COLE, 2014). Este mesmo método *in vitro* foi utilizado para avaliar o potencial anti-UV das formulações contendo os extratos de

bambus (F1-F10) e do controle (F11). A tabela 7 apresenta os valores estimados de FPS e comprimento de onda crítico antes e depois da irradiação.

Tabela 7. Fator de proteção solar (FPS, média $\pm$ desvio padrão) e comprimento de onda crítico (λ_c) das formulações F1-F11 antes e após irradiação.

N	FPS		λ_c [nm]	
	Pré-irradiação	Pós-irradiação	Pré-irradiação	Pós-irradiação
F1	86,15 $\pm$ 40,81 ^{a,b}	32,30 $\pm$ 15,55 ^{a,b,c}	380,33 $\pm$ 0,49 ^e	378,00 $\pm$ 0,91 ^{c,d}
F2	61,41 $\pm$ 37,36 ^{a,b,c}	22,04 $\pm$ 12,16 ^{c,d,e}	381,56 $\pm$ 0,61 ^b	379,56 $\pm$ 0,51 ^b
F3	34,52 $\pm$ 10,39 ^{c,d}	14,33 $\pm$ 4,17 ^{d,e}	380,61 $\pm$ 0,70 ^{c,d,e}	377,94 $\pm$ 0,73 ^d
F4	36,61 $\pm$ 10,68 ^{c,d}	35,22 $\pm$ 13,48 ^{a,b}	381,39 $\pm$ 0,61 ^{b,c,d}	379,89 $\pm$ 1,18 ^{a,b}
F5	78,22 $\pm$ 53,15 ^{a,b}	44,44 $\pm$ 37,31 ^{a,b}	381,22 $\pm$ 1,52 ^{b,c,d,e}	379,00 $\pm$ 1,88 ^{b,c}
F6	61,59 $\pm$ 35,99 ^{a,b,c}	25,93 $\pm$ 11,86 ^{b,c,d}	383,22 $\pm$ 0,55 ^a	380,72 $\pm$ 0,46 ^a
F7	84,37 $\pm$ 40,98 ^{a,b}	28,78 $\pm$ 20,12 ^{a,b,c,d}	382,11 $\pm$ 1,13 ^b	379,28 $\pm$ 0,67 ^b
F8	51,41 $\pm$ 25,84 ^{b,c}	20,41 $\pm$ 13,53 ^{c,d,e}	381,44 $\pm$ 0,51 ^{b,c,d}	379,44 $\pm$ 0,51 ^b
F9	83,19 $\pm$ 41,11 ^{a,b}	41,33 $\pm$ 24,91 ^{a,b}	380,56 $\pm$ 0,85 ^{d,e}	378,94 $\pm$ 1,11 ^{b,c,d}
F10	61,48 $\pm$ 32,26 ^{a,b,c}	41,00 $\pm$ 27,33 ^{a,b}	381,5 $\pm$ 0,92 ^{b,c}	379,78 $\pm$ 0,55 ^{a,b}
F11 (controle)	13,00 $\pm$ 2,50 ^d	6,00 $\pm$ 1,6 ^e	381,5 $\pm$ 0,62 ^{b,c}	379,5 $\pm$ 0,71 ^b

F1 - f. de colmo de *A. aristulata*; **F2** - f. de folha de *A. aristulata*; **F3** - f. de colmo de *C. bambusoides*; **F4** - f. de folha de *C. bambusoides*; **F5** - f. de colmo de *C. capituliflora*; **F6** - f. de folha de *C. capituliflora*; **F7** - f. de colmo de *C. meyeriana*; **F8** - f. de folha de *C. meyeriana*; **F9** - f. de colmo de *M. pluriflora*; **F10** - f. de folha de *M. pluriflora*; **F11** - f. dos filtros solares sem extrato de bambu (controle).

As letras minúsculas (a,b,c,d,e) identificam as diferenças significativas entre os resultados no teste Anova One-Way com análise comparativa de Tukey. Os valores da mesma coluna que não dividem a mesma letra são diferentes.

Conforme a Food and Drug Administration, um protetor solar eficaz deve possuir um FPS igual ou superior a 15, enquanto, que de acordo com Resolução da Diretoria Colegiada-RDC N° 30 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012). o valor mínimo aceito seria 6. Neste experimento, incluímos três filtros solares comuns (Avobenzona, octil dimetil PABA e *p*-metoxicinamato de octila) para obter um amplo espectro de proteção com as formulações. Como todos eles são considerados instáveis (SERPONE et al., 2002; PARIS et al., 2009), o teste possibilitou verificar a estabilidade das amostras após a adição dos extratos de bambus. Um gel desenvolvido com extrato de bambu (em 10%), sem adição dos filtros, foi incluído na pré-triagem, porém, por não ter apresentado um valor considerado efetivo (FPS < 6), os testes sem a adição dos filtros sintéticos não foram continuados (os resultados não incluídos podem ser encontrados em apêndice, página 147).

As formulações os extratos e filtros solares apresentaram valores de FPS antes da

irradiação entre 34,52 (F3) e 86,15 (F1), sendo mais ativas do que a formulação controle (F11), a qual teve um valor de FPS = 13,00. O FPS da formulação controle utilizado no ensaio foi determinado em paralelo através de um simulador de FPS on-line, no site BASF Sunscreen Simulator (basf.com) e atingiu o valor 15, o que pode comprovar, que o método é bastante confiável. As formulações com colmos tiveram os melhores resultados (F1, F5, F7, F9). O desvio padrão observado foi elevado, o que pode ser o resultado da má dissolução dos extratos secos, ou ao aspecto não-homogêneo para as fases nessas formulações. Mesmo assim, os testes estatísticos confirmaram a diferença significativa entre os valores de FPS das amostras com extratos daquele do controle. De acordo com os testes Anova One-Way e comparação de Tukey, apenas as formulações F3 e F4 (com extratos de *C. bambusoides*) foram iguais ao controle. O FPS diminuiu significativamente após a irradiação, inclusive para o controle, contudo, a eficácia para maioria das amostras continuou boa (FPS > 15). As formulações mais estáveis foram F4, F10 e F5. A amostra F4 foi a única cujo valor de FPS não mudou depois da irradiação, o que foi confirmado pelo teste t-pareado.

O comprimento de onda crítico (λ_c) é o comprimento de onda para o qual a área sob a curva integrada de densidade ótica é igual a 90% da área integrada entre 290,0 e 400,0 nm (ANVISA, 2012). Este parâmetro é um indicativo de um amplo espectro de ação do filtro solar, e o valor mínimo de λ_c deveria ser 370 nm. De acordo com esta classificação, todas as formulações desenvolvidas neste ensaio foram de amplo espectro, o que não mudou depois da irradiação.

A figura 35 representa as curvas de absorbância da radiação entre 300 e 440 nm para as formulações desenvolvidas com os extratos (F1-F10) e o controle (F11) antes e após a irradiação.

Figura 35. Absorbância das formulações F1-F11 após antes (A) e depois (B) da irradiação.

F1 - f. de colmo de *A. aristulata*; **F2** - f. de folha de *A. aristulata*; **F3** - f. de colmo de *C. bambusoides*; **F4** - f. de folha de *C. bambusoides*; **F5** - f. de colmo de *C. capituliflora*; **F6** - f. de folha de *C. capituliflora*; **F7** - f. de colmo de *C. meyeriana*; **F8** - f. de folha de *C. meyeriana*; **F9** - f. de colmo de *M. pluriflora*; **F10** - f. de folha de *M. pluriflora*; **F11** - f. dos filtros solares sem extrato de bambu 1 (controle).

A determinação do FPS *in vitro* sempre se baseia na medida da transmitância ou absorbância da radiação na faixa UVA e UVB de um produto fotoprotetor. As equações usadas para este objetivo podem variar dependendo do método usado, também como o suporte para a amostra. Os suportes mais comuns são as placas, como no caso das formulações – de PMMA ou PVC (policloreto de polivinila) e membranas que imitam a pele, ou células de quartzo, utilizadas para soluções tais como extratos vegetais. Testes *in vitro* não fornecem um resultado igual ao *in vivo*, porém, são insubstituíveis em triagens e estimativas preliminares, permitindo a diminuição dos custos e principalmente, exclusão da irradiação de seres vivos nesta etapa da pesquisa.

Infelizmente, a falta de padronização nos métodos de avaliação do FPS *in vitro*, causada pela diferente composição dos filtros usados, tipo do espectrofotômetro utilizado, diversas características das formulações e substratos empregados, dificulta a comparação dos resultados entre ensaios diferentes. Em um estudo, onde foram utilizadas as placas de quartzo para os cálculos de FPS de extratos de diferentes plantas, alguns dos flavonoides isolados e o filtro solar metoxicinamato de octila (MOC), todos na concentração 0,2 mg/mL, apresentaram FPS entre

5,40 e 40,00. O resultado mais alto foi para o padrão (MOC), seguido por sakuranetina, um flavonoide de *Lippia microphylla* Cham., uma planta endêmica do Brasil da família Verbenaceae, que teve FPS 38,27, semelhante ao do padrão. O extrato bruto da planta teve um FPS 30% mais baixo (26,82), sugerindo que os metabólitos isolados podem ter um efeito melhor que o dos extratos (NUNES et al., 2018). Os extratos de espécies do mesmo gênero foram incorporados em formulações fotoprotetoras na concentração de 10% (sem adição dos filtros solares) através da metodologia com as placas de PMMA, atingindo os valores de FPS entre 2,3 e 7,6 (POLONINI; BRANDÃO; RAPOSO, 2014). Semelhantemente, em um ensaio, desenvolvido na Polônia, com a mesma tecnologia de reflectância difusa com esfera de integração com as placas de PMMA, para estimar o FPS e λ_c das frações de acetato de etila (10%) de *Helichrysum arenarium* (L.) Moench, *Crataegus monogyna* Jacq. e *Sambucus nigra* L., isoladamente e em combinações. As leituras das absorbâncias das placas com formulações apresentaram os seguintes valores de FPS: *H. arenarium* – 6,80, *C. monogyna* – 6,00 e *Sambucus nigra* – 9,88, que diminuíram um pouco depois da irradiação. Os valores de λ_c obtidos definiram aquelas formulações como de amplo espectro de ação (JARZYCKA et al., 2013). Os resultados obtidos aqui com as formulações contendo somente extratos de bambu e aqueles com outras espécies vegetais indicam que para se obter altos valores de FPS ainda é necessária a adição de filtros sintéticos

Existem outras plantas nativas que tiveram seu FPS avaliado por meio de medida de absorbância direta de suas soluções em células de quartzo, por exemplo *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. (Fabaceae) (MORAIS et al., 2018) e *Marcetia taxifolia* (A. St.-Hil.) DC. (Melastomataceae) (COSTA et al., 2015). Apesar de provável superestimação dos resultados e menor correlação com os ensaios *in vivo*, o método serve para definir as tendências entre as amostras pesquisadas, como no caso da *D. ecastaphyllum* - os valores de FPS variam dependendo do lugar da coleta, o que terá grande influência na escolha do futuro fonte da matéria prima.

Como na pesquisa acima, outros estudos tratam da capacidade de aumentar a ação anti-UV dos filtros solares por adição de substâncias derivadas de plantas. Uma formulação cosmética desenvolvida com dois filtros solares sintéticos e um flavonoide (hesperidina), incorporados em nanopartículas de lipídeos com óleos de *Amaranthus cruentus* L. e *Cucurbita* spp, demonstrou maior proteção contra a radiação solar, o que permite a diminuição de quantidade dos filtros sintéticos (LACATUSU et al., 2018). Efeito semelhante foi observado no caso da rutina, onde o acréscimo da substância (em 0,1%, m/m) aumentou a eficácia da benzofenona-3 em 27% (OLIVEIRA et al., 2015). O mesmo composto demonstrou a ter

influência positiva na fotoestabilidade dos filtros avobenzona e *p*-metoxicinamato de octila (PINTO, 2014). Estas modificações no conteúdo dos futuros fotoprotetores pode prevenir as irritações causadas por produtos de fotodegradação dos filtros sintéticos.

Como pode ser concluído, a adição às amostras de ativos vegetais, tais como extratos ou substâncias isoladas deles, tem um grande impacto no valor de FPS do produto final. Além de aumentar o valor deste parâmetro, eles providenciam maior espectro de ação e estabilidade onde foram incorporados, o que resulta em vantagens. A diminuição da quantidade dessas substâncias potencialmente irritantes, pode gerar formulações mais seguras para uso comercial. Adicionalmente, os compostos fenólicos que fornecem este efeito, podem simultaneamente inibir os danos causados pela radiação UV não filtrada, agir contra os processos inflamatórios induzidos por ela a longo prazo e ter ação inibidora na produção de enzima tirosinase, qual é responsável pelo processo de melanogênese (bronzeamento) (CHANG, 2009).

4.2. Análises adicionais com o extrato de colmos de *M. pluriflora*

Devido aos bons resultados obtidos para sequestro de radicais DPPH, valor de FPS e o aumento da estabilidade das formulações com o extrato de colmos de *M. pluriflora*, e também a grande disponibilidade do material vegetal, o mesmo foi escolhido para dar continuidade aos estudos. As análises complementares incluíram: fracionamento, avaliação da composição química e atividade antioxidante das frações, FPS *in vitro* das formulações com extrato e as frações nas concentrações ajustada, teste de citotoxicidade do extrato, e por último, determinação do FPS e fotoirritação *in vivo* da formulação com extrato bruto na concentração corrigida.

4.2.1. Análises químicas das frações

4.2.1.1. Rendimentos

O extrato bruto dos colmos da *M. pluriflora* foi fracionado com solventes de polaridade crescente, para verificar qual dos grupos de metabólitos seriam os responsáveis pelos efeitos antioxidante e fotoprotetor. O rendimento das frações obtidas está mostrado na tabela 8.

Tabela 8. Massa do material seco, da fração e o rendimento calculado de partição do extrato de colmo da *M. pluriflora*.

Fração	Massa do extrato [g]	Massa da fração [g]	Rendimento [%]
Hexânica	30	0,16	0,53
Clorofórmica		2,45	8,17
Acetato de etila		0,63	2,10
Butanólica		0,44	1,47

A partição com solventes de diferente polaridade permite o isolamento de grupos de compostos segundo um gradiente de solubilidade. Em hexano, são extraídos compostos menos polares tais como: ácidos graxos, ceras e clorofila. Por outro lado, clorofórmio e acetato de etila normalmente separam flavonas, flavonóis e flavonoides monoglicosilados. Os flavonoides di- e poliglicosilados ficam no resíduo aquoso ou na fração mais polar – butanólica (CANNELL, 1998). No fracionamento dos colmos de *M. pluriflora*, a fração clorofórmica foi a que forneceu o maior rendimento, indicando ser mais rica em compostos como agliconas flavonoídicas ou ácidos fenólicos. Em um estudo anterior, o extrato de colmos da mesma espécie apresentou o rendimento melhor (GAGLIANO; GROMBONE-GUARATINI; FURLAN, 2018). Neste caso,

a fração mais abundante foi em acetato de etila (15,36%). Na sequência, a fração de diclorometano demonstrou 7,91% de rendimento, e a hexânica, somente 0,52%. O que pode ter tido impacto na composição diferente entre os dois extratos foi a época da coleta do material ou diferente método de extração empregado (maceração). Embora com rendimentos menores (0,02 – 0,35%), mas com a distribuição dos compostos semelhante, foram vistos com outra espécie do mesmo gênero, *M. riedeliana*, porém, para o extrato de folhas (JOSE et al., 2016). *Apoclada simplex*, outra espécie nativa, exibiu o fracionamento com rendimento das frações de colmo entre 0,6 – 21,7%, indicando uma composição diferente (o maior valor foi para a fração butanólica) (ISSA, 2015). Uma distribuição de metabólitos diferenciada foi observada também para as espécies asiáticas (KWEON; HWANG; SUNG, 2001). As proporções diferentes entre os rendimentos das frações destas espécies, sugerem, que a composição química deles pode incluir os componentes de mesmas classes de metabólitos, porém, distribuídas em modo diferente. O fracionamento possibilitou a concentração de compostos do mesmo grupo em cada fração, o que pode aumentar a ação biológica esperada delas.

4.2.1.2. Teor de fenólicos totais

A distribuição dos compostos fenólicos nas frações do extrato de colmos de *M. pluriflora* foi analisada pelo mesmo método colorimétrico usado na triagem. Os resultados expressos em equivalentes de ácido gálico estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Teor dos compostos fenólicos das frações de colmo de *M. pluriflora* avaliado por meio do método com reagente de Folin-Ciocalteu. Os resultados expressos em microgramas equivalentes de ácido gálico (EAG) por miligrama de extrato seco (média $\pm$ desvio padrão).

Fração	EAG ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Hexânica	19,00 $\pm$ 0,89 ^a
Clorofórmica	145,00 $\pm$ 2,17 ^b
Acetato de etila	138,54 $\pm$ 3,19 ^c
Butanólica	90,25 $\pm$ 2,09 ^d

As letras minúsculas (a,b,c,d) apresentam as diferenças significativas de acordo com Anova One-Way e comparação de Tukey. Os valores que não dividem a mesma letra são diferentes.

De acordo com a tabela 10, as frações clorofórmica e de acetato de etila se caracterizaram com a maior quantidade dos compostos fenólicos o que pode indicar também uma maior concentração de flavonoides (CANNEL, 1998). Apesar da diferença estatística, essas duas frações apresentaram teores semelhantes 145,00 μg e 138,54 EAG/mg de planta, respectivamente. A fração hexânica apresentou o menor conteúdo de substâncias nessa classe

(19,0 µg EAG/mg) confirmando ser composta principalmente por moléculas lipofílicas. Em uma outra espécie nativa do mesmo gênero, *M. riedeliana*, o fracionamento do extrato de colmos apresentou uma distribuição de fenólicos totais semelhante tendo as maiores concentrações nas frações diclorometano e acetato de etila (JOSE, 2016). Estas frações, por serem mais ricas em moléculas com potencial efeito antioxidante e bloqueador de UV, provavelmente serão mais ativas no ensaio de atividade antirradicalar e fotoprotetora.

4.2.1.3. Teor de flavonoides

O conteúdo dos flavonoides nas frações de colmos de *M. pluriflora* foi estimado em modo igual daquele empregado durante a triagem dos extratos brutos. Os valores obtidos para cada uma delas pode ser visto na tabela 10.

Tabela 10. Teor de flavonoides nas frações de colmos de *M. pluriflora* avaliado através do método com AlCl_3 . Os resultados expressos em microgramas equivalentes de quercetina (EQ) por miligrama de extrato seco.

Fração	EQ (µg/mg)
Hexano	NA
Clorofórmio	9,10 ± 0,49 ^a
Acetato de etila	7,36 ± 0,17 ^a
<i>n</i> -Butanol	5,46 ± 0,23 ^b

As letras minúsculas (a,b) apresentam as diferenças significativas de acordo com Anova One-Way e comparação de Tukey. Os valores que não dividem a mesma letra são diferentes.

Como anteriormente observado para os compostos fenólicos totais, a fração clorofórmica apresentou a maior quantidade de flavonoides (9,10 µg EQ/mg), seguida por fração de acetato de etila (7,36 µg EQ/mg). Os mesmos não foram detectados na fração em hexano. *Apoclada simplex* e *M. riedeliana*, outras espécies brasileiras, apresentaram uma concentração de flavonoides totais semelhantes nas suas frações de colmos. Os resultados variam entre 5,11 - 7,99 µg EQ/mg para as frações da *A. simplex* (ISSA, 2015) e 3,77 – 5,99 µg EQ/mg para as frações da *M. riedeliana* (JOSE, 2016). Os dois ensaios quantitativos indicaram maior quantidade de compostos com estrutura fenólica, tais como flavonoides, nas frações de clorofórmio e acetato de etila. Assim, essas duas frações serão empregadas em formulações cosméticas para determinar a sua ação no fator de proteção solar (FPS) e estabilidade dos filtros solares comerciais.

4.2.1.4. Cromatografia em camada delgada

A CCD das frações de *M. pluriflora* foi avaliada de acordo com a metodologia desenvolvida para os extratos. Os sistemas de eluente e padrões utilizados nesta análise foram descritos anteriormente na seção 3.3.5. As figuras 36 – 38 mostram as placas das frações sob a visualização em luz UV 366 e 254 nm.

Na figura 36 pode ser observado que a fração hexânica contém um composto majoritário com $R_f = 0,77$, que absorve a luz UV em comprimento de onda = 366 nm emitindo uma fluorescência azul (1), igual às cumarinas. Outros compostos, ocorrem em quantidades menores e demonstram a fluorescência vermelha no $\lambda = 366$ nm ($R_f = 0,8$). Os padrões, cumarina e umbeliferona apresentaram migração diferente daquela para os compostos presentes na fração, sendo excluídos como os potenciais componentes da fração. Por outro lado, a fluorescência de cor semelhante aos padrões na fração pode indicar a presença de compostos da mesma classe nesta fração.

Figura 36. Perfil cromatográfico da fração hexânica de colmo da *M. pluriflora* em visualização sob luz UV 366 nm (1) e 254 nm (2) com sistema usado: tolueno/éter 1:1.

A – fração hexânica; B – cumarina; C – umbeliferona.

A figura 37 ilustra a separação obtida para as frações clorofórmica e acetato de etila. Estas frações têm os perfis cromatográficos semelhantes, indicando a composição química parecida. As duas frações apresentaram as manchas mais visíveis com fator de retenção entre 0,67 e 0,77, porém, apresentaram também os pontos menores com $R_f = 0,5$ e 0,03. Uma mancha

semelhante, com $R_f = 0,5$, foi identificada para a quercetina, e os R_f s baixos para alguns dos ácidos fenólicos: clorogênico e gálico, o que pode indicar a presença destes compostos ou de seus derivados nestas frações.

Figura 37. Perfil cromatográfico da fração clorofórmica e de acetato de etila de colmo da *M. pluriflora* em visualização sob luz UV 366 nm (1) e 254 nm (2) com sistema usado clorofórmio/metanol 9:1.

A fração butanólica (figura 38) não apresentou uma separação eficiente no sistema usado. As manchas escuras, mais visíveis em 254 nm, tinham $R_f = 0,71$ e $0,57$. A quercetina apresentou uma pequena mancha com $R_f = 0,71$, da forma parecida com a mancha mais alta observada na fração, o que pode ser um indicativo de que ela está presente na fração. Os demais padrões, orientina, iso-orientina, vitexina e isovitexina, exibindo fatores de retenção diferentes, não foram identificados.

Figura 38. Perfil cromatográfico da fração butanólica de colmo da *M. pluriflora* em visualização sob luz UV 366 nm (1) e 254 nm (2) com sistema usado: tetrahidrotolueno/tolueno/ácido fórmico ácido fórmico/água 16:8:2:1.

A – fração butanólica; B – quercetina; C – orientina; D – iso-orientina; E – vitexina; F – isovitexina.

A cromatografia em camada delgada permitiu a identificação de um composto principal na fração hexânica, possivelmente da classe de cumarinas, ou algum outro composto fenólico mais conjugado. As placas elaboradas para as demais frações, possibilitaram detectar a provável presença de alguns flavonoides (quercetina) e ácidos fenólicos e/ou seus derivados deles. As moléculas incluídas na composição química das amostras, foram capazes de absorver a luz UV nos comprimentos de onda utilizadas nesta análise, porém, com o fator de retenção diferente da maioria dos padrões. Isto pode significar, que estes compostos não ocorrem no extrato de colmo de *M. pluriflora*, ou ocorrem em concentração muito baixa. Por outro lado, o extrato pode possuir diferentes ácidos fenólicos, tal como: ácido benzóico, salicílico, *p*-hidroxibenzóico, isovanílico, cumárico e caféico, quais já foram detectados em duas espécies desse gênero, *M. riedeliana* (TORRES et al., 2014) e *M. magellanica* (GROMBONE-GUARATINI et al., 2011).

4.2.1.5. Cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas

Para complementar os dados da composição química do colmo de *M. pluriflora*, as frações menos polares (hexânica, clorofórmica e acetato de etila) foram submetidas a CG-EM. As condições desta análise estão descritas sob a referente parte da metodologia. Os cromatogramas obtidos estão representados nas figuras 39 – 41. A identificação dos compostos detectados foi efetuada através de comparação dos picos obtidos, e as características deles (índices de retenção e espectros de massas) com referências fornecidas na literatura (ADAMS, 2007) e bases de dados disponíveis on-line.

Figura 39. Cromatograma obtido para a fração hexânica de colmo de *M. pluriflora* através de Cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.

No primeiro cromatograma (figura 39), da fração hexânica, pode ser observada a presença pelo menos 23 substâncias diferentes. Algumas substâncias foram excluídas da identificação, classificados como artefatos, entre elas os derivados de ftalato. Nessa fração foi possível identificar 17 compostos, listados na da fração conforme a tabela 11. O composto majoritário, que apresentou uma abundância de 31,81%, eluindo com tempo de retenção (TR) de 10,46 min, foi identificado como o ácido hexadecanóico. Outros compostos nessa fração com abundância entre 7,51 e 9,93% foram identificados respectivamente como ácido linoleico, e seu éster etílico, ácido 9-octadecenóico e o hexadecanoato de etila.

Tabela 11. Composição química da fração hexânica de colmo da *M. pluriflora* através da cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.

N	Composto identificado	TR	%	IR _{calc.}	IR _{lit.}
1.	Ácido mirístico	9,03	1,43	1753	1776
2.	1-Octadeceno	9,28	1,05	1787	1793
3.	Miristato de isopropila	9,49	1,01	1817	1829
4.	Neofitadieno	9,59	1,65	1832	1844
5.	6,10,14-Trimetilo-2-pentadecanona	9,63	0,81	1838	1846
6.	Ácido pentadecanóico	9,74	2,43	1855	1869
7.	(Z)-1,3-Fitadieno	9,87	1,08	1878	1871
8.	Ácido hexadecanóico	10,46	31,81	1962	1960
9.	Hexadecanoato de etila	10,65	9,93	1990	1993
10.	Heptadecanoato de etila	11,10	1,23	2059	2077
11.	Étil heptadecanoato de etila	11,29	1,73	2089	2089
12.	Ácido linoleico	11,57	8,32	2135	2133
13.	Ácido 9-octadecenóico	11,62	9,73	2139	2144
14.	Oleato de etila	11,75	7,51	2164	2171
15.	Linoleato de etila	11,78	4,81	2178	2177
16.	Octadecanoato de etila	11,93	2,33	2189	2196
17.	Ácido beénico	12,56	1,57	2288	2470

TR – tempo de retenção expresso em minutos; **IR_{calc.}** – índice de retenção calculado; **IR_{lit.}** – índice de retenção de acordo com literatura (ADAMS, 2007) e bases de dados: NIST e PubChem.

Os compostos identificados nesta fração são principalmente ácidos graxos, e seus ésteres, cetonas e hidrocarbonetos. Compostos diferentes, como por exemplo os diterpenos neofitadieno e 1,3-fitadieno são produtos de desidratação do fitol, um componente da clorofila, que tem várias atividades biológicas (BLUMER; THOMAS, 1965; ISLAM et al., 2018).

Figura 40. Cromatograma obtido para a fração clorofórmica de colmo de *M. pluriflora* através da Cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.

O cromatograma na figura 40 apresenta a composição química da fração clorofórmica, onde foram detectadas pelo menos 25 substâncias, porém, aproximadamente a metade deles não foi possível identificar devido à co-eluição ou falta de correspondência nas bases de dados. A tabela 12 mostra os compostos identificados nesta fração. O composto majoritário (17,75%) apresentou TR = 8,97 min, sendo identificado como álcool coniferílico, um dos precursores de lignina (DEWICK, 2002). Os outros compostos mais abundantes também foram identificados como precursores ou produtos de oxidação da lignina: álcool *trans*-sinápílico (9,72%, TR = 10,71 min), sinrigaldeído (6,08%, TR = 8,32 min), 3-hidróxi-benzaldeído (5,40%, TR = 5,94 min), aldeído sinápico (4,52%, TR = 10,65 min) e vanilina (4,17%, TR = 6,31 min) (PINTO; COSTA; RODRIGUES, 2013). Os sesquiterpenos identificados nesta fração, copaeno, cadineno, curcumeno ocorreram em quantidades menores, entre 2,96 – 3,66%. Além dos derivados de lignina e sesquiterpenos, foi identificada uma pequena porção de compostos

graxos: miristato de isopropila e ácido hexadecanóico (3,37 e 2,51%). Um dos compostos menos abundantes (1,98%), foi identificado o vomifoliol, um derivado de ciclohexeno (HAMMAMI et al., 2004), que tem importância como regulador da abertura e fechamento dos estômatos (os poros das plantas) (COKE; STUART; WHITTLE, 1975).

Tabela 12. Composição química da fração clorofórmica de colmo da *M. pluriflora* através da cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.

N	Composto identificado	TR	(%)	IR _{calc}	IR _{lit.}
1.	3-Hidróxi-benzaldeído	5,94	5,40	1375	1262
2.	α -Copaeno	6,17	2,96	1405	1376
3.	Vanilina	6,31	4,17	1420	1394
4.	Curcumeno	6,98	3,28	1493	1480
5.	γ -Cadineno	7,31	3,66	1534	1513
6.	Siringaldeído	8,35	6,08	1665	1657
7.	Acetosiringona	8,87	1,66	1734	1744
8.	Álcool coniferílico	8,97	17,75	1746	1744
9.	Vomifoliol	9,36	1,98	1797	1802
10.	Miristato de isopropila	9,49	3,37	1817	1829
11.	Ácido hexadecanóico	10,43	2,51	1958	1959
12.	Aldeído sinápico	10,65	4,52	1990	1915
13.	Álcool <i>trans</i> -sinapílico	10,71	9,72	1999	1928

TR – tempo de retenção expresso em minutos; IR_{calc.} – índice de retenção calculado; IR_{lit.} – índice de retenção de acordo com literatura (ADAMS, 2007) e bases de dados: NIST e PubChem.

Na figura 41 está apresentado o cromatograma da fração de acetato de etila. Esta fração apresentou uma composição muito complexa, contendo pelo menos 44 picos. Dentre eles, com as bases de dados disponíveis, foi possível identificar apenas 17 compostos, conforme apresentado na tabela 13.

Figura 41. Cromatograma obtido para a fração de acetato de etila de colmo de *M. pluriflora* através da Cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.

Tabela 13. Composição química da fração de acetato de etila de colmo da *M. pluriflora* através da cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas em coluna capilar DB-5.

N	Composto identificado	TR	(%)	IR _{calc}	IR _{lit.}
1.	2,3-Dihidrobenzofurano	4,76	21,41	1227	1219
2.	Guaiacol	5,59	1,39	1329	1309
3.	4-Hidróxi-benzaldeído	5,94	2,97	1375	1358
4.	Vanilina	6,31	1,39	1420	1403
5.	Isoeugenol	6,72	1,00	1465	1403
6.	2-Metóxi-4-propilfenol (di-hidro eugenol)	6,77	0,95	1470	1406
7.	Hexadecano	7,83	0,46	1599	1600
8.	3,5-Dimetóxi-4-hidroxil-benzaldeído	8,35	1,22	1664	1657
9.	Álcool coniferílico	8,97	8,08	1745	1734
10.	1-Octadeceno	9,28	3,51	1798	1792
11.	Octadecano	9,33	1,33	1793	1800
12.	Hexadecanoato de metila	10,20	2,15	1923	1921
13.	Ácido hexadecanóico	10,43	3,60	1958	1960
14.	Eicosano	10,66	4,54	1991	1988
15.	Álcool <i>trans</i> -sinapílico	10,71	4,89	1999	2034
16.	Ácido octadecanóico	11,74	0,83	2159	2164
17.	1-Heneicosanol	11,94	2,38	2198	2380

TR – tempo de retenção expresso em minutos; IR_{calc.} – índice de retenção calculado; IR_{lit.} – índice de retenção de acordo com literatura (ADAMS, 2007) e bases de dados: NIST e PubChem.

Nessa fração, a substância majoritária foi 2,3-di-hidrobenzofurano (21,41%). A segunda mais abundante foi o álcool coniferílico (8,08%), também detectado na fração clorofórmica. Aqui também foram encontrados os produtos de oxidação de ligninas: vanilina (1,39%), álcool *trans*-sinapílico (4,89%), 4-hidróxi-benzaldeído (2,97%) e dimetóxi-4-hidróxi-benzaldeído (1,22%). Nessa fração também foi encontrado guaiacol (1,39%), outro composto deste grupo conhecido pela sua atividade antisséptica (LIU et al., 2018), identificado anteriormente para *P. nigra* (HONG et al., 2010). Adicionalmente, foi confirmada a presença dos derivados do eugenol, com reconhecida atividade antimicrobiana (NIELSEN et al., 2018), isoeugenol (1%) e di-hidroeugenol (0,95%).

Os componentes da lignina são compostos muito comuns em bambus, pois estas plantas têm aproximadamente 20 – 25 % deste polímero (LIESE, 1987). Ácidos benzoico, siríngico, vanílico e outros derivados de ácido *p*-cumárico foram os responsáveis pelo efeito alelopático

provocado por outra espécie do mesmo gênero, *M. riedeliana* (JOSE, 2016). Ácidos graxos, classificados como metabólitos primários estão presentes em todo reino vegetal e animal, porém, os ácidos graxos insaturados (tal como ácido linoleico) são característicos para membros do primeiro e saturados para os do segundo (DEWICK, 2002). As estruturas derivadas do isopreno (C_5), como monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}) são os principais componentes dos óleos essenciais em plantas. No perfil cromatográfico de *M. pluriflora* encontra-se várias substâncias, que já foram detectadas nas espécies nativas e asiáticas. Os mais comuns e abundantes compostos dos bambus das duas regiões são ácidos fenólicos e sesquiterpenos (ISSA, 2015; JOSE, 2016; HU et al. 2011; JIN; YUAN; ZHANG, 2012; PARK; JHON, 2010). Contudo, nas espécies brasileiras não foi detectada a presença dos triterpenos, que são importantes nas plantas da segunda região (ZHANG et al., 2006; LU et al., 2010).

4.2.1.6. Cromatografia líquida de alta eficiência

As frações, mais ricas em fenólicos e flavonoides, acetato de etila e clorofórmica, foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. Nesse experimento o detector de UV era de arranjo de fotodiodos, o qual permite a classificação dos compostos dependendo dos cromóforos presentes na molécula do produto natural. Por exemplo, como apresentado anteriormente, os flavonoides possuem duas bandas de absorção de UV diferentes, a primeira tem o seu máximo em comprimento de onda de 240 – 285 nm e a segunda em mais de 300 nm (WATSON, 2014). Em busca dos metabólitos dessa classe, e também ácidos fenólicos que apresentam a absorção em 310 – 320 nm, na identificação usou-se os dados de DAD em $\lambda = 280$ nm (cromatograma A) e $\lambda = 352$ nm (cromatograma B). A identificação da composição química foi efetuada através de comparação os tempos de retenção e espectros de absorbância obtidos para cada composto com as mesmas características dos padrões. Os padrões neste caso foram os flavonoides e ácidos fenólicos mais comuns em outros bambus.

Os cromatogramas e os dados de DAD obtidos para os picos maiores das amostras estão demonstrados nas figuras 42 – 45.

Figura 42. Cromatogramas obtidos para a fração de acetato de etila dos colmos de *M. pluriflora* através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa C18 em 280 (A) e 352 nm (B).

Figura 43. Espectro de absorção na região do UV para os compostos majoritários registrados no cromatograma em 280 nm para a f. acetato de etila dos colmos de *M. pluriflora* através da CLAE em fase reversa C18.

Figura 44. Cromatograma obtido para a fração clorofórmica dos colmos de *M. pluriflora* através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa C18 em 280 (A) e 352 nm (B).

Figura 45. Espectro de absorção na região do UV para os compostos majoritários registrados no cromatograma em 280 nm para a f. clorofórmica dos colmos de *M. pluriflora* através da CLAE em fase reversa C18.

Como pode ser visto nas figuras 42 e 44, a maioria dos compostos das frações absorveu a luz UV em $\lambda=280$, o que significa, que os flavonoides ocorrem nesta espécie em menor quantidade. Os dados de UV apresentam os picos mais intensos com máximo de absorbância

entre comprimento de onda 280 – 320 nm. Somente para algumas moléculas (os picos com TR = 15,917 e 20,637 da fração clorofórmica) parecem absorver a radiação em comprimento de onda maior. Estes resultados indicam que os ácidos fenólicos são os constituintes principais destas frações. A comparação com os cromatogramas obtidos para os padrões, foi possível confirmar a presença de somente um composto. O pico mais intenso na fração de acetato de etila, com TR = 10,123 minutos, foi identificado como ácido *p*-cumárico. Uma outra substância da mesma fração, apresentou um pico menor, com TR = 7,923, pode ser um derivado desse ácido, pois apresenta um espectro de absorção no UV muito parecido. As substâncias com TR = 35,146 e 37,326, e um composto da fração clorofórmica com TR = 14,420, cujos os espectros também foram apresentados (figuras 43 e 45), também podem ser derivados de um ácido fenólico. A aparência dos espectros deles é muito próxima ao espectro do ácido ferúlico ou clorogênico. Os picos com TR = 6,528 e 7,406 da segunda fração, que apresentaram um máximo de absorção em 320 nm, podem ser derivados de um ácido hidróxi-cinâmico, tal como ácido sinápico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico ou ácido caféico (AMAROWICZ; WEIDNER, 2001). Por outro lado, o pico com TR = 7,674, possuindo uma banda de absorção característica, tem aspecto de ser um derivado de ácido hidróxi-benzóico, como ácido vanílico ou siríngico. Os demais picos (TR = 15,917 e 20,637), foram os únicos componentes com absorção em mais de 330 nm, e por isso, eles podem ser pré-identificados como flavonas, por exemplo, derivados de apigenina ou vitexina, detectados para esta espécie anteriormente por Gagliano, Grombone-Guaratini e Furlan (2018).

Esta análise das frações de colmos de *M. pluriflora*, permitiu conferir a presença de vários ácidos fenólicos, já encontradas nas espécies asiáticas (HOYWEGHEN et al., 2012; PARK, JHON, 2010; ZHAO et al. 2019). Contudo, não foi possível confirmar a presença dos flavonoides tão comuns nas espécies dessa região – orientina, rutina e tricina (ZHAO et al., 2019; ZHANG et al., 2005). Mesmo assim, pode ser concluído, que a composição dos bambus asiáticos e brasileiros, enquanto se trata sobre os compostos fenólicos, é parecida. Isto pode indicar que as espécies nativas do Brasil terão as mesmas ações biológicas associadas com estes metabólitos.

Junto com a conclusão deste trabalho, os picos isolados através este ensaio, serão submetidos a ressonância magnética no Central Analítica do Instituto de Química da USP para finalizar com precisão a parte da identificação dos principais compostos de *M. pluriflora*.

4.2.2. Análises biológicas

4.2.2.1. Atividade sequestradora das frações

O potencial antioxidante das frações do colmo de *M. pluriflora* foi avaliado através do ensaio de sequestro do radical livre DPPH de acordo com a metodologia usada no caso dos extratos brutos, na parte da triagem. Os resultados estão apresentados na tabela 14.

Tabela 14. Potencial antioxidante das frações de colmo da *M. pluriflora* estimado através do método espectrofotométrico de sequestro do radical livre DPPH.

Fração	CE ₅₀ (µg/mL)
Hexânica	NA
Clorofórmica	68,07 ± 0,62 ^b
Acetato de etila	64,75 ± 1,14 ^b
Butanólica	89,31 ± 2,12 ^a

CE₅₀ – concentração efetiva para inibir 50% da formação do radical

As letras minúsculas (a,b) apresentam as diferenças significativas de acordo com Anova One-Way e comparação de Tukey. Os valores que não dividem a mesma letra são diferentes.

A fração que tinha a maior atividade foi a fração de acetato de etila, a concentração efetiva para inibir 50% do radical para esta fração foi 64,75 µg/mL. Fração clorofórmica atingiu quase o mesmo valor, 68,07 µg/mL (de acordo com o teste estatístico, não houve a diferença). A fração butanólica exibiu o potencial antioxidante menor (89,31 µg/mL). Não foi possível calcular a CE₅₀ para a fração hexânica, pois nas concentrações usadas (até 200 µg/mL), esta fração não mostrou a inibição maior de 18%. As frações clorofórmica e de acetato de etila demonstraram as atividades maiores, provavelmente devido à presença dos compostos fenólicos, solúveis nelas (CANNEL, 1998). Os grupos de hidroxilas livres destas moléculas são responsáveis pelo sequestro dos radicais como ROS. O mecanismo de ação se baseia na doação do átomo de hidrogênio e um elétron para os grupos funcionais dos radicais, estabilizando as estruturas deles (KUMAR; PANDEY, 2013). A fração butanólica, sendo a fração mais polar, pode conter alguns compostos fenólicos, mas a ação deles será mais fraca por que suas hidroxilas podem estar na forma de glicosídeos ou metoxiladas. A fração hexânica não exibiu atividade antioxidante por conter as substâncias apolares, pouco reativas, como ácidos graxos. Num estudo anterior, os colmos da *A. simplex* mostraram os valores de CE₅₀ para o DPPH um pouco mais baixos que os de *M. pluriflora*, entre 24,02 µg/mL e 64,55 µg/mL, porém, neste

caso a fração clorofórmica foi a fração mais potente (ISSA, 2015). Da mesma maneira, as frações de colmos da *M. riedeliana*, tiveram a maior atividade sequestradora, mostrando as CE_{50} de até 37 $\mu\text{g/mL}$ (JOSE, 2016). Curiosamente, a mesma espécie, em outro ensaio (GAGLIANO; GROMBONE-GUARATINI; FURLAN, 2018), exibiu atividade menor frente a este radical. Por outro lado, os extratos brutos dos colmos (181,92 $\mu\text{g/mL}$) tiveram maior potencial sequestrador do que suas frações (a fração mais ativa, de acetato de etila – 244,85 $\mu\text{g/mL}$). Esse tipo de resultado não é muito comum para a atividade antirradicalar, pois quando se fraciona um extrato, os compostos fenólicos acabam se concentrando em uma das frações. Um produto antioxidante de folhas de *P. nigra* var. *henonis*, obtido por extração, concentração e filtração da fração hidro-etanólica, rico em ácidos fenólicos, é famoso na Ásia por sua forte atividade sequestradora *in vivo* e *in vitro*. Este produto, além de capacidade de inativar os radicais livres, demonstrou um efeito positivo nas enzimas antioxidantes em organismos vivos, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, diminuindo a peroxidação dos lipídios e protegendo as células contra danos no DNA. Os compostos que foram identificadas como responsáveis pela esta ação são flavonas C-glicosiladas e o ácido *p*-cumárico (ZHANG et al., 2007). No caso da *M. pluriflora*, provavelmente o ácido *p*-cumárico e outros ácidos fenólicos contribuíram para a boa atividade antioxidante. De acordo com Cos et al. (2006), um extrato que possui uma CE_{50} de 100 $\mu\text{g/mL}$ nos testes biológicos *in vitro* é considerado promissor, e é recomendada a submissão para os testes *in vivo*. O bambu nativo aqui pesquisado, de acordo com esta classificação, é uma fonte importante de potenciais agentes antioxidantes, os quais podem atribuir para ação fotoprotetora, reagindo contra estresse celular causado por radiação UV.

4.2.2.2. Citotoxicidade

Os extratos de bambus, como produtos alimentares, são geralmente considerados seguros em uso oral (LU et al., 2005), por isso, não é esperado efeito citotóxico deles, especialmente em uso tópico. Mesmo assim, para garantir um certo nível de segurança antes de submeter as amostras de formulações fotoprotetoras contendo o extrato aos ensaios *in vivo*, foi feita uma avaliação preliminar de sua citotoxicidade, usando o método com MTT, muito empregado nos testes de atividade antimutagênica. Nesse ensaio foi avaliado o efeito do extrato no crescimento de três linhagens celulares diferentes: dois de adenocarcinomas, e um não carcinogênico de células epiteliais da retina. Os resultados obtidos para as três linhagens estão apresentados na tabela 15.

Tabela 15. Efeito citotóxico do extrato bruto de colmos de *M. pluriflora* frente a três linhagens de células humanas. Resultados expressos em percentagem de inibição do crescimento.

Células	Inibição de crescimento [%]			
	5 µg/mL		50 µg/mL	
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão
HCT-116	12,24	4,06	17,67	4,08
MCF-7	0	0	4,06	2,14
RPE	0	0	0	0

HCT-116 - células de adenocarcinoma de cólon; **MCF-** células de adenocarcinoma de mama; **RPE-7** – células epiteliais da retina.

Como pode ser visto na tabela 15, o extrato não inibiu o crescimento das células utilizadas no teste em mais do que 17,67%. As maiores toxicidades somente foram observadas contra as células carcinogênicas, 14,34 e 17,67%, e nas maiores concentrações (50,0 µg/mL). A menor concentração (5 µg/mL) foi capaz apenas promover alguma inibição para as células de adenocarcinoma de cólon. Em triagens na busca de extratos com efeito citotóxico, somente são considerados ativos aqueles que conseguem inibir o crescimento celular em 50% (CE₅₀) em concentrações abaixo de 20 µg/mL (CORDELL; KINGHORN; PEZZUTO, 1993). Como as células epiteliais normais não foram sensíveis ao extrato, mesmo na concentração mais elevada, significa que o extrato é seguro para as células humanas não-carcinogênicas. Até agora, não existem dados na literatura sobre a atividade citotóxica de extratos de bambu brasileiros. Contudo, existem as referências dessa atividade para algumas espécies asiáticas. Um flavonoide isolado das folhas de *Sasa senanesis* Rehder, tricina, apresentou atividade citotóxica contra células carcinogênicas (carcinoma de células escamosas orais e de leucemia promielocítica) inibindo 50% do seu crescimento na concentração de 43,0 – 78,3 µg/mL. Por outro lado, alguns derivados de luteolina, no mesmo teste, não demonstraram este efeito, mas, pelo contrário, exibiram uma ação protetora contra os danos induzidos por raios UV (MATSUTA et al., 2011). Os compostos que são conhecidos pelo seu efeito tóxico frente às células tumorais, são os triterpenóides tais como friedelina (LU et al., 2010). A falta de atividade citotóxica no caso dos bambus nativos do Brasil pode sugerir ausência destes compostos na sua composição química.

Os resultados da análise preliminar de citotoxicidade para os colmos de *M. pluriflora* não sinalizou um risco potencial para a irritação da pele quando de sua utilização em formulações para o estudo *in vivo*.

4.2.3. Análises de formulações cosméticas

4.2.3.1. Eficácia fotoprotetora e fotoestabilidade *in vitro* das formulações fotorotetoras de extratos e frações em concentrações ajustadas

As formulações com extrato e as frações mais ativas e ricas em compostos fenólicos (clorofórmica e acetato de etila) dos colmos de *M. pluriflora* tiveram suas concentrações ajustadas para estimar o FPS e fotoestabilidade. Preparou-se duas formulações com extrato bruto nas concentrações de 5 e 2,5% (F12, F13), e as duas frações na concentração de 0,1% (F14, F15). Os emulgéis obtidos foram observados como sistemas cosméticos estáveis e homogêneos, diferentemente das formulações elaboradas anteriormente para os extratos em maior concentração. As formulações obtidas, representadas na figura 46, apresentaram coloração clara (um pouco mais escuras no caso das formulações com extratos brutos) com odor agradável. A aparência das formulações foi muito melhor comparando com as formulações da triagem, com extratos brutos na concentração maior (10%). Os emulgéis formados não mudaram as suas características visuais depois de 1 hora, 24 ou 168 horas (1 semana).

Figura 46. Aspectos visuais das formulações desenvolvidas de colmo de *M. pluriflora* nas concentrações ajustadas.

F12 – f. com extrato de colmo em 5%; **F13** – f. com extrato de colmo em 2,5%; **F14** – f. com fração clorofórmica em 0,1%; **F15** – f. com fração acetato de etila em 0,1%.

O fator de proteção solar e comprimento de onda crítico das formulações antes e depois da irradiação com luz UV artificial estão incluídos na tabela 16.

Tabela 16. Fator de proteção solar (FPS) e comprimento de onda crítico (λ_c) das formulações desenvolvidas com extrato bruto e frações de colmo de *M. pluriflora* antes e depois da irradiação (media $\pm$ desvio padrão).

N	Antes da irradiação		Depois da irradiação	
	FPS	λ_c	FPS	λ_c
F12	46,75 $\pm$ 6,31 ^a	380,86 $\pm$ 0,62 ^a	24,25 $\pm$ 3,19 ^a	378,81 $\pm$ 0,98 ^a
F13	38,94 $\pm$ 6,81 ^b	379,50 $\pm$ 0,52 ^b	12,38 $\pm$ 2,03 ^b	377,38 $\pm$ 0,50 ^b
F14	28,19 $\pm$ 5,09 ^c	380,56 $\pm$ 0,51 ^a	6,63 $\pm$ 0,81 ^d	378,63 $\pm$ 0,89 ^a
F15	47,94 $\pm$ 9,5 ^a	380,38 $\pm$ 0,81 ^a	10,25 $\pm$ 1,88 ^c	378,00 $\pm$ 1,21 ^{a,b}
F11 (controle)	11,69 $\pm$ 1,45 ^d	380,44 $\pm$ 0,73 ^a	3,81 $\pm$ 0,75 ^e	377,25 $\pm$ 1,77 ^b

F12 – f. com os filtros solares e 5% de extrato; **F13** – f. com os filtros solares e 2,5% de extrato; **F14** – f. com os filtros solares e 0,1% de fração clorofórmica; **F15** – f. com os filtros solares e 0,1% de fração acetato de etila; **F11** – f. somente com os filtros solares (controle).

As letras minúsculas (a,b,c,d,e) identificam as diferenças significativas entre os resultados no teste Anova One-Way com análise comparativa de Tukey. Os valores da mesma coluna que não dividem a mesma letra, são diferentes.

Como pode ser observado, comprimento de onda crítico não mudou com diminuição da concentração das amostras de bambu. Independente dos resultados do teste estatístico, todas as amostras demonstraram amplo espectro de fotoproteção antes e depois da irradiação. A formulação que teve a maior FPS antes da irradiação foi F15 (47,94), com 0,1% da fração de acetato de etila e F12 (46,75), com 5% de extrato bruto. F14, com 0,1% da fração clorofórmica teve o menor valor de FPS das amostras de bambu, porém, todas elas eram mais eficazes do que o controle. Os valores de FPS diminuíram significativamente depois da irradiação indicando que as formulações não são completamente fotoestáveis.

Até o momento, apenas um relato sobre atividade fotoprotetora dos bambus nativos do Brasil foi encontrada, para as espécies *A. simplex* e *M. riedeliana*. Os valores de FPS das formulações elaboradas com os filtros e uma fração de bambu antes e depois da irradiação variam entre 58,7 - 72,9 (antes) e 41,4 - 51,7 (depois), respectivamente. O comprimento de onda crítico nos dois casos era grande: 385,3 e 374,2 para a segunda espécie (JOSE, 2016). Mesmo com variações, as formulações tinham amplo espectro de ação, também depois da irradiação.

Uso de formulações cosméticas para melhorar aspectos visuais da pele é muito comum desde os tempos antigos. A palavra “cosméticos” vem de uma palavra grega “kosmētikós” dos anos 1595-1605 e significa adorno (DICTIONARY.COM, LLC, 2019). Os cosméticos têm uma função de cuidar, proteger ou limpar os órgãos externos do corpo, e assim, os protetores solares pertencem a esta classe de produtos. As substâncias da origem natural tais como óleos e óleos

essenciais sempre constituíam a base destes produtos e são frequentemente utilizadas até hoje. Os derivados de plantas, principalmente compostos fenólicos, possuem várias ações biológicas, atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-mutagênica, anti-rugas ou antienvelhecimento, entre outras. Estes efeitos são resultados de diversas reações – eliminação dos radicais livre, inibição das citocinas pro-inflamatórias, modificações na produção das enzimas como por exemplo, collagenase (KORÁĆ; KHAMBHOLJA, 2011). A capacidade dos fenólicos em absorver a radiação UV, é muito conhecida, porém, nem todas as plantas têm seu FPS determinado. Além disso, no caso de várias plantas; *Commiphora mukul* (Hook. Ex Stocks) Engl., *Ocinum basilicum* L., *Peumus boldus* Molina, *Coffea arábica* L., *O. sativa*); o FPS é baixo (menos de 6), o que significa que elas sozinhas não podem fornecer uma proteção solar eficiente (RADICE et al., 2016). Filtros solares orgânicos, por outro lado, são conhecidos por causar reações adversas não desejadas tóxicas, como alergias, ou sistêmicas. Para o benzona 3, um composto estrogênico, foi reportada sua presença na urina e no plasma humana até vários dias depois da aplicação (KUNISUE et al., 2013). Os filtros, depois de serem fotodegradados ou metabolizados, sendo tóxicos para vida marinha e diversos microrganismos, constituem um dano para o meio-ambiente (SÁNCHEZ-QUILES; TOVAR-SÁNCHEZ, 2015).

De acordo com os resultados obtidos, as formulações caracterizaram-se com uma boa atividade fotoprotetora aumentando o FPS dos filtros solares incorporados. A ação observada provavelmente é relacionada com a presença de ácidos fenólicos presentes nas frações de bambu *M. pluriflora*. Estes ácidos, além de absorver a radiação solar tem vários efeitos biológicos, sugerindo, que as formulações podem ter um efeito positivo nos ensaios fotoprotetores *in vivo*.

4.2.3.2. Eficácia fotoprotetora e fotossensibilidade *in vivo* das formulações fotoprotetoras com 5% do extrato

Formulação F12 com extrato bruto de *M. pluriflora*, uma das duas mais ativas no ensaio anterior, foi preparada em maior quantidade e enviada para o centro de IPCLin para os testes de FPS e fotoirritação *in vivo*. Os resultados de FPS obtidos estão demonstrados na tabela 17. Referindo ao estudo de fotossensibilidade causada pelas amostras, de acordo com relatório recebido do Centro de pesquisa, não foram detectadas reações adversas nas áreas de aplicação do produto e do controle e nenhum participante mencionou sensação de desconforto ao produto ou ao controle.

Tabela 17. Fator de proteção solar (FPS) *in vivo* das formulações: F12, com 5% de extrato de colmo de *M. pluriflora*, F11, o controle, e P2, o padrão interno.

N	FPS <i>in vivo</i>		
	F12	F11	P2
1	17,58	15,00	20,39
2	32,99	17,07	23,21
3	25,68	15,10	23,35
4	17,81	13,36	12,52
5	17,81	13,36	15,97
6	25,81	17,01	15,99
7	22,81	17,11	16,04
8	22,76	13,39	16,01
9	22,41	16,81	17,93
10	25,81	17,01	20,65
Média	23,15±4,54	15,52±1,59	18,21±3,38

O método internacional 24444:2010 desenvolvido pela ISO é único método mundialmente comum e aceito na avaliação de FPS *in vivo* de formulações fotoprotetoras. Ele não é adequado para os testes iniciais por razões éticas que envolvem uso de voluntários saudáveis, mas no caso dos bambus não se esperava nenhum efeito indesejados, que potencialmente iriam induzir quaisquer danos de pele. De acordo com Buso et al. (2017), não existe um filtro solar natural aprovado pelas comissões internacionais. Adicionalmente, os compostos naturais que estão sendo empregados nas formulações fotoprotetoras, não foram testados de modo válido. A maioria dos dados disponíveis na literatura trata sobre atividades *in vitro* ou *in vivo* associadas com proteção solar como ação antioxidante ou antimutagênica na pele.

De acordo com teste de equivalência, o extrato de colmos de *M. pluriflora* a 5% garantiu o maior FPS dos filtros solares incorporados. O FPS da formulação, na presença do produto bioativo aumentou de 15 até 23, ou seja em 65%. Em um ensaio encontrado usando a mesma metodologia, foi pesquisada ação anti-UV de uma formulação com extrato etanólico e aquoso das folhas de *Bauhinia microstachya* var. *massambabensis* Vaz na concentração de 1% (m/m). A emulsão desenvolvida incluiu três filtros solares – benzofenona 3, metoxicinamato de octila e octocrileno, cada um em 5%, dando um valor total de 15%. Semelhante ao nosso estudo, a adição do extrato aumentou o FPS dos filtros (de 13 até 18), mas o produto sozinho não teve efeito fotoprotetor (MANSUR et al., 2016). Já para uma outra espécie *Garcinia brasiliensis*

Mart., a atividade fotoprotetora do extrato foi estimada através de medidas do impacto do extrato em processos inflamatórios causados pela radiação UV. *G. brasiliensis* demonstrou efeito positivo aumentando o nível de glutathione reduzida e diminuindo as citocinas e a atividade de peroxidases endógenas (FIGUEIREDO et al., 2014). Recentemente foi relatado, que a glutathione por possuir grupo sulfidril (SH) pode prevenir a fotodegradação da avobenzona como doador de prótons (GOVINDU et al., 2019). Consequentemente, as substâncias vegetais com capacidades redutoras, tais como ácidos fenólicos podem ser responsáveis por aumento do FPS dos filtros. Como foi observado por PERES et al. (2018), ácido ferúlico foi capaz de aumentar o FPS *in vivo* de uma formulação fotoprotetora contendo dois filtros solares potentes (bis-etil hexiloxifenol metoxifeniltriazina e etil-hexiltriazona) em 37%. Ao mesmo tempo, o ácido *p*-cumárico encontrado no extrato de *M. pluriflora* é um inibidor da enzima glutathione peroxidase (ZHANG et al., 2007), o que pode resultar em uma ação antioxidante e estabilizadora para os filtros.

Este ensaio inovador providenciou um FPS *in vivo*, pela primeira vez, de uma formulação com extrato de colmos de bambu a 5%. O extrato aumentou o valor da proteção solar dos filtros utilizados em 65%. O extrato é promissor em uma função denominada de agente impulsionador (de “booster” em inglês). Esse efeito pode ser explicado por conter ácidos fenólicos na sua composição, os quais podem adicionalmente proporcionar diversas outras ações biológicas em conjunto com sua ação fotoprotetora, por exemplo potencial atividade antioxidante e antimutagênica. Adicionalmente, a diminuição da quantidade dos filtros sintéticos para se obter altos valores de FPS pode levar ao desenvolvimento de uma formulação mais segura e benéfica para os seres humanos e o meio ambiente.

CONCLUSÕES

5. Conclusões

Neste projeto, foram pesquisadas as ações biológicas e composição química dos bambus nativos do Brasil. Para tanto, foram desenvolvidas formulações cosméticas com os extratos brutos das plantas e três filtros solares comerciais, com objetivo de obter o fator de proteção solar (FPS *in vitro*). As cinco espécies alvo demonstraram uma atividade sequestradora de radical DPPH satisfatória e aumentaram o FPS dos filtros solares sintéticos, indicando boa atividade fotoprotetora e amplo espectro de ação contra a radiação UV. Com relação à composição química, todas as amostras caracterizaram-se pela grande quantidade de compostos fenólicos. Os testes qualitativos de cromatografia não indicaram a presença dos flavonoides característicos para as espécies asiáticas. Devido aos resultados obtidos na fase de triagem, o extrato dos colmos de *Merostachys pluriflora* foi selecionado para os testes adicionais, entre outros, fracionamento, citotoxicidade, ações biológicas das frações e para os ensaios *in vivo* de atividade fotoprotetora e ação fotoirritante. O extrato dos colmos dessa espécie foi classificado como não tóxico frente às células humanas não-carcinogênicas RPE. As frações do extrato demonstraram maior concentração de compostos ativos, o que melhorou o seu potencial antioxidante. As formulações cosméticas com o extrato e as frações, em concentrações menores que na triagem, exibiram bom aspecto visual. O nível de fotoproteção se manteve elevado. A análise por CG-Massas e CLAE permitiram identificar ácidos fenólicos, ácidos graxos, sesquiterpenos e produtos de degradação de lignina como os compostos principais. Os testes *in vivo* das formulações cosméticas confirmaram a capacidade dos extratos em aumentar o FPS dos filtros orgânicos e não causaram a irritação da pele dos voluntários, mesmo depois da irradiação. O ácido *p*-cumárico, pela sua quantidade alta nas frações, pode ser o principal metabólito responsável pelas atividades biológicas de *M. pluriflora*. Os extratos de bambus nativos foram considerados como promissores inibidores do estresse celular e absorventes da radiação ultravioleta, e, conseqüentemente, agentes interessantes para a incorporação em formulações fotoprotetoras industriais.

REFERÊNCIAS

6. Referências

- ABID, A. R. et al. Photo-stability and photo-sensitizing characterization of selected sunscreens ingredients. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 332, p. 241–250, 2017.
- ABURJAI, T. Green sunscreens. In book: **Sunscreens**, Publisher: Nova, p.245-276, 2019.
- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4th Edition Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007.
- AFAQ, F. Natural agents: Cellular and molecular mechanisms of photoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 508, n. 2, p. 144–151, 2011.
- AGATI, G. et al. Plant Physiology and Biochemistry Functional roles of flavonoids in photoprotection : New evidence , lessons from the past. **Plant Physiology et Biochemistry**, v. 72, p. 35–45, 2013.
- AGATI, G.; TATTINI, M. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. **New Phytologist**, v. 186, p. 786–793, 2010.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Resolução Da Diretoria Colegiada-Rdc Nº 30, De 1 De Junho De 2012**, 2012.
- AINSWORTH, E. A.; GILLESPIE, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. **Nature Protocols**, v. 2, n. 4, p. 875–877, 2007.
- AKAO, Y. et al. A highly bioactive lignophenol derivative from bamboo lignin exhibits a potent activity to suppress apoptosis induced by oxidative stress in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 18, p. 4791–4801, 2004.
- AMAROWICZ, R.; WEIDNER, S. Content of phenolic acids in rye caryopses determined using DAD-HPLC method. **Czech Journal of Food Science**, v. 19, p. 201–205, 2001.
- American Cancer Society. **Cancer Facts & Figures 2018**. Atlanta: American Cancer Society, 2018.
- APALLA, Z. et al. Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. **Dermatology and Therapy**, v. 7, n. 1, p. S1–S19, 2017.
- ASLAM, M. S.; AHMAD, M. S. World Importance of Medicinal Plants: Current and Historical Perspectives. **Recent Advances in Biology and Medicine**, v. 2, p. 88–93, 2016.
- BACHELOR, M. A.; BOWDEN, G. T. UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression. **Seminars in Cancer Biology**, v. 14, p. 131–138, 2004.
- BADEA, G. et al. Use of various vegetable oils in designing photoprotective nanostructured formulations for UV protection and antioxidant activity. **Industrial Crops and Products**, v.

67, p. 18–24, 2015.

BALOGH, T.S. et al. Ultraviolet radiation protection: current available resources in photoprotection. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 732–742, 2011.

BASSMAN, J.H. Ecosystem consequences of enhanced solar ultraviolet radiation: secondary plant metabolites as mediators of multiple trophic interactions in terrestrial plant communities. **Photochemistry and Photobiology**, v. 79, p. 382–398, 2004.

BHARATH, A. K.; TURNER, R. J. Impact of climate change on skin cancer. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 102, p. 215–218, 2009.

BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, n. January, p. 9–19, 2012.

BLUMER, M.; THOMAS, D. W. Phytadienes in Zooplankton. **Science**, v. 147, p. 1148–1149, 1965.

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

BRITT, A.B., MAY, G.D. Re-engineering plant gene targeting. **Trends Plant Science**, v. 8, p. 90–95, 2003.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Second Edition. American Society of Plant Biologists. Wiley Blackwell. Chichester, UK, 2015.

BURMAN, A.G.; FILGUEIRAS, T.S. A review of the Wood Bamboo genera of Brazil (Gramineae: Bambusoideae: Bambuseae). **Thaiszia-Journal of Botany**, v. 3, p. 53–88, 1993.

BUSO, P. et al. Guidelines for the Development of Herbal-Based Sunscreen. In: IntechOpen, 2017.

BUTT, S.T.; CHRISTENSEN, T. Toxicity and phototoxicity of chemical sun filters. **Radiation Protection Dosimetry**, v. 91, 283–286, 2000.

BYSTRIAKOVA, N.; KAPOV, V.; LYSENKO, I. **Bamboo Biodiversity**. Africa, Madagascar and the Americas. UNEP World Conservation Monitoring Centre, Cambridge, UK and International Network for Bamboo and Rattan; Beijing, China, 2004.

CANNELL, R. J. P. **Natural Products Isolation**. Methods in Biotechnology. Humana Press. Totowa, New Jersey, 1998.

CEFALI, L. C. et al. Plant-based active photoprotectants for sunscreens. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 38, n. 4, p. 346–353, 2016.

CHANG, T. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 2440–2475, 2009.

CHENG, Y. et al. Decomposition of Five Phenolic Compounds in High Temperature Water. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 11, p. 2102–2107, 2014

CHEN, Y. et al. Bamboo-shaving polysaccharide protects against high-diet induced obesity and modulates the gut microbiota of mice. **Journal of Functional Foods**, v. 49, p. 20–31, 2018.

CHOI, M. H. et al. Antioxidative and Anti-Melanogenic Activities of Bamboo Stems (*Phyllostachys nigra* variety *henosis*) via PKA/CREB-Mediated MITF Downregulation in B16F10 Melanoma Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 409, p. 1–18, 2018.

CHRIST, B.; MÜLLER, K. H. Zur serienmaessigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen. **Archiv der Pharmazie**, v. 293, p. 1033–1042, 1960.

CLARK, L. G. Systematics of *Chusquea* section *Swallenochloa*, section *Verticillatae*, section *Serpentes*, and section *Longifoliae* (Poaceae: Bambusoideae). **Systematic Botany Monographs**, v. 27, p. 1–127, 1989.

CLARK, L. G. Four new species of *Chusquea* (Poaceae: Bambusoideae) from Brazil and Ecuador. **Brittonia**, v. 48, p. 250–262, 1996.

CLARK, L. G. Diversity, biogeography, and evolution in *Chusquea* (Poaceae: Bambusoideae). In “**The Bamboos**” (G. Chapman, Ed.), p. 33–44, Academic Press, London, 1997.

CLARK, L., Bamboos: the centrepiece of the grass family. In: Chapman, G.P. (ed.) **The Bamboos**. Linnean Society Symposium Series Number 19, p. 501–512, 1997.

COCKELL, C. S.; KNOWLAND, J. Ultraviolet radiation screening compounds. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 74, n. 3, p.311–345, 1999.

COKE, L. B.; STUART, K. L.; WHITTLE, G. Further Effects of Vomifoliol on Stomatal Aperture and on the Germination of Lettuce and the Growth of Cucumber Seedlings. **Planta**, v. 127, p. 21–25, 1975.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. **Resolução 466/12 do Ministério da Saúde**. Diário Oficial.

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. **Resolução Normativa 196/96**. Diário Oficial.

CORDELL, G. A.; KINGHORN, D.; PEZZUTO, J. M. **Separation, Structure Elucidation, and Bioassay of Cytotoxic Natural Products**. In: *Bioactive Natural Products*, CRC Press, p. 192, 1993.

COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* proof-of concept. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 290–302, 2006.

COSMETICS EUROPE, COLIPA (European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association). **Method for In Vitro Determination of UVA Protection, 2011, In Vitro Method for the Determination of the UVA Protection Factor and “Critical Wavelength” Values of Sunscreen Products**, Guidelines, 2011.

COSTA, S. C. C. et al. In vitro photoprotective effects of *Marcetia taxifolia* ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 413–418, 2015.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads *. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 7–24, 2005.

DAR, R. A. et al. Natural product medicines: A literature update. **The Journal of Phytopharmacology**, v. 6, n. 6, p. 340–342, 2017.

DAYAN, N. **Skin Aging Handbook. An Integrated Approach to Biochemistry and Product Development**. William Andrew. Norwich, NY, USA, 2008.

DE GRUIJL, F.R.; VAN DER LEUN, J.C. Estimate of the wavelength dependency of ultraviolet carcinogenesis in humans and its relevance to the risk assessment of stratospheric ozone depletion. **Health Physics**, v. 67, p. 319–325, 1994.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. Second Edition**. Chichester: England, John Wiley & Sons Ltd, 2002.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites**, v.2, p. 303–336, 2012.

DICTIONARY.COM, LLC. Disponível em: <<https://www.dictionary.com/browse/cosmetic>>.

DIFFEY, B. L. Sources and measurement of ultraviolet radiation. **Methods**, v. 28, p. 4–13, 2002.

DING, Y. Q. et al. Chromatographic analysis of polysaccharides extracted from Chinese *Indocalamus tessellatus*. **Biomedical Chromatography**, v. 12, n. 2, p. 86–88, 1998.

DOOL, V. D.; KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p.463–471, 1963.

DOS SANTOS, S. C.; BUDKE, J. C.; MULLER, A. Regeneração de espécies arbóreas sob a influência de *Merostachys multiramea* Hack. (Poaceae) em uma floresta subtropical. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 1, 218–229, 2012.

DUNFORD, R. et al. Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. **FEBS Letters**, v. 418, p. 87–90, 1997.

EBRAHIMZADEH, M. A. et al. Correlation between sun protection factor and antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some medicinal plants. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 3, p. 1041–1048, 2014.

ENCYCLOPÆDIA BRITANNICA – enciclopédia on-line. Disponível em: <<https://www.britannica.com/>>.

FIGUEIREDO, S. A. et al. *In vitro* and *in vivo* photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 131, p. 65–73, 2014.

FILGUEIRAS, T. S.; SANTOS-GONÇALVES, A. P. A checklist of the basal grasses and bamboos in Brazil (Poaceae). **Bamboo Science and Culture**, v. 18, p. 7–18, 2004.

FLORA DO BRASIL 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB105384>>. Acesso em: 05 Fev. 2019

FROHNMEYER, H.; STAIGEN, D. Ultraviolet-B Radiation-Mediated Responses in Plants. Balancing Damage and Protection. **Plant Physiology**, v. 133, p. 1420–1426, 2003.

FRYER, J. Review Article. Evidence For The Photoprotective Effects Of Vitamin E. **Phytochemistry and Phytobiology**, v. 58, n. 2, p. 304–312, 1993.

GAGLIANO, J.; FURLAN, C. M. **Antimicrobial potential of extracts and fractions from *Merostachys pluriflora*; a native bamboo from Atlantic Forest**, Brazil; Resumo apresentado em: 5th Brazilian Conference on Natural Products, Atibaia, SP, Brasil, 2015.

GAGLIANO, J.; GROMBONE-GUARATINI, M. T.; FURLAN, C. M. Antioxidant potential and HPLC-DAD profile of phenolic compounds from leaves and culms of *Merostachys pluriflora*. **South African Journal of Botany**, v. 115, p. 24–30, 2018.

GOVINDU, P. C. V. et al. Glutathione as a photo-stabilizer of avobenzone: an evaluation under glass-filtered sunlight using UV-spectroscopy. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 18, p. 198–207, 2019.

GROMBONE-GUARATINI, M. T. et al. Allelopathic potential of *Aulonemia aristulata* (Döll) McClure, a native bamboo of Atlantic Rain Forest. **Allelopathy Journal**, v. 24, n. 1, p. 183–190, 2009.

GROMBONE-GUARATINI, M. T. et al. **Avaliação do potencial alelopático de cinco espécies de bambu nativas: implicações para a dominância na estrutura florestal**, em: A.C.T. de V. GUIMARÃES, J.G. DE ALMEIDA, Anais do 2º Seminário Nacional do Bambu: Consolidação da Rede Brasileira do Bambu; Brasília, p. 50–56, 2011.

GUY, G. P. et al. Prevalence and Costs of Skin Cancer Treatment in the U.S., 2002 – 2006 and 2007 – 2011. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 48, n. 2, p. 183–187, 2015.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Fifth Edition. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2015.

HAMMAMI, S. et al. Isolation and Structure Elucidation of a Flavanone, a Flavanone Glycoside and Vomifoliol from *Echiochilon Fruticosum* Growing in Tunisia. **Molecules**, v.9, p. 602–608, 2004.

HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. **The Flavonoids: Advances in Research**; Springer Science Business Media Dordrecht. Publicado por Chapman and Hall Ltd em 1982.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19–20, p. 894–901, 2008.

HERZOG, B.; SCHULTHEISS, A.; GIESINGER, J. On the validity of Beer-Lambert Law and its significance for sunscreens. **Photochemistry and Photobiology**, v. 94, p. 384–389, 2018.

HESSEN, D. O. Solar radiation and the evolution of life. In: **Solar Radiation and Human Health**. The Norwegian Academy of Science and Letters, 2008.

HIDALGO-LÓPEZ, O. **Bamboo: The Gift of the Gods. First Edition**. ISBN 958 33 4298 X, D'VINNI, Colombia, 2003, p. 553.

HOLICK, M. F. Biological Effects of Sunlight, Ultraviolet Radiation, Visible Light, Infrared Radiation and Vitamin D for Health. **Anticancer Research**, v. 36, p. 1345–1356, 2016.

HOLICK, M. F.; TIAN, X. Q.; ALLEN, M. Evolutionary importance for the membrane enhancement of the production of vitamin D₃ in the skin of poikilothermic animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 92, p. 3124–3126, 1995.

HONG, E. J. et al. Protective effects of the pyrolyzates derived from bamboo against neuronal damage and hematoaggregation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 3, p. 594–599, 2010.

HORNECK, G. Quantification of the biological effectiveness of environmental UV radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 31, n. 1–2, p. 43–49, 1995.

HOYWEGHEN, L. V. et al. Phenolic Compounds and Anti-oxidant Capacity of Twelve Morphologically Heterogeneous Bamboo species. **Phytochemical Analysis**, v. 23, p. 433–443, 2012.

HU, C. J. et al. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oil of Bamboo Leaves from Four Species in China. **Asian Journal of Chemistry**, v. 23, n. 6, p. 2543–2547, 2011.

HU, C.; ZHANG, Y.; KITTS, D. D. Evaluation of Antioxidant and Prooxidant Activities of Bamboo *Phyllostachys nigra* Var. *Henonis* Leaf Extract in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3170–3176, 2000.

HUANG, J. et al. Isolation, chemical characterization, and immunomodulatory activity of naturally acetylated hemicelluloses from bamboo shaving. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**, v. 18, n. 2, p. 138–151, 2017.

IKAWA, M. et al. Utilization of Folin-Ciocalteu Phenol Reagent for the Detection of Certain Nitrogen Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1811–1815, 2003.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. ISO 24444:2010 - **Cosmetics — Sun protection test methods — In vivo determination of the sun protection factor (SPF)**. 1 ed., November 15 2010.

ISLAM, M. T. et al. Phytol: A review of biomedical activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, p. 82–90, 2018.

ISSA, F. I. C. **Avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana de extratos de *Apoclada simplex* McClure & Smith (Poaceae: Bambusoideae)**. 2015. Dissertação (Mestrado em Insumos Farmacêuticos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

JARZYCKA, A. et al. Assessment of extracts of *Helichrysum arenarium*, *Crataegus monogyna*, *Sambucus nigra* in photoprotective UVA and UVB ; photostability in cosmetic emulsions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology**, v. 128, p. 50–57, 2013.

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

JOSE, M. C. **Estudo das atividades biológicas e caracterização química de dois bambus nativos: *Apoclada simplex* McClure & Smith e *Merostachys riedeliana* Rupr.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.

JOSE, M. C. et al. Phytotoxic effects of phenolic acids from *Merostachys riedeliana*, a native and overabundant Brazilian bamboo. **Chemoecology**, v. 26, p. 235–246, 2016.

JUDZIEWICZ, E. J. et al. **American bamboos**. Washington D. C.; Smithsonian Institution Press, 1999.

JUDZIEWICZ, E.J.; CLARK G. L. Classification and biogeography of New World Grasses: Anomochlooideae, Pharoideae, Ehrhartoideae, and Bambusoideae. **Journal of Systematic and Evolutionary Botany**, v. 23, n.1 (25), p. 303–314, 2007.

JUNIOR, E. R.; KOLLIAS, N.; COLE, C. New noninvasive approach assessing in vivo sun protection factor (SPF) using diffuse reflectance spectroscopy (DRS) and *in vitro* transmission. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 30, p. 202–211, 2014.

JUSSILA, A. et al. Narrow-band ultraviolet B radiation induces the expression of β -endorphin in human skin in vivo. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 155, p. 104–108, 2016.

JUZENIENE, A.; MOAN, J. Beneficial effects of UV radiation other than via vitamin D production. **Dermato-Endocrinology**, v. 4, n. 2, p. 109–117, 2012.

KHATUN, A. et al. In vitro and in vivo Antioxidant Potential of Japanese Kumaisasa Bamboo Leaf (*Sasa senanensis* Rehd). **Journal of Biochemical and Pharmacological Research**, v. 1, n. 4, p. 236–244, 2013.

KIM, C. J. et al. Rapid Identification of Radical Scavenging Phenolic Compounds from Black Bamboo Leaves using High-Performance Liquid Chromatography Coupled to an Online ABTS⁺-Based Assay. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v.

52, n. 6, p. 613–619, 2009.

KIM, K. Y. et al. Bamboo salt reduces allergic responses by modulating the caspase-1 activation in an OVA-induced allergic rhinitis mouse model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 3480–3488, 2012.

KLIGMAN, A.M. & WOODING, W.M. **A method for the measurement and evaluation of irritants of human skin**. J. Invest. Derm. 49: 78-94, 1967.

KORAĆ, R.; KHAMBHOLJA, K. Potential of herbs in skin protection from ultraviolet radiation. **Pharmacognosy Reviews**, v. 5, n. 10, p. 164, 2011.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013 (article 162750), p. 1–16, 2013.

KUNISUE, T. et al. Urinary Concentrations of Benzophenone-type UV Filters in US Women and Their Association with Endometriosis. **Environmental Science & Technology**, v. 17, p. 4624–4632, 2013.

KWEON, M. H.; HWANG, H. J.; SUNG, H. C. Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4646–4655, 2001.

LACATUSU, I. et al. New cosmetic formulations with broad photoprotective and antioxidative activities designed by amaranth and pumpkin seed oils nanocarriers. **Industrial Crops & Products**, v. 123, p. 424–433, 2018.

LIESE, W. Research on bamboo. **Wood Science and Technology**, v. 21, n. 3, p. 189–209, 1987.

LIM, H. W.; ARELLANO-MENDOZA, M. I.; STENGEL, F. Current challenges in photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 76, n. 3, p. S91–S99, 2017.

LIU, C. et al. Investigation on pyrolysis mechanism of guaiacol as lignin model compound at atmospheric pressure. **Fuel**, v. 232, p. 632–638, 2018.

LIU, H. et al. Structure characterization and hypoglycemic activity of an arabinogalactan from *Phyllostachys heterocycla* bamboo shoot shell. **Carbohydrate Polymers**, v. 201, p. 189–200, 2018.

LU, B. et al. Anti-tumor activity of triterpenoid-rich extract from bamboo shavings (*Caulis bambusae* in Teaniam). **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 38, p. 6430–6436, 2010.

LU, B. et al. Toxicology and safety of anti-oxidant of bamboo leaves. Part 1: Acute and subchronic toxicity studies on anti-oxidant of bamboo leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 5, p. 783–792, 2005.

MACWAN, C.; PATEL, H. V.; KALIA, K. A comparative evaluation of in vitro antioxidant properties of bamboo *Bambusa arundinacea* leaves extract. **Journal of Cell and Tissue Research**, v. 10, n. 3, p. 2413–2418, 2010.

- MANSUR, M. C. P. P. R. et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 2, p. 251–258, 2016.
- MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H., N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 195, p. 298–308, 2004.
- MATSUTA, T. et al. Biological Activity of Luteolin Glycosides and Tricin from *Sasa senanensis* Rehder. **In vivo**, v. 25, p. 757–762, 2011.
- MATTS, P. J. Solar Ultraviolet Radiation: Definitions and Terminology. **Dermatologic Clinics**, v. 24, p. 1–8, 2006.
- MEJÍA G. A. et al. Plantas del género bambusa: importância y aplicaciones em la indústria farmacêutica, cosmética y alimentaria. **Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**, v. 16, n. 3, p. 396–405, 2009.
- MOHANIA, D. et al. Ultraviolet Radiations: Skin Defense-Damage Mechanism. Ultraviolet Light in Human Health. **Diseases and Environment**, p. 71–87, 2017.
- MORAIS, D. V. et al. Antioxidant, photoprotective and inhibitory activity of tyrosinase in extracts of *Dalbergia ecastaphyllum*. **PLoS ONE**, v. 13, n. 11, p. 1–16, 2018.
- MORENO, P. R. H. et al. **Evaluation of the antioxidant and antimicrobial properties of native Brazilian bamboo species for future uses in cosmetics**. Resumo apresentado em: 21st IFSCC Bangkok, Thailand, 2011.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.
- NAGAI, T. et al. Antioxidant activities of the extracts from bamboo powder as underutilized resource. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 7, n. 2, p. 228–232, 2009.
- NARAYANASWAMY, V. Origin and development of Ayurveda. **Ancient Science of Life**, v.1, n.1, p. 1–7, 1981.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629–661, 2016.
- NI, Q. et al. Seasonal variations of the antioxidant composition in ground bamboo *Sasa argenteostriatus* leaves. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 2, p. 2249–2262, 2012.
- NIELSEN, C. K. et al. Antibacterial isoeugenol coating on stainless steel and polyethylene surfaces prevent biofilm growth. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, p. 179–187, 2018.
- NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review pf probable mechanisms of action and potencial applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418–425, 2001.

NISHINA, A.; UCHIBORI, T. Antimicrobial Activity of 2,6-Di-Methoxy-Para-Benzoquinone, Isolated From Thick-Stemmed Bamboo, and Its Analogs. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 2395–2398, 1991.

NIST: **National Institute of Standards Technology**. Disponível em: <<https://www.nist.gov/>>.

NUNES, A. R. et al. Photoprotective potencial of medicinal plants from Cerrado biome (Brazil) in relation to phenolic content and antioxidant activity. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 189, p. 119–123, 2018.

OHRNBERGER, D.; GOERRINGS, J. **The bamboos of the world: a preliminary study of the names and distribution of the herbaceous and woody bamboos (*Bambusoideae* Nees v. Esenbeck) documented in lists and maps**. Cologne, Odenthal, 1984.

OLIVEIRA, C. A. et al. Functional photostability and cutaneous compatibility of bioactive UVA sun care products. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 148, p. 154–159, 2015.

PANDE, H.; KUMAR, B.; VARSHNEY, V. K. HPLC-ESI-QTOF-MS analysis of phenolic compounds, antioxidant capacity and α -glucosidase inhibitory effect of *Bambusa nutans* leaves. **Indian Journal of Chemistry**, v. 57B, p. 988–996, 2018.

PARIS, C. et al. A Blocked Diketo Form of Avobenzone: Photostability, Photosensitizing Properties and Triplet Quenching by a Triazine-derived UVB-filter. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, p. 178–184, 2009.

PARK, E.; JHON, D. The antioxidant, angiotensin converting enzyme inhibition activity, and phenolic compounds of bamboo shoot extracts. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 655–659, 2010.

PARK, H. et al. Antioxidant Flavone Glycosides from the Leaves of *Sasa borealis*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, n. 2, p. 161–166, 2007.

PARK, M. H. et al. Novel PPAR α/γ Dual Agonist MHY 966 Modulates, UVB-Induced Skin Inflammation by Inhibiting NF- κ B Activity. **Public Library of Science One**, v. 8, p. 1–8, 2013.

PASCUAL, M. E. et al. Simplified Screening by TLC of Plant Drugs Simplified Screening by TLC of Plant Drugs. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 2, p. 139–143, 2002.

PATEL, M.; NAIK, S. N. Gamma-oryzanol from rice bran oil – A review. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 63, n. July, p. 569–578, 2004.

PERES, D. D'A. et al. Ferulic acid photoprotective properties in association with UV filters: multifunctional sunscreen with improved SPF and UVA-PF. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 185, p. 46–49, 2018.

PINTO, C. A. S. O. **Influência da rotina na fotoestabilização da avobenzona (filtro UVA) e do p -metoxicinamato de octila (filtro UVB)**. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, p. 212, 2014.

PINTO, P. C. R.; COSTA, C. E.; RODRIGUES, A. E. Oxidation of Lignin from *Eucalyptus globulus* Pulping Liquors to Produce Syringaldehyde and Vanillin. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, p. 4421–4428, 2013.

POHL, R. W. **Flora Costaricensis. Family # 15, Gramineae**. Editor: William Burger, Fieldiana Botany by Field Museum of Natural History. IOWA, Unites States of America. 1980.

POLEFKA, T. G. et al. Effects of Solar Radiation on the Skin. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 11, p. 134–143, 2012.

POLONINI, H. C.; BRANDÃO, M. A. F.; RAPOSO, N. R. B. A natural broad-spectrum sunscreen formulated from the dried extract of *Brazilian Lippia sericea* as a single UV filter. **RSC Advances**, v. 4, n. 107, p. 62566–62575, 2014.

PRASAD, N. R. et al. Photoprotective effect of sesamol on UVB-radiation induced oxidative stress in human blood lymphocytes *in vitro*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 20, p. 1–5, 2005.

PubChem – banco de dados de moléculas. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>.

QUATTROCCHI, U. **CRC World Dictionary of Grasses: Common Names, Scientific Names, Eponyms, Synonyms, and Etymology**. Volume 1, A–D; CRC Taylor & Francis Group, p. 227, 2006.

RADICE, M. et al. Herbal extracts, lichens and biomolecules as natural photo-protection alternatives to synthetic UV filters. A systematic review. **Fitoterapia**, v. 114, p. 144–162, 2016.

ROBBINS, W. The importance of plants. **Science**, v.100, p. 440–443, 1944.

ROSENTHAL, N. E. et al. Seasonal Affective Disorder. A Description of the Syndrome and Preliminary Findings with Light Therapy. **Archives of General Psychiatry**, v. 41, p. 72–80, 1984.

ROY, C. R. et al. The measurement of solar ultraviolet radiation. **Mutation Research**, v. 422, p. 7–14, 1988.

ROZEMA, J. et al. UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 12, p. 22–28, 1997.

SAEWAN, N.; JIMTAISONG, A. Photoprotection of natural flavonoids. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 9, p. 129–141, 2013.

SÁNCHEZ-QUILES, D.; TOVAR-SÁNCHEZ, A. Are sunscreens a new environmental risk associated with coastal tourism? **Environmental International**, v. 83, p. 158–170, 2015.

SAUNDERS, P. J.; DIFFEY, B. L. Ambulatory monitoring of ultraviolet erythema in photosensitive subjects. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 11, p. 22–24, 1995.

SCHROEDER, P.; HAENDELER, J.; KRUTMANN, J. The role of near infrared radiation in photoaging of the skin. **Experimental Gerontology**, v. 43, p. 629–632, 2008.

SERPONE, N. et al. An *in vitro* systematic spectroscopic examination of the photostabilities of a random set of commercial sunscreen lotions and their chemical UVB / UVA active agents. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 1, p. 970–981, 2002.

SHIRASUNA, R. T. **Bambus nativos (Poaceae-Bambusoideae) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brasil**. 2012. 266 f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente São Paulo, 2012.

Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2017. **Câncer da pele**. Disponível em: <<http://www.sbd.org.br/dermatologia/pele/doencas-e-problemas/cancer-da-pele/64/>> Acesso em 20 Jan. 2019.

SODERSTROM, T. R.; CALDERÓN, C. E. A Commentary on the Bamboo (Poaceae: Bambusoideae). **Biotropica**, v. 11, n. 3, p. 161–172, 1979.

SODERSTROM, T. R.; CALDERÓN, C. E. Primitive Forest Grass and Evolution of the Bambusoideae. **Biotropica**, v. 6, n. 3, p. 141–153, 1974.

SODERSTROM, T. R.; ELLIS, R. P. The position of bamboo genera and allies in system of grass classification. **Grass Systematics and Evolution**; Smithsonian, p. 225–238, 1987.

SODERSTROM, T. R.; JUDZIEWICZ, E. J., CLARK, L. G. **Distribution patterns of neotropical bamboos**. In “Proceedings of a Workshop on Neotropical Distribution Patterns” (W. R. HEYER AND P. E. VANZOLINI, EDS.); Academia Brasileira de Ciencias, Rio de Janeiro, p. 121–157, 1988.

SORENG, R. J. et al. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae) II: An update and a comparison of two 2015 classifications. Review. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 55, n. 4, p. 259–290, 2017.

SPRINGSTEEN, A. et al. In vitro measurement of sun protection factor of sunscreens by diffuse transmittance. **Analytica Chimica Acta**, v. 380, n. 2–3, p. 155–164, 1999.

STAFFORD, H. A. Flavonoid Evolution: An Enzymic Approach. **Plant Physiology**, v. 96, p. 680–685, 1991.

SVOBODOVÁ, A.; PSOTOVÁ, J.; WALTEROVÁ, D. Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia**, v. 147, n. 2, p. 137–145, 2003.

TAKAHASHI, J. Bamboo in Latin America: Past, Present and the Future; Bamboo for the Environment, Development and Trade; International Bamboo Workshop, **International Network for Bamboo and Rattan**, China, 2006.

TANAKA, A. et al. Biological Activities and Phytochemical Profiles of Extracts from Different Parts of Bamboo (*Phyllostachys pubescens*). **Molecules**, v. 19, p. 8238–8260, 2014.

TAO, C. et al. Antimicrobial activities of bamboo (*Phyllostachys heterocycla* cv. *Pubescens*) leaf essential oil and its major components. **European Food Research Technology**, v. 244, n. 5, p. 881–891, 2018.

TATTINI, M. et al. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. **New Phytologist**, v. 163, p. 547–561, 2004.

TEDESCO, A.C.; MARTÍNEZ, L.; GONZÁLEZ, S. Photochemistry and photobiology of actinic erythema: defensive and reparative cutaneous mechanisms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 561–575, 1997.

TOLBIN, A. Y.; PUSHKAREV, V. E.; TOMILOVA, L. G. A mathematical analysis of deviations from linearity of Beer's law. **Chemical Physics Letters**, v. 706, p. 520–524, 2018.

TONGCO, J. V. V.; AGUDA, R. M.; RAZAL, R. A. Proximate analysis, phytochemical screening, and total phenolic and flavonoid content of Philippine bamboo *Schizostachyum lumampao*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 1, p. 709–713, 2014.

TORRE, B. G.; ALBERICIO, F. The Pharmaceutical Industry in 2017. An Analysis of FDA Approvals from the Perspective of Molecules. **Molecules**, v. 23, n. 533, p. 1–8, 2018.

TORRES, L. et al. Phenolic acids and C-glycoside flavonoids in *Merostachys riedeliana* (bamboo); **Planta Medica**, v. 80, P2B99, 2014.

United States Patent. COMPTON et al. **Sunscreens from vegetable oil and plant phenols**. US 6346236 B1, Feb. 12, 2002.

United States Patent. ZHANG, Y. et al. **Composition containing total triterpenoid sapogenins extracted from bamboo, and the preparation method and use therefore**. US 7811997 B2, Oct. 12, 2010.

UNITED STATES, 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, 117, p. 46, 2011.

VIHAKAS, M. **Flavonoids and Other Phenolic Compounds: Characterization and Interactions with Lepidopteran and Sawfly larvae**. Turun yliopisto University of Turku, Turku, Finland, 2014.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis, a Thin Layer Chromatography**. Second Edition. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2001.

WANG, J. et al. TLC screening for antioxidant activity of extracts from fifteen bamboo species and identification of antioxidant flavone glycosides from leaves of *Bambusa. textilis* McClure. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 12297–12311, 2012.

WATSON, R. R. **Polyphenols in Plants: Isolation, Purification and Extract Preparation**. Academic Press, Elsevier, 2014.

WEDLER, J. et al. *In vitro* anti-inflammatory and wound healing potential of a *Phyllostachys edulis* leaf extract – Identification of Isoorientin as an active compound. **Planta Medica**, v. 80, p. 1678–1684, 2014.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99–105, 1998.

XU, D. et al. Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 96, p. 20–31, 2017.

YI, R. et al. Anti-tumor activities of bamboo salt on sarcoma 180 tumor-bearing BALB/c mice. **Biomedical Research**, v. 28, n. 9, p. 4043–4048, 2017.

YOOU M. et al. Bamboo salt suppresses skin inflammation in mice with 2,4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis. **Chinese Journal of Natural Medicine**, v. 16, n. 2, p. 97–104, 2018.

ZHANG, J. et al. The effects of 4-hydroxybenzoic acid identified from bamboo (*Dendrocalamus asper*) shoots on Kv1.4 channel. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 25, n. 1, p. 101–113, 2018.

ZHANG, Y. et al. Anti-fatigue Activity of a Triterpenoid-rich Extract from Chinese Bamboo Shavings (*Caulis bamfusae* in Taeniam). **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 872–876, 2006.

ZHANG, Y. et al. Determination of flavone C -glucosides in antioxidant of bamboo leaves (AOB) fortified foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet diode array detection. **Journal of Chromatography**, v. 1065, p. 177–185, 2005.

ZHANG, Y. et al. Metabolism of flavone C-glucosides and *p*-cumaric acid from antioxidant leaves (AOB) in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 97, p. 484–494, 2007.

ZHANG, Y. et al. Safety evaluation of a triterpenoid-rich extract from bamboo shavings. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 11, p. 1867–1875, 2004.

ZHANG, Y.; DING, X. L. Studies on anti-oxidative fraction in bamboo leaves and its capacity to scavenge active oxygen radicals. **Journal of Bamboo Research**, v. 15, p. 17–24, 1996.

ZHAO X. et al. Anti-ageing skin effects of Korean bamboo salt on SKH1 hairless mice. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 103, p. 1–13, 2018.

ZHAO, X. et al. Bamboo salt attenuates CCl₄-induced hepatic damage in Sprague-Dawley rats. **Nutrition Research and Practice**, v. 7, n. 4, p. 273–280, 2013.

ZHAO, X.; KIM, S. Y.; PARK, K. Y. Bamboo Salt Has *in Vitro* Anticancer Activity in HCT-116 Cells and Exerts Anti-Metastatic Effects *in Vivo*. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 1, p. 9–19, 2013.

ZHAO, Y. et al. Characterization and classification of three common *Bambusoideae* species in Korea by an HPLC-based analytical platform coupled with multivariate statistical analysis.

Industrial Crops & Products, v. 130, p. 389–397, 2019.

ZUSSMAN, J.; AHDOUT, J.; KIM, J. Vitamins and photoaging: Do scientific data support their use? **American Academy of Dermatology**, v. September, p. 507–525, 2010.

APÊNDICE – Resultados não incluídos na tese

Comparação da atividade dos extratos de bambu na formulação sem adição dos filtros solares:

“Gel” – formulação base, sem filtros solares e composto bioativo,

“Gel Bambu” – formulação base com extrato de bambu em 10% (folha de *C. capitulifrola*),

“Gel Bambu Filtros” – formulação base com filtros solares e extrato de f. de *C. capituliflora*,

“Gel filtros” – formulação base com filtros solares, sem adição do composto bioativo.

Tukey Pairwise

Informações do agrupamento com teste de Tukey com 95% de nível de confiança.

tipo	N	Média	Agrupamento
Gel Bambu+Filtros	9	28.22	A
Gel Filtros	9	14.444	B
Gel Bambu	9	3.667	C
Gel	9	1.000	C

As médias que não dividem a mesma letra são estatisticamente diferentes.

ANEXO A – Parecer substantiado para a Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Ensaios pre-clínicos e clínicos do potencial antioxidante e fotoprotetor de extratos de bambus nativos.

Pesquisador: PAULO ROBERTO HRIHOROWITSCH MORENO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 77811317.0.0000.0087

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.528.318

Apresentação do Projeto:

O presente projeto foi inicialmente apreciado em reunião deste CEP em 28 de novembro de 2017.

Os bambus nativos do Brasil, com exceção de seu uso como material de construção, têm encontrado poucas aplicações devido à falta de conhecimento abrangente sobre sua composição química e atividades biológicas. Neste projeto, serão pesquisados os extratos etanólicos de colmos e folhas de cinco espécies de bambu do Sudeste brasileiro: *Aulonemia aristulata* (Döll) McClure., *Chusquea bambusoides* Rupr. ex Döll, *Chusquea capituliflora* Trin. var. *pubescens* McClure, *Chusquea meyeriana* Rupr.,

Merostachys pluriflora Munro ex E.G. Camus, para avaliar sua atividade antioxidante, composição química, e atividade fotoprotetora. Atividade antioxidante será medida por meio do teste de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). Análise da composição química dos extratos será realizada por TLC em gel de sílica, utilizando como padrões: quercetina, orientina, iso-orientina, vitexina, isovitexina, rutina, ácido clorogênico, ácido gálico e ácido ferúlico. A avaliação da eficácia de proteção solar in vitro dos extratos será estimada por espectrofotometria de reflectância difusa com esfera de integração em placas de polimetilmetacrilato. Os

dados obtidos serão convertidos para estimar os valores de fator de proteção solar (FPS) e o comprimento de onda crítico (c). Posteriormente, o extrato bruto do bambu mais ativo será fracionado por partição com solventes de diferentes polaridades (hexano, clorofórmio, acetato de

Continuação do Parecer: 2.528.318

etila, nbutanol), com a finalidade de identificar os compostos ativos. Com a espécie mais potente serão preparadas formulações com filtros solares, para determinação do Fator de Proteção Solar (FPS), fator de proteção UVA (UVA-PF) e da fotoestabilidade *in vitro*. Por último, será realizado o estudo *ex vivo* da atividade antioxidante após a exposição à luz solar artificial pelo método de tape stripping, bem como os ensaios *in vivo* para a determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) e o potencial fotoirritante das formulações com a maior potência.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar atividade antioxidante e fotoprotetora dos extratos de bambus nativos do Brasil. Avaliar atividade antioxidante *ex vivo*, Fator de Proteção Solar (FPS) e ação foto-irritante *in vivo* das formulações de bambu.

Objetivo Secundário:

Determinação de atividade antioxidante de todos extratos pela inativação do radical livre DPPH. Análise da composição química dos extratos mais ativos, com o foco no seu conteúdo fenólico. Avaliação *in vitro* do Fator de Proteção Solar e foto-estabilidade das formulações preparadas dos extratos de bambus e suas frações por espectrofotometria de reflectância difusa com esfera de integração em placas de polimetilmetacrilato. Estimativa da atividade antioxidante *ex vivo*, Fator de Proteção Solar (FPS) e ação fotoirritante *in vivo* das formulações desenvolvidas dos extratos de bambus.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A aplicação tópica de produtos ativos em humanos e exposição à irradiação UV podem envolver riscos, ainda que raros, incluindo dermatites de contato e/ou alérgica, com intensidades variáveis, podendo ser graves, e, ainda eritemas e queimaduras. Por isso, os voluntários serão acompanhados diretamente, em todas as etapas do estudo *in vivo* (incluindo um período de um mês após a realização de cada ensaio), pelo médico

dermatologista e pelos pesquisadores vinculados à instituição universitária. No caso de estudo *ex vivo* o acompanhamento será providenciado somente pelos pesquisadores responsáveis.

Benefícios:

Embora não existam benefícios diretos aos participantes do estudo envolvido, o mesmo poderá trazer benefícios futuros à população, uma vez que contribuirá para ampliar o conhecimento sobre

USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 2.528.318

a segurança e eficácia de cosméticos fotoprotetores de produtos naturais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme descrito, este projeto consiste no desenvolvimento de formulações fotoprotetoras contendo extratos brutos de bambus (preparados a partir dos bambus coletados, conforme descrito no projeto). O projeto contempla a obtenção e caracterização dos extratos brutos de bambus (por meio de análises químicas e da avaliação da atividade antioxidante), desenvolvimento das formulações (cujos componentes estão descritos no projeto) e avaliação das mesmas quanto aos seguintes parâmetros: i) eficácia fotoprotetora *in vitro*; ii) fator de proteção UVA (UVA-PF) e da foto-estabilidade (ensaios *in vitro*); iii) atividade antioxidante por meio de ensaios *ex vivo* de tape stripping, envolvendo 12 participantes; iv) fator de proteção solar (FPS) *in vivo*, envolvendo 12 participantes; v) potencial irritante das formulações *in vivo* após exposição à luz solar artificial, envolvendo 25 participantes. Assim, serão envolvidos neste estudo um total de 49 participantes.

Conforme descrito no projeto, os ensaios *ex vivo* (tape-stripping) serão realizados no Laboratório de Cosmetologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, localizada na Avenida Professor Lineu Prestes, nº580. Já os ensaios *in vivo* serão realizados no Instituto IPclin - Instituto de Pesquisas Clínicas Integradas (declaração de participação anexa), localizado na Rua Evandro César Gnaccarini, 235 - Vila das Hortências - Jundiaí -SP. De acordo com o descrito no projeto, tanto para a realização dos testes *ex vivo*, quanto para os testes *in vivo*, os participantes do estudo (voluntários do sexo feminino ou masculino acima de 18 anos) serão pré-selecionados por meio da identificação do fototipo da pele de acordo com classificação de Fitzpatrick e pela faixa etária. Serão considerados potenciais voluntários aqueles que apresentarem fototipo entre I e III. Segundo consta no projeto, a exclusão do grupo de estudo será automática nas seguintes condições: gravidez ou lactação, terapia potencialmente fotossensibilizante, administração de medicamentos anti-inflamatórios, patologias dermatológicas em geral, irregularidades superficiais da pele, participação prévia em estudos de eficácia fotoprotetora ocorrido no intervalo inferior a três meses e histórico de ocorrência de efeitos adversos após exposição solar.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Este estudo envolve a participação total de 49 participantes; não é um estudo multicêntrico; a Folha de Rosto está corretamente preenchida; as declarações de participação dos colaboradores e

Continuação do Parecer: 2.528.318

de anuência do Departamento de Farmácia da FCF/USP e do IPclin Instituto de Pesquisa Clínica Integrada, onde serão realizados os estudos in vivo, estão adequadamente apresentadas; os currículos do pesquisador responsável e dos colaboradores demonstram competências para a realização do projeto; o cronograma foi apresentado, com início previsto para abril de 2018.

As seguintes pendências apontadas em parecer anterior foram devidamente esclarecidas e modificadas, conforme apresentado na versão 2 deste projeto e indicado na carta resposta:

1) Incluir descrição da equipe, indicando a função que cada um exercerá no desenvolvimento do projeto - A descrição da equipe foi anexada e está adequada;

2) Esclarecer como os participantes do estudo serão selecionados (questionário, exames clínicos, ou por outros mecanismos) e quem fará esta seleção - Os participantes serão selecionados através de um questionário e de exames clínicos conduzidos por médico dermatologista, no caso dos estudos in vivo, e através de um questionário, aplicado pelos pesquisadores, no caso de estudo ex vivo (uma vez que acompanhamento de um dermatologista não é necessário neste estudo). Esta informação foi incluída no item 3.10 de projeto de pesquisa (3.10. Ensaios ex vivo e in vivo – aspectos legais e éticos) e no formulário disponível no site Plataforma Brasil.

3) Reescrever o texto constante em "Riscos e Benefícios", conforme sugestão abaixo, excluindo as informações relativas aos conservantes e filtros (não há no projeto esclarecimentos sobre a formulação que será usada) e incluindo os riscos de queimaduras e eritemas: Riscos: A aplicação tópica de produtos ativos em humanos e exposição à irradiação UV podem envolver riscos, ainda que raros, incluindo dermatites de contato e/ou alérgica, com intensidades variáveis, podendo ser graves, e, ainda, eritemas e queimaduras. Ainda, esclarecer se haverá dermatologista disponível para atendimento e acompanhamento dos participantes, elucidando o trecho: "Por isso, os voluntários serão acompanhados diretamente, em todas as etapas do estudo in vivo (incluindo um período de um mês após a realização de cada ensaio) pelos pesquisadores vinculados à instituição universitária" - o texto foi adequadamente alterado e esclarecido.

4. Quanto aos TCLEs - os textos foram reescritos conforme sugestões no parecer anterior e as alterações estão destacadas abaixo. Também foi esclarecido como e por quem os ensaios serão acompanhados. Conforme descrito, haverá um médico dermatologista disponível para atendimento e acompanhamento dos participantes durante os ensaios in vivo. Não haverá um

Continuação do Parecer: 2.528.318

médico dermatologista durante o ensaio *ex vivo* (antioxidante) e a seguinte informação foi incluída no TCLE - "O estudo não terá acompanhamento de um profissional da saúde, porém, em caso de reações adversas que necessitem de acompanhamento ambulatorial e/ou internação, os responsáveis pela pesquisa acompanharão o voluntário até o Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (Av. Professor Lineu Prestes, 2585, Cidade Universitária, São Paulo, SP, 05508-000, telefone: (11) 3091-9200), que apresenta infraestrutura adequada para qualquer tratamento que se faça necessário."

a) TCLE do ensaio de Fotoproteção - os textos indicados a seguir devem ser reescritos de forma mais compreensível para os participantes dos estudos: i) "...possuindo várias moléculas fenólicas"....;- texto alterado para: compostos naturais "...é avaliar o potencial antioxidante, e a eficácia de proteção contra radiação ultravioleta" – alterado para: radiação solar; ..."(superfície das áreas de exposição possui, aproximadamente, 0,5 cm² e a distância mínima entre as bordas de três áreas de exposição adjacentes de 0,8 cm)" – excluído;

ii) no período, "Eventuais danos decorrentes da sua participação no estudo serão indenizados." - indicar os responsáveis pela indenização; esclarecido: "...eventuais danos decorrentes da sua participação no estudo serão indenizados por os mesmos membros da equipe de pesquisa." - neste item verificar a redação e corrigir.

iii) indicar o tempo de exposição à luz (que simula a radiação solar); - tempo de exposição: cerca de 15 minutos, adicionado no texto: "No primeiro dia, será realizada uma avaliação clínica da sua pele por um médico dermatologista, com posterior aplicação das três formulações fotoprotetoras (duas em teste e uma de controle) em suas costas entre as linhas da escápula e cintura, então você será exposto a uma fonte emissora de luz que reproduz a radiação solar por cerca de 15 minutos"

iv) informar se os participantes serão ressarcidos em relação aos gastos com transporte, uma vez que a participação deles envolverá 2 dias; - adicionado: "Os gastos de transporte durante o ensaio serão cobertos pelos responsáveis pela pesquisa."

v) esclarecer se os participantes receberão algum tipo de lanche ou refeição no período de 04 horas que permanecerem no local dos ensaios. Adicionado: "No primeiro dia do ensaio você receberá um lanche no horário de almoço."

vi) Texto riscos e benefícios alterado: "Riscos: A aplicação tópica de produtos ativos em humanos e exposição à irradiação UV podem envolver riscos, ainda que raros, incluindo dermatites de contato e/ou alérgica, com intensidades variáveis, podendo ser graves, e, ainda eritemas e queimaduras."

Por isso, os voluntários serão acompanhados diretamente, em todas as etapas do estudo in vivo (incluindo um período de um mês após a realização de cada ensaio), pelo médico dermatologista e pelos pesquisadores vinculados à instituição universitária."

b) TCLE para ensaio de Fotoirritação - os textos indicados a seguir devem ser reescritos de forma mais compreensível para os participantes dos estudos: i)"...possuindo várias moléculas fenólicas" texto alterado para: compostos naturais ; "...é avaliar o potencial antioxidante, e a eficácia de proteção contra radiação ultravioleta"- alterado para: radiação solar

ii) reescrever de forma mais clara como será o estudo, pois está bastante confuso; -texto reescrito: "Nas primeiras três semanas do estudo, o participante comparecerá ao local nas segundas, quartas e sextas – três vezes por semana (fase de indução), após serão duas semanas de descanso sem visitas no instituto, e na última semana, o participante deverá comparecer ao local na segunda e quarta-feira – duas vezes (fase de desafio)."

iii) no período, "Eventuais danos decorrentes da sua participação no estudo serão indenizados." - indicar os responsáveis pela indenização -esclarecido: "...eventuais danos decorrentes da sua participação no estudo serão indenizados por os mesmos membros da equipe de esquisa." - verificar redação deste último período e corrigir;

iv) indicar o tempo de exposição à luz (que simula a radiação solar); - tempo de exposição à luz é cerca de 7 minutos - adicionado no TCLE;

v) informar se os participantes serão ressarcidos em relação aos gastos com transporte, uma vez que a participação deles envolverá 6 SEMANAS (30 minutos cada visita, 3-2 vezes por semana com 2 semanas de descanso), conforme descrito no TCLE; adicionado: "Os gastos de transporte durante todo período de ensaio com visitas no instituto (semanas: 1-3 e 6) serão cobertos pelos responsáveis pela pesquisa."

vi) Texto riscos e benefícios alterado: "Riscos: A aplicação tópica de produtos ativos em humanos e exposição à irradiação UV podem envolver riscos, ainda que raros, incluindo dermatites de contato e/ou alérgica, com intensidades variáveis, podendo ser graves, e, ainda eritemas e queimaduras. Por isso, os voluntários serão acompanhados diretamente, em todas as etapas do estudo in vivo (incluindo um período de um mês após a realização de cada ensaio), pelo médico dermatologista e pelos pesquisadores vinculados à instituição universitária."

c) TCLE para o ensaio de Antioxidante - os textos indicados a seguir devem ser reescritos de forma mais compreensível para os participantes dos estudos: i)"...possuindo várias moléculas

fenólicas" texto alterado para: compostos naturais...; "...é avaliar o potencial antioxidante, e a eficácia de proteção contra radiação ultravioleta" – alterado para: radiação solar;

ii) esclarecer o tamanho das fitas adesivas que serão empregadas no ensaio; tamanho de fitas: padrão, diâmetro = 22 mm, adicionado: "Após duas horas da última aplicação, serão realizadas aplicações sucessivas de fitas adesivas de tamanho padrão de diâmetro = 22mm"

iii) esclarecer se os participantes receberão algum tipo de lanche ou refeição no período de 08 horas que permanecerem no laboratório; - adicionado: "... e o centro de estudos oferecerá uma refeição na hora de almoço."

iv) esclarecer se estes terão acompanhamento por Profissional da Saúde Habilitado e como serão avaliadas as peles destes participantes. – o teste não terá acompanhamento de um profissional da saúde e esta informação foi incluída no TCLE: "O estudo não terá acompanhamento de um profissional da saúde, porém, em caso de reações adversas que necessitem de acompanhamento ambulatorial e/ou internação, os responsáveis pela pesquisa acompanharão o voluntário até o Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (Av. Professor Lineu Prestes, 2565, Cidade Universitária, São Paulo, SP, 05508-000, telefone: (11) 3091-9200), que apresenta infraestrutura adequada para qualquer tratamento que se faça necessário". A pele dos participantes será avaliada visualmente pelos pesquisadores responsáveis.

v) Texto riscos e benefícios alterado: "Riscos: A aplicação tópica de produtos ativos em humanos pode envolver os riscos que ainda que raros, incluindo dermatites de contato e/ou alérgica, com intensidades variáveis, podendo ser graves, e, ainda eritemas e queimaduras. Por isso, os voluntários serão acompanhados diretamente, em todas as etapas do estudo ex vivo (incluindo um período de um mês após a realização de cada ensaio), pelos pesquisadores vinculados à instituição universitária."

Recomendações:

Apenas fazer correções no texto dos TCLEs do ensaio de Fotoproteção e do ensaio de Fotoirritação - no seguinte período: "...eventuais danos decorrentes da sua participação no estudo serão indenizados por os mesmos membros da equipe de pesquisa."

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Todas as solicitações foram atendidas, com ressalva, apenas, do item destacado em "Recomendações", em que há um pequeno erro de digitação ou redação, que requer correção

**USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO**

Continuação do Parecer: 2.528.318

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP entende que o projeto de pesquisa pode ser aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_935235.pdf	27/12/2017 19:08:29		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa_EC_27DEC2017_versao2.doc	27/12/2017 18:39:51	Katarzyna Barbara Wróblewska	Aceito
Outros	Declaracao_da_equipe_de_pesquisa_22DEC2017.doc	27/12/2017 18:37:31	Katarzyna Barbara Wróblewska	Aceito
Outros	CartaResposta_27DEC2017.docx	27/12/2017 18:35:25	Katarzyna Barbara Wróblewska	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_antioxidante_27DEC2017_versao2.doc	27/12/2017 18:34:14	Katarzyna Barbara Wróblewska	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_fotoprotecao_27DEC2017_versao2.doc	27/12/2017 18:33:55	Katarzyna Barbara Wróblewska	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_fotoimitacao_27DEC2017_versao2.doc	27/12/2017 18:33:28	Katarzyna Barbara Wróblewska	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_fotoprotecao_21SEP2017.doc	22/09/2017 17:25:02	Katarzyna Barbara Wróblewska	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_fotoimitacao_21SEP2017.doc	22/09/2017 17:24:51	Katarzyna Barbara Wróblewska	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_antioxidante_21SEP2017.doc	22/09/2017 17:24:38	Katarzyna Barbara Wróblewska	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_da_profBETH_FCF_signed.pdf	27/07/2017 15:34:52	Katarzyna Barbara Wróblewska	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_participacao_ProfAndreBaby_signed.pdf	27/07/2017 15:31:05	Katarzyna Barbara Wróblewska	Aceito

USP - FACULDADE DE
CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 2.528.318

Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_participacao_Kasia_signed.pdf	27/07/2017 15:30:39	Katarzyna Barbara Wróblewska	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_anuencia_usp_IPclin_Dr_aLeila_assinado.PDF	27/07/2017 15:30:15	Katarzyna Barbara Wróblewska	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_portugues_EC_19May2017_word_version_Final_II_libre.docx	27/07/2017 15:22:59	Katarzyna Barbara Wróblewska	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_Kasia_27Jul2017.pdf	27/07/2017 15:21:34	Katarzyna Barbara Wróblewska	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 08 de Março de 2018

Assinado por:

Cristina Northfleet de Albuquerque
(Coordenador)

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o ensaio de fotoproteção (FPS) *in vivo*

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

1. Informações do Participante da Pesquisa

Nome:		
Documento de Identidade (tipo):	Nº.:	Sexo: () M () F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:	Nº.:	
Complementos:	Bairro:	
Cidade:	Estado:	
CEP:	Telefones:	

2. Informações do Responsável Legal

Nome:		
Documento de Identidade (tipo):	Nº.:	Sexo: () M () F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:	Nº.:	
Complementos:	Bairro:	
Cidade:	Estado:	
CEP:	Telefones:	

3. Título do Projeto de Pesquisa

Ensaio pre-clínicos e clínicos do potencial antioxidante e fotoprotetor de extratos de bambus nativos.
--

4. Duração da Pesquisa

2 DIAS (1 dia - aproximadamente 4 horas, 2 dia - 30 minutos)
--

5. Nome do Pesquisador Responsável

Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno	
Cargo/ Função: Professor Doutor	Cargo/ Função: Professor Doutor

6. Instituição/Instituições

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
IPclin - Instituto de Pesquisa Clínica Integrada

Nós, Professor Doutor Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno (pesquisador responsável), Professor Doutor André Rolim Baby (pesquisador colaborador) e doutoranda Katarzyna Barbara Wróblewska (pesquisadora associada) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo junto com Dra. Leila David Bloch (médica dermatologista, diretora) do Instituto de Pesquisa Clínica Integrada (IPclin), estamos convidando você a participar de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar o Fator de Proteção Solar (FPS) de três formulações fotoprotetoras: duas desenvolvidas de um produto de bambu com filtros solares, e uma incluindo somente filtros solares como controle.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Pedimos que leia detalhadamente este Termo de Consentimento e, apenas se concordar com os itens mencionados, assine-o em duas vias (uma delas será entregue a você). Todas as dúvidas surgidas durante ou após o estudo serão prontamente esclarecidas.

O Brasil possui a maior diversidade de bambu no mundo. Ele tem uso tradicional na produção de casas, barcos, ferramentas para a agricultura, instrumentos musicais, armas e outros, porém, as demais aplicações potenciais especificamente seu uso medicinal, ainda permanecem descobertos. Os bambus, possuindo vários compostos naturais, constituem uma fonte promissora de agentes antioxidantes, absorventes da irradiação solar e, consequentemente, de foto-protetores. Devido à falta de informações sobre as propriedades das espécies de bambus nativos do Brasil, o objetivo principal deste projeto é avaliar o potencial antioxidante, e a eficácia de proteção contra radiação solar das formulações desenvolvidas com produto de bambu.

A avaliação do fator de proteção solar será feita no IPclin - Instituto de Pesquisa Clínica Integrada, rua: Leonardo Cavalcante, 314 - Centro, Jundiaí - SP, 13201-013. Você deverá comparecer durante dois dias semanas ao Instituto, sendo que a permanência no primeiro dia será de 4 horas e no segundo dia de aproximadamente meia hora. No primeiro dia, será realizada uma avaliação clínica da sua pele por um médico dermatologista para determinar o seu fototipo. Se os critérios de inclusão sejam cumpridos, você receberá posteriormente aplicação das três formulações fotoprotetoras (duas em teste e uma de controle) em suas costas entre as linhas da escápula e cintura, e você será exposto a uma fonte emissora de luz que reproduz a radiação solar por tempo determinado pelo médico dermatologista. No dia seguinte você deverá retornar ao Instituto para que seja realizada a leitura das áreas expostas à irradiação. No primeiro dia do ensaio você receberá um lanche no horário de almoço. Os gastos de transporte durante o ensaio serão cobertos pelos responsáveis pela pesquisa.

Solicitamos que durante o período de estudo (incluindo três dias antes do início do ensaio e três dias após a sua finalização) você não altere seus hábitos de higiene, dieta, medicamentos, cosméticos e exercícios; não se exponha excessivamente ao sol; e não aplique qualquer produto no local de realização do teste.

Riscos: A aplicação tópica de produtos ativos em humanos e exposição à irradiação UV podem envolver riscos, ainda que raros, incluindo dermatites de contato e/ou alérgica, com intensidades variáveis, podendo ser graves, e, ainda eritemas e queimaduras. Por isso, os voluntários serão acompanhados diretamente, em todas as etapas do estudo *in vivo* (incluindo um período de um mês após a realização de cada ensaio), pelo médico dermatologista e pelos pesquisadores vinculados à instituição universitária.

Embora não existam benefícios diretos aos participantes do estudo envolvido, o mesmo poderá trazer benefícios futuros à população, uma vez que contribuirá para ampliar o conhecimento sobre a segurança e eficácia de cosméticos de produtos naturais.

Você terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas. Você pode recusar a participar no estudo ou poderá retirar seu consentimento e participação a

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

qualquer momento, sem que isto traga qualquer prejuízo. Todas as informações obtidas sobre os participantes do estudo são confidenciais. O sigilo e a privacidade do participante serão protegidas durante todas as fases da pesquisa.

Garantimos que os cuidados e acompanhamento necessários serão fornecidos pelos pesquisadores durante todas as etapas do estudo (inclusive os acompanhamentos posteriores ao encerramento e/ou interrupção da pesquisa). Caso você necessite de assistência médica ou esclarecimento, favor entrar em contato com Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno / fone: (11) 3091-3875 ou Katarzyna Barbara Wróblewska / fone: (11) 946100572. Os pesquisadores estarão disponíveis 24 horas por dia para atendê-lo, inclusive em feriados e finais de semana.

No caso de coceira intensa ou outros sinais fortes de irritação, comunique imediatamente, comparecendo ao local de aplicação do teste ou pelo telefone da Dr^a. Leila Bloch (11) 97030-2777. Em caso de reações adversas que necessitem de acompanhamento ambulatorial e/ou internação, os responsáveis pela pesquisa, incluindo médica dermatologista, lhe acompanharão até o Hospital de Caridade São Vicente de Paulo, endereço: Rua São Vicente de Paulo, 223, Centro - Jundiaí - SP/CEP:13201-825, telefone: (11) 4583-8155, que apresenta infraestrutura adequada para qualquer tratamento que se faça necessário.

Garantimos que todas as despesas (transporte/alimentação) decorrentes do tratamento serão arcadas, de forma integral, pelos responsáveis por esta pesquisa. Eventuais danos decorrentes da sua participação no estudo serão indenizados por os mesmos membros da equipe de pesquisa.

Consentimento Pós-Esclarecido

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante de Pesquisa
ou do Responsável Legal

Assinatura do Pesquisador Responsável

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, favor entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Butantã, São Paulo, CEP 05508-000, Telefones 3091-3622 e 3091-3677, e-mail: cepfcf@usp.br.

ANEXO C – Termo de Consentimento Livre e esclarecido para o ensaio de fotoirritação *in vivo*

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

1. Informações do Participante da Pesquisa

Nome:		
Documento de Identidade (tipo):	Nº:	Sexo: ☐ M ☐ F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:	Nº:	
Complementos:	Bairro:	
Cidade:	Estado:	
CEP:	Telefones:	

2. Informações do Responsável Legal

Nome:		
Documento de Identidade (tipo):	Nº:	Sexo: ☐ M ☐ F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:	Nº:	
Complementos:	Bairro:	
Cidade:	Estado:	
CEP:	Telefones:	

3. Título do Projeto de Pesquisa

Ensaio pre-clínicos e clínicos do potencial antioxidante e fotoprotetor de extratos de bambus nativos.
--

4. Duração da Pesquisa

5 SEMANAS (30 minutos cada visita, 3-2 vezes por semana com 2 semanas de descanso)
--

5. Nome do Pesquisador Responsável

Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno
Cargo/ Função: Professor Doutor Cargo/ Função: Professor Doutor

6. Instituição/Instituições

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo
IPclin - Instituto de Pesquisa Clínica Integrada

Nós, Professor Doutor Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno (pesquisador responsável), Professor Doutor André Rolim Baby (pesquisador colaborador) e doutoranda Katarzyna Barbara Wróblewska (pesquisadora associada) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo junto com Dra. Leila David Bloch (médica dermatologista, diretora) do Instituto de Pesquisa Clínica Integrada (IPClin), estamos convidando você a participar de uma pesquisa que tem como objetivo avaliar a fotoirritação e fotossensibilização cutânea de três formulações fotoprotetoras: duas desenvolvidas com

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

um produto natural de bambu e filtros solares, e uma incluindo somente filtros solares como controle.

Pedimos que leia detalhadamente este Termo de Consentimento e, apenas se concordar com os itens mencionados, assine-o em duas vias (uma delas será entregue a você). Todas as dúvidas surgidas durante ou após o estudo serão prontamente esclarecidas.

O Brasil possui a maior diversidade de bambu no mundo. Ele tem uso tradicional na produção de casas, barcos, ferramentas para a agricultura, instrumentos musicais, armas e outros, porém, as demais aplicações potenciais especificamente seu uso medicinal, ainda permanecem descobertos. Os bambus, possuindo vários compostos naturais, constituem uma fonte promissora de agentes antioxidantes, absorventes da irradiação solar e, consequentemente, de foto-protetores. Devido à falta de informações sobre as propriedades das espécies de bambus nativos do Brasil, o objetivo principal deste projeto é avaliar o potencial antioxidante, e a eficácia de proteção contra radiação solar das formulações desenvolvidas com produto de bambu.

A avaliação da fotoirritação e fotossensibilização cutânea das formulações será feita no IPclin - Instituto de Pesquisa Clínica Integrada, rua: Leonardo Cavalcante, 314 - Centro, Jundiaí - SP, 13201-013. O participante deverá comparecer durante cinco semanas, em dias pré-estabelecidos (segundas, quartas ou sextas-feira) ao Instituto, aproximadamente 30 minutos cada visita. Nas primeiras duas semanas do estudo, o participante comparecerá ao local nas segundas, quartas e sextas – três vezes por semana (fase de indução), após serão duas semanas de descanso sem visitas no instituto, e na última semana, o participante deverá comparecer ao local na segunda e quarta-feira – duas vezes (fase de desafio).

Será aplicado em você um único adesivo com as três (3) amostras (duas em teste e uma de controle) a serem analisadas, sendo trocado a cada visita. No primeiro dia, será realizada uma avaliação clínica da sua pele por um médico dermatologista, com posterior aplicação de um adesivo, contendo duas formulações fotoprotetoras em teste e uma de controle, em suas costas (sítios com 1cm de diâmetro, separados entre si a uma distância de 1cm). Após 24 horas de contato das três formulações com a pele, você retornará ao Instituto para a remoção do adesivo e exposição da área de aplicação a uma fonte emissora de luz que reproduz a radiação solar por cerca de 7 minutos. A energia desta fonte, corresponderá a uma exposição por este tempo ao sol em um dia ensolarado. Por se tratar de um tempo pequeno, o desconforto será mínimo, semelhante ao contato com uma superfície quente durante poucos minutos. A leitura das áreas de suas costas expostas as três formulações será realizada 24 horas após a etapa de exposição à fonte de luz, com avaliação de possíveis reações de fotoirritação primária.

Durante as duas semanas da primeira fase, o etapa de aplicação e exposição à fonte de luz (descrita acima) será repetida em dias pré-estabelecidos. Reaplicação das três formulações fotoprotetoras será sempre no mesmo local de suas costas, por meio da troca do adesivo. A sua pele será avaliada após cada etapa de exposição à fonte de luz, para avaliação de possíveis reações de fotoirritação acumulada.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Após o período de aplicação de duas semanas, haverá um período de repouso de duas semanas (*fase de descanso*), onde nenhum adesivo será aplicado ou ficará em suas costas. Neste período, você não precisará comparecer ao Instituto em nenhum dia.

Após o período de repouso, última semana (*fase de desafio*), você retornará ao Instituto para aplicação de um novo adesivo contendo as duas formulações fotoprotetoras em teste e uma de controle, em local virgem de suas costas (não utilizado anteriormente para aplicação de adesivos). Finalmente, após 24 horas de contato do produto com a sua pele, você retornará ao Instituto para a remoção do adesivo e exposição da área de aplicação a uma fonte emissora de luz que reproduz a radiação solar por cerca de 7 minutos. A leitura das áreas de suas costas expostas as três formulações será realizada 24 horas após a última etapa de exposição à fonte de luz, com avaliação de possíveis reações de fotossensibilização.

Os gastos de transporte durante todo período de ensaio com visitas no instituto: na primeira, segunda e sexta semana serão cobertos pelos responsáveis pela pesquisa. Por se tratar de um período pequeno de realização de testes, não será necessário realizar refeições no local de realização da pesquisa.

Solicitamos que durante o período de estudo (incluindo três dias antes do início do ensaio e três dias após a sua finalização) você não altere seus hábitos de higiene, dieta, medicamentos, cosméticos e exercícios; não se exponha excessivamente ao sol; e não aplique qualquer produto no local de realização do teste.

Riscos: A aplicação tópica de produtos ativos em humanos e exposição à irradiação UV podem envolver riscos, ainda que raros, incluindo dermatites de contato e/ou alérgica, com intensidades variáveis, podendo ser graves, e, ainda eritemas e queimaduras. Por isso, os voluntários serão acompanhados diretamente, em todas as etapas do estudo *in vivo* (incluindo um período de um mês após a realização de cada ensaio), pelo médico dermatologista e pelos pesquisadores vinculados à instituição universitária.

Embora não existam benefícios diretos aos participantes do estudo envolvido, o mesmo poderá trazer benefícios futuros à população, uma vez que contribuirá para ampliar o conhecimento sobre a segurança e eficácia de cosméticos de produtos naturais.

Você terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para esclarecer eventuais dúvidas. Você pode recusar a participar no estudo ou poderá retirar seu consentimento e participação a qualquer momento, sem que isto traga qualquer prejuízo.

Todas as informações obtidas sobre os participantes do estudo são confidenciais. O sigilo e a privacidade do participante serão protegidas durante todas as fases da pesquisa.

Garantimos que os cuidados e acompanhamento necessários serão fornecidos pelos pesquisadores durante todas as etapas do estudo (inclusive os acompanhamentos posteriores ao encerramento e/ou interrupção da pesquisa). Caso você necessite de assistência médica ou esclarecimento, favor entrar em contato com Dr. Paulo Roberto

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE

Hrihorowitsch Moreno / fone: (11) 3091-3875 ou Katarzyna Barbara Wróblewska / fone: (11) 946100572 . Os pesquisadores estarão disponíveis 24 horas por dia para atendê-lo, inclusive em feriados e finais de semana.

No caso de coceira intensa ou outros sinais fortes de irritação, comunique imediatamente, comparecendo ao local de aplicação do teste ou pelo telefone da Dr^a. Leila Bloch (11) 97030-2777. Em caso de reações adversas que necessitem de acompanhamento ambulatorial e/ou internação, os responsáveis pela pesquisa, incluindo médico dermatologista, lhe acompanharão até o Hospital de Caridade São Vicente de Paulo, endereço: Rua São Vicente de Paulo, 223, Centro - Jundiaí - SP/CEP:13201-825, telefone: (11) 4583-8155, que apresenta infraestrutura adequada para qualquer tratamento que se faça necessário.

Garantimos que todas as despesas (transporte/alimentação) decorrentes do tratamento serão arcadas, de forma integral, pelos responsáveis por esta pesquisa. Eventuais danos decorrentes da sua participação no estudo serão indenizados por os mesmos membros da equipe de pesquisa.

Consentimento Pós-Esclarecido

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Participante de Pesquisa
ou do Responsável Legal

Assinatura do Pesquisador Responsável

Para qualquer questão, dúvida, esclarecimento ou reclamação sobre aspectos éticos relativos a este protocolo de pesquisa, favor entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Butantã, São Paulo, CEP 05508-000, Telefones 3091-3822 e 3091-3877, e-mail: cepfcf@usp.br.

ANEXO C – Currículo Lattes

Katarzyna Barbara Wróblewska

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8244442218053436>

Última atualização do currículo em 09/02/2019

Resumo informado pelo autor

Possui mestrado em Farmácia - Medical University of Gdansk (2013). Dissertação feita na Universidade do Porto - Programa Erasmus. Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em Farmacognosia.

(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Katarzyna Barbara Wróblewska

Dados pessoais

Filiação Jacek Kazimierz Wróblewski e Małgorzata Wróblewska
 Nascimento 24/03/1988 - Gdansk/ - Polónia
 Carteira de Identidade RNEG142195C P. F. - SP - 05/05/2015
 CPF 237.804.508-52
 Passaporte EG8884150

Formação acadêmica/titulação

- 2015** Doutorado em Fármacos e Medicamentos.
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: Triagem de Espécies de Bambu Nativas do Sudeste Brasileiro como Filtros Solares Naturais
 Orientador: Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno
- 2007 - 2013** Mestrado em Farmácia.
 Medical University of Gdansk, GUMED, Gdańsk, Polónia
 Título: Comparative study of the antioxidant and anticholinesterase potential of four medicinal plants: *Cochlospermum angolensis* Welw., *Jacaranda caroba* (Vell.) DC., *Gelsemium sempervirens* L. and *Grindelia robusta* Nutt., Ano de obtenção: 2013
 Orientador: Jadwiga Renata Ochodka
- 2007 - 2013** Graduação em Pharmacy.
 Medical University of Gdansk, GUMED, Gdańsk, Polónia

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. WRÓBLEWSKA, KATARZYNA BARBARA; BABY, ANDRÉ ROLIM; GROMBONE GUARATINI, MARIA TEREZA; MORENO, PAULO ROBERTO HRIHOROWITSCH. In vitro antioxidant and photoprotective activity of five native Brazilian bamboo species. INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS. , v.130, p.208 - 215, 2019.

Capítulos de livros publicados

1. B. Wróblewska, Katarzyna; C.S. de Oliveira, Danielle; Tereza Grombone-Guaratini, Maria; Roberto H. Moreno, Paulo. Medicinal Properties of Bamboos In: Pharmacognosy - Medicinal Plants [Working Title]. 2 ed. : IntechOpen, 2018, p. 1-.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. WRÓBLEWSKA, K.; GROSSO, C.; VALENTAO, P.; ANDRADE, P. B. Comparative study of the antioxidant and anticholinesterase potential of four medicinal plants In: 13th International Congress of the Society for Ethnopharmacology, 2012, Graz. 13th International Congress of the Society for Ethnopharmacology, Book of abstracts. Graz: Franz Voves & Siegfried Nagl, 2012. v.1. p.174 -
2. GROSSO, C.; AZEVEDO, C.; VALENTAO, P.; ANDRADE, P. B.; WRÓBLEWSKA, K. In the pursuit of novel anti-depressant drugs In: 3º Workshop annual bioplant, 2012, Aveiro. 3º MAP-Bioplant Workshop: Becoming a Plant, Book of abstracts. Aveiro: Santos C. & Calado A, 2012. v.1. p.18 -

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) Fapronatura 2018, 2018. (Congresso) Antioxidant and in vitro Photoprotective Activity of the Crude Extract and Fractions from Merostachys pluriflora Munro ex E.G. Camus Culms.
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) XXV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2018. (Simpósio) Antioxidant and in vitro Photoprotective Activity of the Crude Extract and Fractions from Merostachys pluriflora Munro ex E.G. Camus Culms.
3. Apresentação de Poster / Painel no(a) XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil – 2016, 2016. (Simpósio) Avaliação da Atividade Antioxidante e do Teor de Compostos Fenólicos e Flavonoides em Bambus Nativos do Sudeste Brasileiro.

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 09/02/2019 às 13:12:34.

ANEXO D – Ficha do Aluno

Ficha do aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9138 - 9230963/1 - Katarzyna Barbara Wróblewska

Email: kbwrob@iq.usp.br
Data de Nascimento: 24/03/1988
Cédula de Identidade: RNE - G142195-C - SP
Local de Nascimento: Polônia
Nacionalidade: Polonesa
Graduação: Magister Farmacji - Uniwersytet Gdanski - Polônia - 2013

Curso: Doutorado Direto
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Insumos Farmacêuticos
Data de Matrícula: 12/02/2015
Início da Contagem de Prazo: 12/02/2015
Data Limite para o Depósito: 12/02/2019
Orientador: Prof(a). Dr(a). Paulo Roberto Hnhorowitsch Moreno - 12/02/2015 até o presente.
Email: pmoreno@iq.usp.br
Co-orientador: Prof(a). Dr(a). André Rolim Baby - 09/08/2017 até o presente. Email: andrerb@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 12/02/2015
Português, Aprovado em 02/08/2016
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 06/04/2017
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 12/02/2015

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2019
Impresso em: 05/02/2019 23:06:32

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9138 - 9230963/1 - Katarzyna Barbara Wróblewska

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5704-6/3	Análise Espectrométrica de Fármacos	09/03/2015	22/06/2015	150	10	90	A	N	Concluída
FBF5777-3/4	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	12/03/2015	24/06/2015	45	3	87	A	N	Concluída
FBF5730-7/2	Esterilidade e Potência Microbiológica de Medicamentos	17/03/2015	27/04/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBF5805-2/1	Delimitação de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	05/08/2015	13/10/2015	90	6	87	A	N	Concluída
BIB5754-4/1	Produtos Naturais: Biossíntese, Distribuição e Identificação em Espécies Vegetais (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	10/08/2015	16/11/2015	120	8	85	A	N	Concluída
FBF5779-2/3	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	04/09/2015	05/11/2015	90	6	100	A	N	Concluída
QFL5925-6/1	Prática de Ensino de Química (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	14/03/2016	26/06/2016	45	3	100	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
Para exame de qualificação		Para depósito de tese
Disciplinas:	0	25
Estágios:		40
Total:	0	25

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2019

Impresso em: 05/02/2019 23:06:32

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9138 - 9230963/1 - Katarzyna Barbara Wróblewska

Comissão julgadora da tese de doutorado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
2807984	Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno	IQ - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2019

Impresso em: 05/02/2019 23:06:32

ANEXO E – Publicações

Industrial Crops & Products 130 (2019) 208–215

Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops & Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop

In vitro antioxidant and photoprotective activity of five native Brazilian bamboo species

Katarzyna Barbara Wróblewska^a, André Rolim Baby^b, Maria Tereza Grombone Guaratini^c, Paulo Roberto Hrlhorowitsch Moreno^{a,*}

^a Institute of Chemistry, University of São Paulo, Av. Prof. Líneu Prestes 748, 05508-000, São Paulo, SP, Brazil

^b Faculty of Pharmacy, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^c Institute of Botany, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Aulonemia

Chusquea

Merostachys

Flavonoids

Sun protection factor

Photostability

ABSTRACT

Nature provides an abundant source of antioxidant substances as well as potential compounds for sunscreen products. Asian bamboos, well known and widely cultivated, are already used in cosmetic and pharmaceutical industries thanks to their rich phenolic contents which is related to their antioxidant activity. This study aimed to evaluate the photoprotective and antioxidant activities of five native Brazilian bamboo species. Firstly, hydroalcoholic extracts from culms and leaves of *Aulonemia aristulata* (Döll) McClure, *Chusquea bambusoides* Rupr. ex Döll, *Chusquea capituliflora* Trin. var. *pubescens* McClure, *Chusquea meyeriana* Rupr., *Merostachys pluriflora* Munro ex E.G. Camus were evaluated for their DPPH scavenging activity and total contents of flavonoids and phenolic compounds. Secondly, cosmetic formulations containing the extracts in a combination with three different synthetic ultraviolet (UV) filters (avobenzone, octyldimethyl PABA, and octyl methoxycinnamate) were developed to evaluate their Sun Protection Factor (SPF), critical wavelength (λ_c) and photostability by diffuse transmittance analysis to determine the interactions involving the extracts and the anti-UV active ingredients. The bamboos' antioxidant potential, expressed in IC_{50} , varied between 137.55 and 260 $\mu\text{g/mL}$. Phenolic contents ranged from 43.64 to 87.81 mg of gallic acid equivalents (GAE) per g of plant material. The extract richest in flavonoids was that from *C. bambusoides* leaves with 6.44 mg of equivalents of quercetin (EQ) per g of dried leaves. The SPF of the formulations with bamboo extracts varied between 34 and 86 before the irradiation, and the obtained UV absorption profile allowed to classify them as broad spectrum. After irradiation, the SPF values diminished to 14–44, whereas, the area of the absorbed wavelengths remained equal. This study showed that the addition of bamboo extracts to commercial UV filters increased significantly their SPF and photostability.

Chapter

Medicinal Properties of Bamboos

Katarzyna B. Wróblewska, Danielle C.S. de Oliveira,
 Maria Tereza Grombone-Guaratini and
 Paulo Roberto H. Moreno

Abstract

Bamboos are described as one of the most important renewable, easily obtained, and valuable of all forest resources. These plants belong to the grasses' family (*Poaceae*), which covers about a quarter of the world's plant population, within the subfamily *Bambusoideae*. The estimated diversity of bamboos in the world is approximately 1400 species, distributed in 116 genera. Bamboo species have been used in Southeast Asia, as a base material to produce paper, furniture, boats, bicycles, textiles, musical instruments, and food, and their leaves have also been used as a wrapping material to prevent food deterioration since ancient times. These species accumulate biologically active components such as polyphenols and other secondary plant metabolites that might explain the use of bamboo leaves in Asian traditional medicine for the treatment of hypertension, arteriosclerosis, cardiovascular disease, and certain forms of cancer. Besides the usual secondary metabolites, bamboo extracts may contain biologically active peptides and polysaccharides that still need to be further studied for their activity and their synergistic with other metabolites. Most of the studies found in the literature are from Asian bamboo species, and the potential of the Southern American species is yet to be explored.

Keywords: bamboo, antioxidant, antimicrobial, polyphenols, triterpenes, traditional medicine

1. Introduction

Bamboos are described as one of the most important renewable, easily obtained, and valuable of all forest resources. Bamboo species have been known and used by human kind since the beginning of civilization; its use as building materials can be traced back to the pre-ceramic period 9500 years ago, while relics from bamboo mats and baskets were dated at 3300-2800 BC [1]. In Asian countries, their leaves are used as a food wrapping material to prevent food deterioration since ancient times, besides using the culms as a construction material. In this region, bamboo leaves are described in the traditional medicine for treating hypertension, arteriosclerosis, cardiovascular disease, and certain forms of cancer. These therapeutic properties are most likely mediated by their antioxidant capacity.

These plants form a large subfamily of the grasses (*Poaceae*: *Bambusoideae*), comprising about 1662 species distributed in 121 genera. Bamboos present a large range of functional forms found over numerous biogeographic regions, including dwarf herbaceous species in temperate climates and giant tropical woody species that can reach up to 20 m height [2]. These species can adapt and propagate in

Avaliação da Atividade Antioxidante e do Teor de Compostos Fenólicos e Flavonoides em Bambus Nativos do Sudeste Brasileiro

Katarzyna B. Wróblewska¹, Maria T. Grombone-Guaratini², Paulo R. H. Moreno¹

1. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 748, 05508-000, São Paulo, SP, Brasil; 2. Instituto de Botânica/SMA, P.O. Box 3005, 01061-970, São Paulo, SP, Brasil; correspondência: kbwrob@iq.usp.br, prmoreno@iq.usp.br

1. Introdução

O Brasil é o país com maior diversidade de espécies de bambu do Novo Mundo, contudo seu uso tem se restringido a materiais de construção. Diferentemente dos bambus brasileiros, as espécies asiáticas possuem diversas aplicações na indústria cosmética e farmacêutica devido a sua atividade antioxidante em consequência do seu conteúdo de fenólicos e flavonoides. Neste projeto, extratos etanólicos de colmos e folhas de cinco espécies de bambu: *Chusquea bambusaoides* Rupr. ex DC., *Chusquea capituliflora* Trin. var. *pubescens* McClure, *Aulonemia arundinacea* (DC.) McClure, *Merostachys pluriiflora* Munro ex T.G. Carter e *Chusquea meyeriana* Rupr. foram avaliados quanto a sua atividade antioxidante bem como o teor de compostos fenólicos e os flavonoides totais.

2. Parte experimental

2.1. Material vegetal

Chusquea bambusaoides e *Chusquea capituliflora* foram coletadas no Parque Natural Municipal das Nascentes de Pirapora, em Santo André, e *Aulonemia arundinacea*, *Merostachys pluriiflora*, *Chusquea meyeriana* no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, em São Paulo. Todas as espécies foram identificadas pelo Dr. Tarciso Filgueiras, Instituto de Botânica de São Paulo. Os espécimes herbarizados foram depositados no Herbario de mesma instituição.

2.2. Extração

A extração dos colmos e das folhas de bambu foi feita com etanol 60% em aparelho de Soxhlet até exsudar.

2.3. Atividade antioxidante

Para estimar a atividade antioxidante foi utilizado o teste de sequestro de radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)¹. A absorbância das amostras foi medida em 412nm, em leitor de microplacas. Os resultados foram calculados por regressão linear como valores de concentração efetiva mediana (CE₅₀), concentração necessária para eliminar 50% dos radicais livres.

2.4. Compostos fenólicos

O teor de fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu², sendo esse expresso em Equivalentes de Ácido Gálico (EAG). A absorbância foi lida em 760nm.

2.5. Flavonoides

Os flavonoides, expressos em Equivalentes de Quercetina (EQ), foram quantificados através do método espectrofotométrico com cloreto de alumínio³, com leitura da absorbância em 425nm.

Figura 1. *Chusquea bambusaoides*⁴

Figura 2. *Chusquea capituliflora*⁴

Figura 3. *Merostachys pluriiflora*⁴

Figura 4. e Figura 5. Apresentam as curvas de inibição do radical livre DPPH (%) dependendo da concentração das amostras (µg/ml).

Figura 5.

Figura 6. *Chusquea meyeriana*⁴

4. Discussão e Conclusões

A capacidade sequestradora de DPPH e o teor dos compostos fenólicos nessas espécies analisadas foi mais alto do que reportado para algumas espécies de bambu asiáticas⁴, contudo a quantidade dos flavonoides variou muito entre as espécies dos bambus estudados. Os resultados confirmam o potencial antioxidante das espécies de bambu nativas do Brasil e as indicam como espécies candidatas a futuros ensaios de avaliação para novas aplicações cosméticas e farmacêuticas.

Figura 7. *Aulonemia arundinacea*⁴

Referências

1. Brand-Williams, W., Cuatrecasas, M., Bover, C. LWT-Food Sci Technol 1995, 28(1), 25-30.
2. Ciocalteu, F.A., Gilman, E.M. Nat Prod 1955, 2, 615-617.
3. Hishida, K., Shimizu, A. J. Agr. Food Chem. 1994, 42(2), 98-105.
4. Park, E.J., Bae, D.Y. LWT-Food Sci Technol, 2008, 41, 655-658.
5. Moreno, P., Paul, R. V., Kato, E. J. Cell Tissue Res. 2010, 10 (2), 2413-2418.
6. Silveira, T. R. 2015. Bambus nativos (Poaceae-Bambusoideae) no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, Brasil. Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica, 20, 70, 130, 135, 136.

Antioxidant and *in vitro* Photoprotective Activity of the Crude Extract and Fractions from *Merostachys pluriflora* Munro ex E.G. Camus Culms.

Wróblewska K.B.^{1,2}, Baby A.R.¹, Grombone-Guaratini M.T.³, Moreno P.R.H.²

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences Postgraduate program, University of São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 580, Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil;

²Institute of Chemistry, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 748, Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brazil;

³Institute of Botany / Instituto de Botânica/SMA, P.O. Box 3005, 01061-970, São Paulo, SP, Brazil;

Correspondence: kbwroblewska@iq.usp.br, pmoreno@iq.usp.br

Introduction

Brazil is the habitat of approximately 50% of all World bamboo genera^{1,2}, however, little is known about their composition and biological activities. On the contrary, Asian bamboo species have gained popularity in the pharmaceutical and cosmetic industries due to their various physiological effects and safety^{3,4}. This research aimed to evaluate the antioxidant potential, phenolic and flavonoid contents as well as the photoprotective properties of the extract and fractions from culms of *Merostachys pluriflora* Munro ex E.G. Camus, a Native Brazilian bamboo. For this purpose, its crude ethanolic extract, chloroform and ethyl acetate fractions were analyzed for their scavenging efficacy against DPPH radical⁵, total phenols and flavonoids contents by the colorimetric methods with Folin-Ciocalteu⁶ and AlCl₃⁷ reagents. The emulsions with commercial solar filters and the extract (5 and 2.5% w/w) or fractions (0.1% w/w) were prepared, and their Sun Protection Factor (SPF) and critical wavelength (λ_c) before and after irradiation with artificial sun light were measured by diffuse transmittance with an Integrating sphere⁸. The results obtained for the formulations with the bamboo samples and the control were compared for each group by using One-way ANOVA with Dunnett test. The statistic assay was developed in Minitab[®] (v. 17) program.

Sample	DPPH	Folin-Ciocalteu	AlCl ₃
	115 nm	760 nm	425 nm
Sample	IC ₅₀ ^a (μg/mL)	GAE ^{***} (μg/eq)	QE ^{***} (μg/eq)
Crude extract	174.17 ± 12.88 ^b	54.80 ± 2.30 ^d	6.60 ± 0.10 ^d
Chloroform fraction	88.07 ± 0.62 ^b	145.00 ± 2.17 ^b	9.10 ± 0.49 ^c
Ethyl acetate fraction	64.75 ± 1.14 ^b	130.54 ± 3.19 ^c	7.35 ± 0.17 ^c

^aIC₅₀: half maximum inhibitory concentration; ^bGAE: Gallic Acid Equivalents; ^cQE: Quercetin Equivalents. Different letters show the differences between the results according to Anova One-Way and Tukey test of comparison.

Conclusions

- M. pluriflora* crude extract demonstrated antioxidant activity and showed the presence of phenolic compounds and flavonoids, which increased by fractionating it with chloroform and ethyl acetate.
- M. pluriflora* crude extract/fractions were able to increase the SPF of the sunscreen formulation containing synthetic solar filters.
- Although the formulation with 0.1% of the ethyl acetate fraction had the highest SPF, it is possible that the mixture of different compounds in the crude extract positively influenced on photostability.

Formulation	SPF	λ _c
	Before / after irradiation	Before / after irradiation
Crude extract 5% + solar filters ^a	46.5 ± 6.31	361 ± 0.63
Crude extract 2.5% + solar filters ^a	40 ± 7.35	380 ± 0.90 ^{ab}
Chloroform fraction 0.1% + solar filters ^a	29 ± 5.09	381 ± 0.5
Ethyl acetate fraction 0.1% + solar filters ^a	48 ± 9.5	381 ± 0.69
Control (only solar filters ^a)	12 ± 1.34 ^{abc}	379 ± 2.14 ^{abc}

^aButyl Methoxydibenzoylmethane (2%), Ethylhexyl methoxycinnamate (7.3%), 2-ethylhexyl dimethyl p-aminobenzoate (3%), Remaining ingredients of the formulation: Serf (0.1%), Mineral oil (2%), Arbutin (2%), Propylene Glycol (2%), Phenoxy (0.73%), water q.s.

^bThe results marked with "a" are different than the rest of values according to Anova One-Way and Dunnett test of comparison.

References

- Yakovlev, D.A., Shtak, K.V., Medvedev, E.P., Shtak, D.G., Shtak, A.P., Shtak, S.P., 2016, 43 (2), 397-406.
- Yakovlev, D.A., Shtak, K.V., Medvedev, E.P., Shtak, D.G., Shtak, A.P., Shtak, S.P., 2017, 44 (2), 397-406.
- Yakovlev, D.A., Shtak, K.V., Medvedev, E.P., Shtak, D.G., Shtak, A.P., Shtak, S.P., 2017, 44 (2), 397-406.
- Yakovlev, D.A., Shtak, K.V., Medvedev, E.P., Shtak, D.G., Shtak, A.P., Shtak, S.P., 2017, 44 (2), 397-406.
- Yakovlev, D.A., Shtak, K.V., Medvedev, E.P., Shtak, D.G., Shtak, A.P., Shtak, S.P., 2017, 44 (2), 397-406.
- Yakovlev, D.A., Shtak, K.V., Medvedev, E.P., Shtak, D.G., Shtak, A.P., Shtak, S.P., 2017, 44 (2), 397-406.
- Yakovlev, D.A., Shtak, K.V., Medvedev, E.P., Shtak, D.G., Shtak, A.P., Shtak, S.P., 2017, 44 (2), 397-406.
- Yakovlev, D.A., Shtak, K.V., Medvedev, E.P., Shtak, D.G., Shtak, A.P., Shtak, S.P., 2017, 44 (2), 397-406.