

Steps to analyze the chemical composition of *Guadua angustifolia* var. bicolor leaves.

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FOLHAS DE *GUADUA ANGUSTIFOLIA* VAR. BICOLOR LODOÑO (BAMBUSOIDEAE:POACEAE) POR MEIO DE CLAE-EM COM AUXÍLIO DO GNPS

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

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

joakazlauckas@usp.br

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

prmoreno@iq.usp.br

Resumo: Os produtos naturais são de extrema importância para a saúde humana, uma vez que essas moléculas podem ser aplicadas como base para o desenvolvimento de novos fármacos, além de auxiliar no entendimento das vias biossintéticas dos seres vivos. *Guadua angustifolia* var. bicolor Lodoño é uma variedade da espécie *G. angustifolia* Kunth, nativa da Colômbia e introduzida no Brasil, sendo que ainda não foram realizados estudos de sua composição química. Desse modo, foi preparado um extrato de folhas utilizando o aparelho de Soxhlet. Esse extrato foi posteriormente submetido a um processo de fracionamento sólido-líquido em quatro frações com diferentes polaridades (hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol). Após esse processo, as frações de diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol passaram por uma cromatografia em coluna para uma melhor separação das substâncias presentes nelas. Foi conduzido um estudo para relacionar essas atividades com a composição química das frações, utilizando o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM). Ao todo, foram possíveis anotar 9 compostos fenólicos, 12 flavonoides, e 4 ácidos graxos e seus derivados pelo método de CLAE-EM com auxílio do GNPS, dentre eles ácido *p*-cumárico, ácido azelaico, ácido ferúlico, ácido siríngico, apigenina, nevadensina, ácido cumaroilquínico e isovitexina. Este estudo proporcionou uma análise química inicial da espécie *G. angustifolia* var. bicolor. Além de fornecer subsídios para comparação da composição química com outras espécies dentro do gênero *Guadua* para sua diferenciação. Adicionalmente, estes resultados podem orientar futuras investigações na busca por novas moléculas com potencial farmacológico.

Palavras-chave: CLAE-EM, GNPS, *Guadua angustifolia*, ácido *p*-coumárico, ácido azelaico, ácido ferúlico, ácido siríngico, apigenina, isovitexina

STUDY OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF *GUADUA ANGUSTIFOLIA* VAR. BICOLOR LODOÑO (BAMBUSOIDEAE:POACEAE) BY USING HPLC-EM WITH THE AID OF GNPS

Abstract: Natural products are of utmost importance for human health, as these molecules can serve as a basis for the development of new pharmaceuticals and also assist in the understanding of the biosynthetic pathways of living organisms. *Guadua angustifolia* var. bicolor Lodoño is a variety of the species *G. angustifolia* Kunth, native to Colombia and introduced in Brazil, with no studies yet conducted on its chemical composition. Thus, an extract of the leaves was prepared using a Soxhlet apparatus. This extract was subsequently subjected to a solid-liquid fractionation process into four fractions with different polarities (hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and *n*-butanol). After this procedure, the dichloromethane, ethyl acetate, and *n*-butanol fractions were subjected to column chromatography to enhance the separation of the compounds within them. A study was conducted to relate these activities to the chemical composition of the fractions using the Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry (LC-MS) method. In total, it was possible to annotate 9 phenolic compounds, 12 flavonoids, and 4 species of fatty acids and their derivatives by the LC-MS method with the assistance of GNPS, including *p*-coumaric acid, azelaic acid, ferulic acid, syringic acid, apigenin, and isovitexin. This study provided an initial chemical analysis of the species *G. angustifolia* var. bicolor, offering the basis for comparing the chemical composition with other species within the *Guadua* genus for differentiation. Additionally, these results can guide future investigations in the search for new molecules with pharmacological potential.

Keywords: LC-MS, GNPS, *Guadua angustifolia*, *p*-coumaric acid, azelaic acid, ferulic acid, syringic acid, apigenin, and isovitexin

Introdução

Produtos naturais e bambus

O termo “produtos naturais” é utilizado para se referir às substâncias produzidas pelo metabolismo dos seres vivos (plantas, fungos, bactérias, parasitas, etc.) mais comumente associado àquelas oriundas do metabolismo secundário¹, sendo estas de extrema importância tanto para a saúde humana, uma vez que essas moléculas podem ser aplicadas como base para o desenvolvimento de novos fármacos², como também para o entendimento das vias biossintéticas³.

Nesse contexto, o uso de um método que seja capaz de analisar com facilidade a composição química de uma amostra biológica torna-se imprescindível. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas (CLAE-EM) se mostrou uma técnica eficaz para o mapeamento inicial das possíveis moléculas presentes em uma amostra³. Por outro lado, a interpretação de seus resultados se mostra o principal desafio para seus usuários, sendo necessário o auxílio de bases de dados e artigos científicos para identificar novas substâncias⁴. Dentre as fontes de produtos naturais as plantas são o grupo com a maior variedade^{3,5}, sendo responsáveis por 25% dos fármacos baseados em moléculas de origem natural⁵, o que demonstra a relevância do estudo dessas espécies para o desenvolvimento de novos fármacos.

No campo dos produtos naturais derivados de plantas estão inseridos os bambus, que estão presentes em diversas florestas pelo mundo, com exceção das situadas nos continentes europeu e antártico, esta espécie é frequentemente utilizada na cultura asiática para diversos fins como nutrição, conservação de alimentos⁶, sendo associados principalmente ao seu potencial antioxidante, além de atividade anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana, dentre outras⁷. *G. angustifolia* var. bicolor, objeto deste estudo, trata-se de um bambu nativo da Colômbia⁶, sem relatos de sua composição, no entanto,

estudos realizados com outros bambus corroboram para predizer as possíveis espécies químicas esperadas, como compostos fenólicos, flavonóides, lactonas e glicosídeos^{7,8,9,10,11,12}.

Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS)

O GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>) é uma plataforma online que integra diversos bancos de dados públicos relacionados à espectrometria de massas, a fim de facilitar e nortear pesquisas relacionadas à elucidação de estruturas químicas. O pesquisador que deseja usufruir do recurso necessita apenas de se cadastrar e inserir os arquivos obtidos em sua análise na plataforma, selecionando quais parâmetros o programa deve levar em consideração. O GNPS faz uso do algoritmo denominado MS-Cluster para realizar essa busca, ao se basear no fragmento m/z e o MS^2 gerado pelo mesmo. Além da funcionalidade para encontrar estruturas já conhecidas, existem também opções que apresentam redes moleculares inter-relacionando compostos com padrões semelhantes de fragmentação, a fim de auxiliar na elucidação de novas substâncias. Detalhes mais aprofundados da metodologia empregada pelo GNPS e seu funcionamento podem ser encontrados na literatura^{13,14}.

Experimental

Preparo das amostras

A coleta do material vegetal e a preparação das amostras foram relatados anteriormente¹⁵.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Arranjo de diodos (CLAE -DAD)

Na cromatografia líquida de alta eficiência, as amostras de extrato e das frações (diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol) foram solubilizadas em metanol, exceto para as frações em clorofórmio que foram solubilizadas em acetonitrila, para resultar na concentração de 1,0 mg/mL, sendo realizada em coluna de C18 4,6 x 150 mm com partículas de 3,5 μ m (Zorbax Eclipse Plus C18 p/n959963-902), célula de fluxo de 60 mm, nos comprimentos de onda de 352, 280, 254, 325, 215, 225 nm, sendo a fase móvel ácido acético a 0,1 % e acetonitrila, com fluxo de injeção de 1 mL/min à 45°C, volume de injeção 3,0 μ L. Utilizou-se o gradiente de fase móvel da seguinte maneira: 0-6 min (10% acetonitrila), 6-7 min (10 a 15% acetonitrila), 7-22 min (15% acetonitrila), 22-32 min (15 a 50% acetonitrila), 32-42 min (50 a 100% acetonitrila), 42-50 min (100% acetonitrila).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM)

A CLAE-EM foi realizada pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, utilizando os equipamentos acoplados: qTof MAXIS 3GBruker Daltonics e HPLC Shimadzu LC 20AD XR. A coluna cromatográfica utilizada foi Phenomenex Luna C18 5 μ m (250x4.6 mm) à 40 °C utilizando os solventes H₂O 0,1%AF (Solvente A) e Acetonitrila 0,1%AF (Solvente B), cujo gradiente foi expresso no Quadro 2, sob o fluxo de 1,0 mL/min. Enquanto que a espectrometria de massas foi realizada em um sistema à 250 °C e 2 Bar com uma fonte de ionização eletrospray, e 9 detectores de íons em modo negativo, onde foram captados MS^1 e MS^2 . Neste caso, preferiu-se a detecção em modo negativo pela maior quantidade de informações, tanto em bancos de dados como na literatura, de espectros de flavonoides e compostos fenólicos. Os cromatogramas obtidos foram lidos com recurso contido no site denominado GNPS LCMS Dashboard - Version 0.60 (<https://dashboard.gnps2.org/>), no qual é possível analisar o cromatograma obtido por CLAE-EM, além de outras opções que permitem uma melhor compreensão e visualização do mesmo.

Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS)

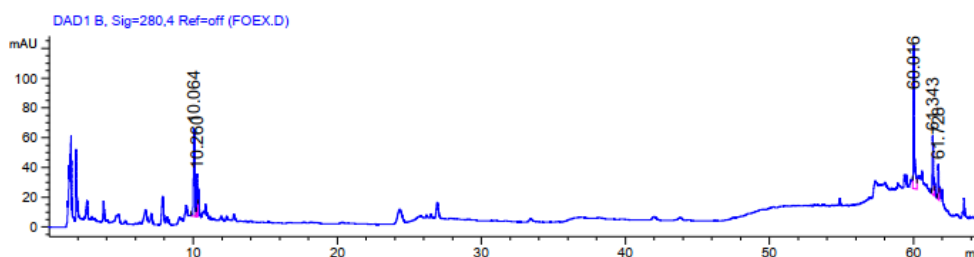
Nesta análise, a tolerância da massa do íon precursor foi determinada como 2,0 Da com tolerância do íon do fragmento MS/MS de 0,5 Da, o valor de cosseno 10 maior ou igual à 0,7 e 6 picos correspondentes para comparar os espectros de massa obtidos por CLAE-EM. O tamanho máximo de nódulos equivalentes a um único composto será definido como 100 e os de menor pontuação serão removidos deste grupo até que a quantidade de semelhantes selecionados esteja abaixo do limite estabelecido¹³. Estes parâmetros foram baseados no “Minicurso: Análise de dados de metabolômica explorando ferramentas do GNPS” oferecido pela Divisão de Produtos Naturais da Sociedade Brasileira de Química¹⁶. Todas as amostras foram analisadas pelo GNPS em um mesmo processo. Ao final desta análise, foram mostradas opções das quais foram utilizadas as contidas em “Default Molecular Networking Results Views” para análise de resultados. Com a opção “View All Library Hits”, foram mostrados uma variedade de 12.649 compostos, contudo muitos destes são repetidos, pois esta opção contém os espectros de massas de diferentes bancos de dados e análises feitas por outros usuários do GNPS¹³. Desse modo, a fim de facilitar a leitura dos resultados obtidos, foi utilizada a opção “View Unique Library Compounds” que se baseia apenas no banco de dados referência do GPNS para interpretação dos espectros, mostrando ao todo 230 compostos distintos. Em seguida, após a apresentação dos dados pelo programa, foram aplicados filtros nos parâmetros “Cosine” com no mínimo 0,7, e “MZErrorPPM” de no máximo 5 ppm, reduzindo o número de resultados para 26. Por fim, os espectros de MS² do cromatograma foram comparados com dados da literatura a partir do que foi proposto pelo GNPS para cada íon MS¹.

Resultados e Discussão

CLAE-DAD

Os compostos fenólicos têm uma estrutura fundamental baseada em um anel aromático, que permite o uso de CLAE e detectores UV-vis conjuntamente para detectá-los, uma vez que os compostos fenólicos exibem distintos níveis de absorção de luz, devido à presença de anéis aromáticos e ligações duplas conjugadas em suas estruturas moleculares. A Figura 1 representa o cromatograma resultante deste método, realizado com o extrato bruto de folhas, os tempos de retenções e os picos foram comparados com uma lista de padrões sob as mesmas condições. Desse modo, foi possível apenas reconhecer o pico de 10.064 minutos em 280 nm a partir de uma série de padrões injetados e analisados, se tratando do ácido *p*-cumárico. Além disso, a presença dessa substância foi constatada em *G. angustifolia* var. *angustifolia*¹¹ e *G. chacoensis*¹² utilizando o mesmo método.

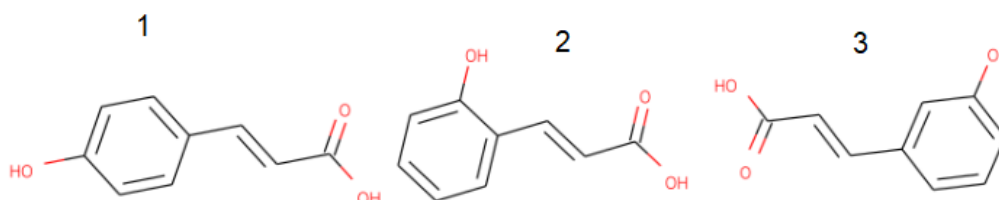
Figura 1- HPLC-DAD realizado com o extrato bruto de folhas de *G. angustifolia* var bicolor



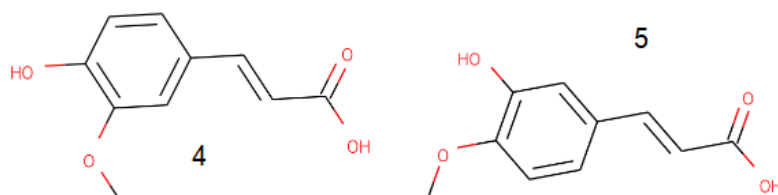
Análise por CLAE-EM com dados obtidos no GPNS

Ao todo, foram possíveis anotar 9 compostos fenólicos, 12 flavonoides, e 4 ácidos graxos e seus derivados. A seguir, foram discutidos os resultados apresentados pela análise gerada no GNPS.

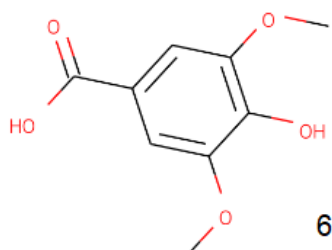
Em primeiro lugar, são apresentados os resultados das análises com as subfrações C, D, E, F e G de diclorometano, a fim de discutir as possíveis moléculas presentes em sua composição. Algumas destas substâncias foram encontradas, em menores quantidades, nas subfrações de acetato de etila e/ou n-butanol, provavelmente devido ao não esgotamento completo dessas substâncias durante o fracionamento, porém serão consideradas como pertencentes às subfrações de diclorometano.



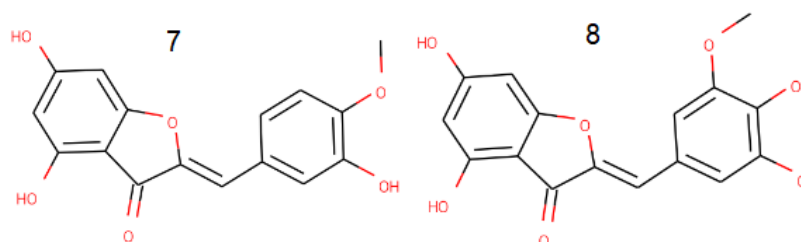
A estrutura de menor massa molar identificada pelo GNPS, podendo se tratar dos isômeros do ácido cumárico (1, 2 e 3), presente em todas as subfrações entre 14,35-1,55 minutos de eluição, foi $C_9H_8O_3$ de massa molar 164,0474 Da. Sendo possivelmente ácido *p*-cumárico (1) sob a forma de íon pseudomolecular 163,0394 m/z $[M-H]^-$, no MS² foram detectados dois fragmentos 119,04 m/z $[163-CO_2]^-$ e 93,03 m/z $[119-C_2H_2]^-$. A partir de dados coletados na literatura constatou-se que se trata do ácido *p*-cumárico, uma vez que o mesmo foi relatado como composto mais abundante em outros bambus do mesmo gênero, como *G. angustifolia* var. *angustifolia*¹¹ e *G. chacoensis*¹², além disso, também está de acordo com o que observado pela análise em CLAE-DAD. A presença de ácido *p*-cumárico já foi relatada em diversas espécies de bambu e o composto apresentou atividade anti-tirosinase isoladamente¹⁷.



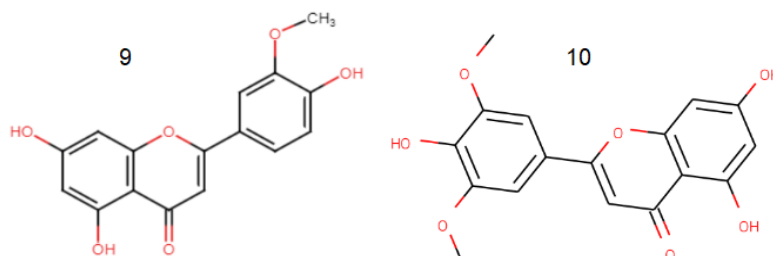
Bastante semelhantes ao ácido *p*-cumárico, presentes em DiC e DiD no tempo de retenção 17,0 à 17,6 minutos, foram propostos os isômeros (C₁₀H₁₀O₅) ácido ferúlico (4) e isoferúlico (5). Ambos com massa molar 194,0577 Da e íon pseudomolecular 193,0497 m/z [M-H]⁻, com apenas um único fragmento em 134.03 m/z compatível com [(M-H)-CH₃-CO₂]⁻. Comparando os dois isômeros em questão, de acordo com a literatura, ambos possuem fragmentação distinta¹⁸. Contudo, existe a possibilidade de se tratar de ácido ferúlico, pois para este isômero pode haver apenas a detecção do fragmento em 134 m/z¹⁹. Assim como o ácido *p*-cumárico, o ácido ferúlico é frequentemente encontrado em bambus tropicais^{20,21}.



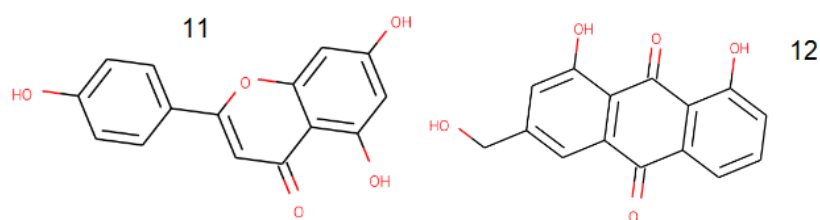
Outro composto fenólico, também identificado em DiC e DiD, foi o ácido sirínico (6), da classe dos ácidos benzóicos, que possui fórmula molecular C₉H₁₀O₅ e massa molar 198,0527 Da. O íon pseudomolecular 197,0447 [M-H]⁻ m/z foi detectado entre 12,8 e 13,9 minutos, constatando dois fragmentos de MS² 123,00 m/z [(M-H)-CH₃-CH₃-CO₂]⁻ e 95,01 m/z [123-CO]⁻. Na fragmentação do ácido sirínico é possível a formação dos íons detectados, contudo ocorrem juntamente com os fragmentos em 182, 121 e 153 m/z²². Desse modo, os resultados obtidos não permitem confirmar a identidade desta substância.



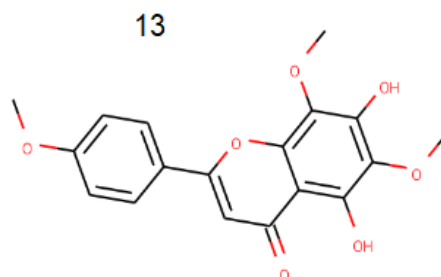
Nas subfrações DiC e DiD, para os tempos de retenção entre 26,2 e 27,0 minutos, o GNPS sugeriu a estrutura de duas substâncias para as quais não há relatos de sua presença em bambus ou mesmo em Poaceae^{23,24}. A primeira sugestão para o íon pseudomolecular 299,0549 m/z [M-H]⁻ foi o composto 4,6-di-hidroxi-3'-metoxi-4'-hidroxi aurona (7), de fórmula molecular C₁₆H₁₂O₆ e massa molar 300,0629 Da.. A segunda sugestão seria a 4,6-di-hidroxi-3',5'-dimetóxi-4'-hidroxi aurona (8), com íon pseudomolecular 329,0653 m/z [M-H]⁻, fórmula molecular C₁₇H₁₄O, e massa molar 330,0733 Da.



O fato de não haver relatos prévios para auronas em bambus, demandou uma pesquisa mais aprofundada desses espectros. A partir de buscas na literatura foram constatados dois isômeros para fórmulas moleculares $C_{16}H_{12}O_6$ e $C_{17}H_{14}O_7$ com o mesmo padrão de fragmentação observados para os íons em 299,0549 m/z e 329,0653 m/z, respectivamente, 284,03 m/z $[(M-H)-CH_3]^-$ e 256,03 m/z $[284-CO]^-$, e 299,01 m/z $[(M-H)-CH_3-CH_3]^-$ e 271,02 m/z $[299-CO]^-$, podendo se tratar respectivamente de crisoerio²⁵ (9) e tricina²⁶ (10), ambos são flavonóides já descritos em bambus asiáticos²⁷.



Neste contexto, a presença de um outro flavonóides ou uma antraquinona foi indicada nas subfrações DiC, DiD e DiE. No tempo de retenção entre 25,6-26,2 minutos ocorreu o fragmento 269,0446 m/z, do qual o GNPS indicou a possibilidade de tratar de duas moléculas, apigenina (11) ou alo-emodina (12), ambas de fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_6$ e massa molar 270,0526 Da. O MS² apresentou fragmentos em 269,04 m/z, 151,00 m/z, 117,03 m/z e 107,01 m/z. A análise dos dados relacionados ao MS² da alo-emodina, indicou uma inconsistência entre a fragmentação observada e àquela relatada na literatura^{28,29,30}. Contudo, ao observar o mecanismo de fragmentação apresentado para flavonas³⁴, foi possível estabelecer uma relação com o resultado obtido, levando a crer que o composto alvo se trata de fato da apigenina³¹. Adicionalmente, a apigenina é a genina mais comum encontrada nos flavonóides isolados de diversas espécies de bambu³².

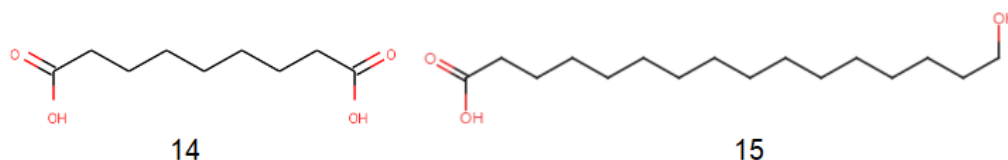


Além da apigenina, também foi proposta a estrutura de outro flavonoide no tempo de retenção 33,0-33,6 minutos a partir do íon pseudomolecular 343,0806 m/z $[M-H]^-$, a nevadensina (13), de fórmula

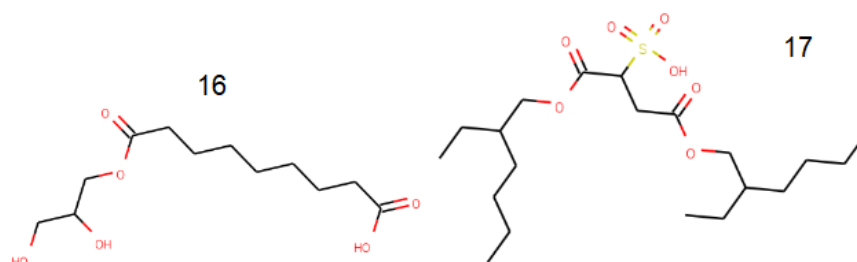
molecular $C_{18}H_{16}O_7$ e massa molar 344,088 Da. Os fragmentos 313,03 m/z [(M-H)-CH₃-CH₃]⁻, 285,03 m/z [313-CO]⁻, 241,04 m/z [285-CO₂]⁻ e 226,02 m/z [241-CH₃]⁻ estão de acordo com os mecanismos propostos^{31,33} e os dados reportados na literatura³⁴.

Os flavonoides, podem ocorrer sob diferentes formas, como agliconas (forma livre) e glicosídeos, variando em termos de substituintes (tipo, quantidade e localização) e grau de insaturação³⁵. Além disso são frequentemente encontrados em bambus, estando associados à propriedades antioxidantes²⁷, assim como estudos apontam sua atividade inibidora da enzima tirosinase³⁶.

Além dos polifenóis, as plantas contêm uma notável variedade de ácidos graxos que variam em comprimento de cadeia, quantidade e posição de ligações π (também conhecidas como insaturações), ou na incorporação de grupos funcionais não convencionais (por exemplo, hidróxi, epóxi, cetona, acetilênico)³⁷. Neste contexto, para quatro dos íons detectados foram propostas estruturas dos ácidos graxos e seus derivados.



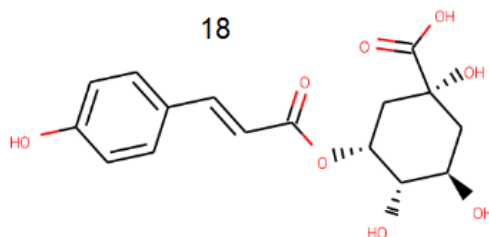
Em dois casos, ambos foram detectados em praticamente todas as subfrações, com exceção de nButD e AcI. O ácido azelaico (14) de fórmula molecular $C_9H_{16}O_4$ e massa molar 188,1051 Da foi indicado para o íon pseudomolecular 187,0971 m/z $[M-H]^-$ no tempo de retenção 18,9-19,6 minutos. Sua fragmentação inclui 125,09 m/z $[(M-H)-CO_2-H_2O]^-$, 97,06 m/z $[125-C_2H_4]^-$ e 69,03 m/z $[97-C_2H_4]^-$, que coincidem com a literatura³⁸. Além disso, esse composto tem eficácia comprovada no tratamento de rosácea, acne vulgar e desordens de pigmentação da pele FDA dos estados unidos³⁹. O outro composto detectado nessas subfrações foi o de íon pseudomolecular 271,2277 m/z, referenciado como ácido junípero (15) ($C_{16}H_{32}O_3$), embora não haja registro em literatura sobre sua fragmentação. No entanto, com base na literatura é possível inferir que os íons em 271,23 e 225,22 m/z podem corresponder ao íon pseudo molecular e ao produto de descarboxilação³⁹.



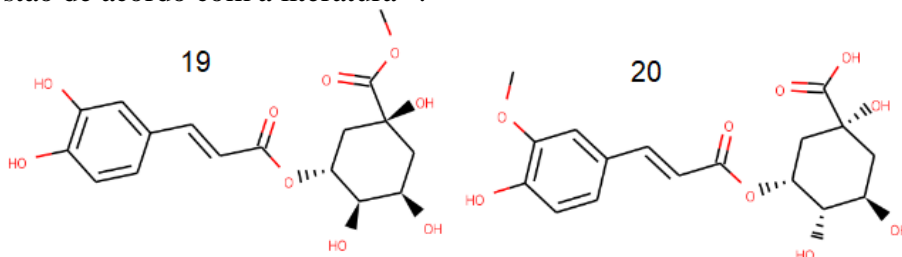
Os outros dois ácidos graxos foram encontrados apenas nas subfrações DiC e DiD, e menor quantidade em DiE. No tempo de retenção 18-18,5 minutos, com fragmento 261,1337 m/z foi proposto o ácido 9-(2,3-dihidroxiipropoxi)-9-oxononanoico (16) de fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_6$ e massa molar 272,2357 Da, sua fragmentação apresentou picos em 235,02 m/z, 187,09 m/z, 125,10 m/z e 97,06 m/z. Com base nos dados da literatura para o composto, os resultados obtidos indicam que se trata do mesmo composto⁴⁰. O composto com tempo de retenção de 61,8-62,2 min e íon pseudomolecular em 421,2241 m/z foi identificado como sulfossuccinato de dioctila (17) ($C_{20}H_{37}O_7S$), sendo observado apenas um fragmento em 80,96 m/z. O resultado está de acordo com

com os dados previamente reportados na literatura⁴¹. A substância também é descrita como um componente de pesticidas para plantas, indicando que em nosso caso não se trata de um produto natural, mas um artefato^{42,43}.

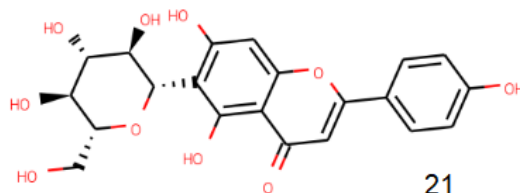
Como comentado anteriormente, compostos fenólicos e flavonóides também podem se apresentar sob a forma conjugada com glicosídeos. Nas subfrações AcG, AcH, AcI e nButD foram encontradas algumas dessas estruturas.



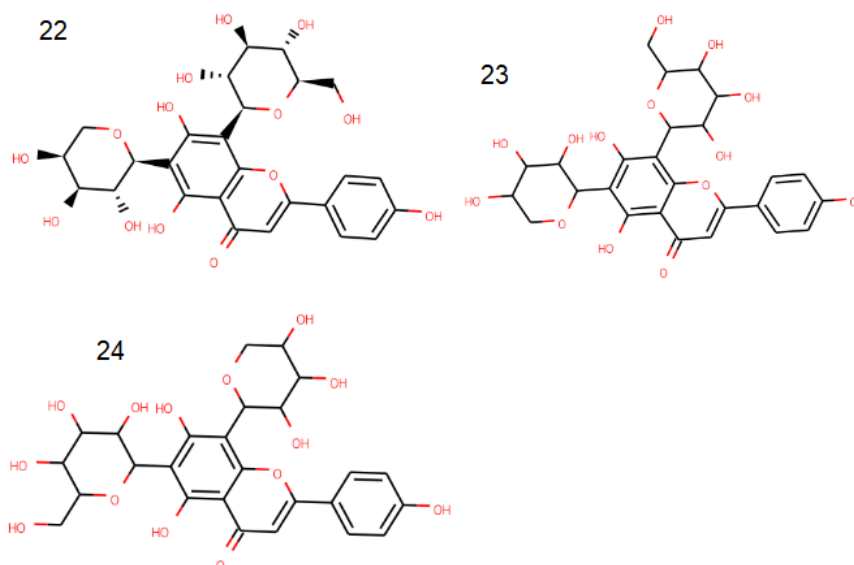
Um desses derivados esterificados foi o ácido cumaroilquínico (18) ($C_{16}H_{18}O_8$) de massa molar 338,1009 Da. Sendo detectado na subfração nButC e AcH entre 13,0 e 14,0 minutos à partir do íon pseudomolecular 337,0929 m/z. O Dentre os íons obtidos 191,06 m/z, 173,04 m/z, 119,05 m/z e 93,03 m/z, todos estão de acordo com a literatura⁴⁴.



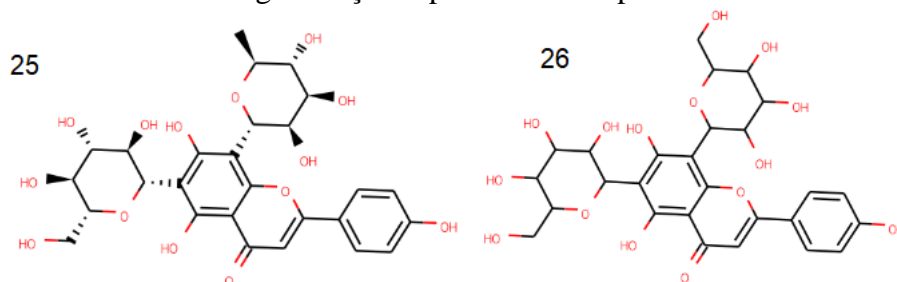
O íon pseudo molecular 367,1027 m/z também foi sugerido pelo GNPS como um possível composto fenólico esterificado. Neste caso, foram propostos dois isômeros de fórmula molecular $C_{17}H_{20}O_9$, sendo clorogenato de metila (19) e/ou ácido 3'-metoxi-clorogénico (20), ambos de massa molar 368,1107 Da. O íon se faz presente majoritariamente em AcH, com pequenos resquícios em DiG, nos respectivos tempos de retenção de 11,6-12,0 e 13,4-14,0 minutos, com fragmentos em MS² em 193,04 m/z, 173,04 m/z, 134,03 m/z e 93,03 m/z. Segundo a literatura consultada⁴⁴, os padrões observados não se tratam de nenhum dos dois compostos, provavelmente se tratando de um outro isômero. Vale ressaltar que fenóis conjugados, como os apresentados, são os compostos abundantes em bambus de origem sul-americana¹⁰, além disso possuem relatada atividade antioxidante⁴⁵.



Seis flavonóides glicosilados também foram sugeridos pelo GNPS. Um deles sendo isovitexina (21) ($C_{21}H_{20}O_{10}$) no tempo de retenção entre 15,6-15,9 minutos, presente em AcI e com íon pseudo molecular 431,0904 m/z $[M-H]^-$, com fragmentos 341,06 m/z, 323,05 m/z, 311,05 m/z e 283,06 m/z, estando de acordo com os resultados encontrados na literatura⁴⁶.



As cinco substâncias discutidas a seguir compreendem formas C-glicosiladas da apigenina, portanto possuem padrões de íons em MS² muito semelhantes entre si, assim como seus mecanismos de fragmentação, sendo reportadas estruturas muito semelhantes na espécie de bambu *P. praececox*⁴⁷. No tempo de retenção 13,9-14,7 minutos em AcH, DiG e nButC, referente ao íon pseudo molecular 563,1385 m/z, foram propostas as estruturas de isoschaftosídeo (22), neoeixosídeo (23) e Vicenina-3 (24). Os fragmentos analisados foram 563,14 m/z, 473,10 m/z, 443,09 m/z, 383,07 m/z e 353,07 m/z, que estão de acordo com os resultados descritos para esta série de compostos⁴⁸, não sendo encontradas propostas para um mecanismo de fragmentação especificamente para as mesmas.



Violantina (25), de fórmula molecular C₂₇H₃₀O₁₄ e massa molar 578,1638 Da, foi candidata ao íon 577,1558 m/z no tempo de retenção 15,12-16,30 minutos em nButC e DiG, com fragmentos 577,16 m/z, 503,11 m/z, 473,10 m/z, 457,09 m/z, 383,08 m/z e 353,07 m/z, estes dados são semelhantes ao reportados na literatura⁴⁹, e estão de acordo com mecanismos de fragmentação⁵⁰. Enquanto que em AcH aos 12,4 minutos, a apigenina 6,8-digalactosídeo (26) (C₂₇H₃₀O₁₅) foi proposta para o fragmento 593,1497 m/z, com íons 593,15 m/z, 503,11 m/z, 473,10 m/z, 383,08 m/z e 353,07 m/z. Do ponto de vista biossintético, essas substâncias podem estar presentes na composição do vegetal, uma vez que sua precursora a apigenina é a estrutura de genina mais presente bambus, além de que, como foi citado anteriormente, arranjos de cadeias bastante semelhantes podem ocorrer na espécie vegetal.

Conclusões

O uso do GNPS se mostrou uma ferramenta extremamente facilitadora na triagem de 26 possíveis substâncias presentes na composição química da espécie *G. angustifolia* var. *bicolor*, sendo algumas dessas análises com extrema acurácia ao se comparar com dados da literatura, levando a crer com muita confiança de sua identidade. Vale ressaltar que em função de condições experimentais distintas as fragmentações podem não ser exatamente iguais aquelas presentes na literatura, variando a intensidade dos íons formados e os mecanismos de fragmentação que ocorrem. Contudo, a partir do que foi notado nos cromatogramas, ainda existem diversas outras substâncias a serem esclarecidas na espécie.

Os fenóis não glicosados (ácido ferúlico, isoferúlico, ácido sirínico e nevadensina) foram encontrados na fração diclorometano, enquanto as formas glicosiladas foram identificadas nas frações acetato de etila e *n*-butanol (ácido cumaroilquínico, violantina, apigenina 6,8-digalactosídeo, isoschaftosídeo, neoeixosídeo e vicenina-3), com exceção do ácido *p*-cumárico que se mostrou presente em todas as frações.

Por fim, este estudo proporcionou uma análise química inicial da espécie *G. angustifolia* var. *bicolor*. A análise abre caminho para comparações com outras espécies dentro do gênero *Guadua* e pode orientar futuras investigações na busca por novas moléculas com potencial farmacológico.

Agradecimentos

Instituto de Química da USP

Referências

1. Johnson, S. R.; Lange, B. M. *Front. in Bioeng. and Biotechnol.*, **2015**. Doi: 10.3389/fbioe.2015.00022.
2. Alan L.H. *Nat. produc. in drug disc.*, **2008**. Doi: 10.1016/j.drudis.2008.07.004.
3. Sawada, Y.; Hirai M.Y. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2013**. Doi: 10.5936/csbj.201301011.
4. Sorokina, M.; Steinbeck, C. *J. of Cheminform.*, **2020**. Doi: 10.1186/s13321-020-00424-9.
5. Najmi, A.; Sadique, A.J.; Mohammed, A.B.; Hassan, A.A. *Mol.*, **2022**. Doi: [10.3390/molecules27020349](https://doi.org/10.3390/molecules27020349).
6. Singhal, P. et al. *Crit. Rev. in Food Sci. and Nutri.*, **2013**. Doi: 10.1080/10408398.2010.531488.
7. Gagliano, J.; Anselmo-Moreira, F.; Sala-Carvalho, W.R.; Furlan, C.M. *Adv. in Trad. Med.*, **2021**. Doi: 10.1007/s13596-020-00536-5.
8. Afifi, F.; Shervington, A.; Darwish, R. M; *Acta Techno. et Legis Medic.*, **1997**. Doi: 10.4103/0973-1296.204551.
9. Lu, B.; Wu, X.; Tie, X.; Zhang, Y; *Food Chem. Toxicol.*, **2005**. Doi: 10.1016/j.fct.2005.01.019.
10. Wróblewska, K. B: *Tese de doutorado*, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2019.
11. Oliveira, D. C. S.: *Tese de mestrado*, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2019.
12. Nunes, F. A.: *Tese de mestrado*, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 2020.
13. Wang, M.; Carver, J. J.; Phelan, V.V.; Sanchez, L.M.; Garg, N.; Peng, Y.; Luzzatto-knaan, t.; *Nature Biotech.*, **2016**. Doi: 10.1038/nbt.3597.
14. Aron, A.T., et al. *Nature Protocols*, **2020**. Doi: [10.1038/s41596-020-0317-5](https://doi.org/10.1038/s41596-020-0317-5).
15. Corrêa, J.K.C.; Moreno, P.R.H.; *10º Workshop do Mestrado Profissional – USP, IQ*, **2022**. Doi: 10.5151/9786555502084-07.
16. <https://www.youtube.com/watch?v=QVw1K1dkpIc>. Acessado em outubro de 2023.

17. Ilham, A.; Vimala, S.; Rashih, A.; Sahdan, R.; Jamaluddin, M.; Juliza, M., *J. of Trop. For. Sci.*, **2008**, 20, 123.
18. Kuhnert, Nikolai, et al. *Rapid Commun. in Mass Spec.*, **2010**. Doi: 10.1002/rcm.4537.
19. Sinosaki, N., et al. *J. of the Brazilian Chem. Soc.*, **2020**. Doi: [10.21577/0103-5053.20190197](https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190197).
20. Kweon, M.H, Hwang, H.J.; Sung, H.C. *J. of Agric. and Food Chem.*, **2001**. Doi: 10.1021/jf010514x
21. Choi, M.H. et al.. *J. of Mol. Sci.*, **2018**. Doi: 10.3390/ijms19020409
22. Biesaga, M.; Pyrzynska, K. *J. of Chromatography A*, **2009**. Doi: 10.1016/j.chroma.2009.07.066
23. Yang, J., et al. *Crit. Rev. in Food Sci. and Nutri.*, **2023**. Doi: [10.1080/10408398.2023.2248244](https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2248244).
24. Iwashina, T. *J. of Plant Res.*, **2000**. Doi: [10.1007/pl00013940](https://doi.org/10.1007/pl00013940).
25. Frišćić, M.; Bucar, F.; Hazler Pilepić, K. *J. of Mass Spec.*, **2016**, 51, 1211.
26. Kang, J. et al., *Food Chem.*, **2016**, 211, 215.
27. Gong, J. et al. *J. of Med. Food.*, **2015**. Doi: 10.1089/jmf.2014.3189.
28. Fengguo, X.; Ying, L.; Zunjian, Z.; Rui, S.; Haijuan, D.; Yuan, T., *J. of Pharma. and Biomed. Analysis*, **2008**. Doi: [10.1016/j.jpba.2008.02.005](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.02.005).
29. Qin, Y.; Jin, X.; Wenfu, T.; Maozhi, L.; Yongping, Q.; Feng, N., *J. of Chromatography B*, **2009**. Doi: [10.1016/j.jchromb.2009.05.030](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.05.030).
30. Zhang, Y.; et al. *Int. J. of Pharma. Sci.*, **2013**. Doi: [10.1691/ph.2013.2855](https://doi.org/10.1691/ph.2013.2855).
31. Fabre, N.; Rustan, I.; De Hoffman, E.; Quetin-leclercq, J. *J. Am. Soc. of Mass Spec.*, **2001**. Doi: 10.1016/S1044-0305(01)00226-4.
32. Kim, C.Y. et al., *J. of the Korean Soc. for Ap. Bio. Chem.*, **2009**. Doi: 10.3839/jksabc.2009.102.
33. Liang, C., et al. *J. of Chromatography B*, **2018**. Doi: [10.1016/j.jchromb.2018.03.032](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.03.032).
34. Gómez, J., et al., *Mol.*, **2019**. Doi: [10.3390/molecules24061085](https://doi.org/10.3390/molecules24061085).
35. Iwashina, T. *J. of Plant Res.*, **2000**. Doi: [10.1007/pl00013940](https://doi.org/10.1007/pl00013940).
36. Rho, H.S., et al. *Bioorg. & Med. Chem. Letters*, **2010**. Doi: [10.1016/j.bmcl.2010.09.082](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.09.082).
37. Kazaz, S., et al. *Prog. in Lipid Res.*, **2022**. Doi: [10.1016/j.plipres.2021.101138](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101138).
38. Farhat, Y., et al. *J. Mass of spec.*, **2011**. Doi: <https://doi.org/10.1002/jms.1911>.
39. Searle, T., et al. *J. of Dermat. Treat.*, **2020**. Doi: [10.1080/09546634.2020.1800579](https://doi.org/10.1080/09546634.2020.1800579).
40. Xu, H.; Gao, H.; Liu, F.; Gong, L.; *Foods*, **2022**. Doi: [10.3390/foods11142085](https://doi.org/10.3390/foods11142085).
41. <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=d848b91d7193e9e69d2600a70f17841aa61142f5>. Acessado em setembro de 2023.
42. Li, Y., et al. *Front. in Plant Sci.*, **2023**. Doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1257672>.
43. Azizi, K. *Plant Protec. (Sci. J. of Agriculture)*, **2023**. Doi: [10.22055/ppr.2023.17998](https://doi.org/10.22055/ppr.2023.17998).
44. Szymborska, K.; Frański, R.; Beszterda-Buszcak, M. *Mol.*, **2022**. Doi: [10.3390/molecules27217543](https://doi.org/10.3390/molecules27217543).
45. Dangles, O. *Current Org. Chem.*, **2012**. Doi: [10.2174/138527212799957995](https://doi.org/10.2174/138527212799957995).
46. Guo, X.; Yue, Y.; Tang, F.; Wang, J.; Yao, X.; Sun, J. *Int. J. of Mass Spec.*, **2013**. Doi: doi.org/10.1016/j.ijms.2012.08.035.
47. Wang, Y., et al. *J. of Func. Foods*, **2020**, Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104015>.
48. Raffaelli, A., et al. *J. of Chromatography A*, **1997**. Doi: [10.1016/s0021-9673\(97\)00260-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(97)00260-4).
49. Koike, A.C.R. *Tese Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2015.
50. De Athayde, A. E.; *Tese Mestrado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2019.