

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica**

**Avaliação do potencial antioxidante e anti tirosinase da *Guadua angustifolia*
var. bicolor Lodoño (Bambusoideae:Poaceae) e composição química**

João Kazlauckas Caetano Corrêa

**Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo.**

**Orientador: Paulo Roberto
Hrihorowitsch Moreno**

São Paulo

2023

SUMÁRIO

	Pág
Lista de Abreviaturas	1
RESUMO	2
1. INTRODUÇÃO	4
1.1 Bambus	4
1.2 Atividade antioxidante	5
1.3 Atividade anti-tirosinase	5
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	6
3.1 Coleta e identificação do material vegetal	6
3.2 Extração	6
3.3 Fracionamento	6
3.4 Separação e identificação dos metabólitos secundários	7
3.4.1- Cromatografia em coluna	7
3.4.2- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Arranjo de diodos (CLAE -DAD)	8
3.4.3- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM)	9
3.4.4 Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS)	10
3.6 Determinação da atividade antioxidante	11
3.7. Determinação da atividade anti-tirosinase	12
3.8 Quantificação de compostos fenólicos	12
3.9 Quantificação de flavonoides	12

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4.1- Análises químicas	12
4.1.1-Rendimento do extrato bruto, das frações e subfrações	12
4.1.1.1-Extração	12
4.1.1.2-Fracionamento	12
4.1.1.3-Cromatografia em Coluna (CC) e subfrações	13
4.2-Atividade biológica	17
4.2.1-Ensaio de Tirosinase	17
4.2.2-Ensaio com DPPH	19
4.3- Análise de compostos fenólicos e flavonoides	21
4.3.1-Frações e subfrações	21
4.4- CLAE-DAD	24
4.5-Análise por CLAE-EM com dados obtidos no GPNS	24
5. CONCLUSÕES	36
6. REFERÊNCIAS	37
7. ANEXOS	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN: acetonitrila

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI: atmospheric pressure chemical ionization

CC: cromatografia em coluna

CLAE-EM: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas

CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência

DAD: detecção por arranjo de diodos

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazina

EAG: equivalentes de ácido gálico

EQ: equivalentes de quercetina

FDA: Food and Drug Administration

GNPS: Global Natural Products Social Molecular Networking

IC₅₀: concentração média capaz de reduzir 50%

L-DOPA: 3,4-di-hidróxi-L-fenilalanina

m/z: razão massa e carga

v/v: proporção volume por volume

RESUMO

KAZLAUCKAS, J. **Avaliação do potencial antioxidante e anti-tirosinase da *Guadua angustifolia* var. bicolor Lodoño (Bambusoideae:Poaceae) e composição química.** 2023. no. f. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

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

INTRODUÇÃO: *Guadua angustifolia* var. bicolor Lodoño é uma variedade da espécie *G. angustifolia* Kunth, endêmica da Colômbia e introduzida no Brasil. Esta variedade se destaca por características como colmos verdes com listras amarelas e nós esbranquiçados. No entanto, sua distinção dentro do grupo *Guadua* apresenta desafios taxonômicos. **OBJETIVO:** Avaliar a atividade oxidante e anti-tirosinase de *G. angustifolia* var. bicolor e tentar correlacionar essas atividades com os metabólitos presentes na espécie vegetal. **MÉTODOS:** As folhas de *G. angustifolia* var bicolor foram coletadas em Bauru, no Viveiro do Laboratório de Experimentação com Bambu da Universidade Estadual Paulista, Campus Bauru. A partir do material vegetal coletado, 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 (CC) para uma melhor separação das substâncias presentes nelas. Em seguida, realizou-se a avaliação do potencial antioxidante pelo método de supressão do radical DPPH e a atividade anti-tirosinase fúngica utilizando *L*-dopa como substrato. O extrato bruto, as frações (diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol), e as subfrações de diclorometano e *n*-butanol com melhores resultados nas atividades biológicas, foram quantificados os compostos fenólicos totais com o reagente de Folin-Ciocalteu e os flavonoides totais com $AlCl_3$. Por fim, 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). **RESULTADOS:** O rendimento do extrato foi de 16,71%, as frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol apresentaram respectivamente 2,4%, 21,4%, 12,5% e 4,5%. Para a atividade anti-tirosinase o extrato apresentou apenas 12,86% de inibição em uma concentração de 700 μ g/mL. Por outro lado, as frações de diclorometano e *n*-butanol mostraram maior potencial, inibindo 16,46% e 24,06%, respectivamente, ambas à 400 μ g/mL. Para a atividade antioxidante, tanto o extrato bruto como a fração *n*-butanol apresentaram os menores IC_{50} , 163,55 μ g/mL e 102,95 μ g/mL respectivamente. Nos testes de atividade antioxidante e anti-tirosinase das subfrações, apenas diclorometano C, D, E e F, e *n*-butanol B, C e D foram incluídas neste trabalho. A fração *n*-butanol se mostrou aquela com a maior quantidade de compostos fenólicos e flavonoides. Ao todo, foram possíveis anotar 9 compostos fenólicos, 12 flavonoides, e 3 espécies de 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 e isovitexina. CONCLUSÃO: 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.

1.Introdução

1.1-Bambus

Os bambus são descritos como as espécies vegetais mais facilmente encontradas em florestas pelo mundo. Com isso, o ser humano ao longo de sua evolução se aproveitou desse recurso para utilizá-lo tanto como um material na construção de casas (HSIUNG, 1991), como no tratamento de doenças e fonte de alimento. Na Medicina Tradicional Chinesa, espécies de bambu são indicadas para diminuir inflamações, reduzir o risco do desenvolvimento de câncer, doenças cardíacas e desintoxicação. Alguns estudos associam compostos fenólicos, flavonoides (AFIFI; SHERVINGTON; DARWISH, 1997; ZHANG et al., 2005), lactonas e glicosídeos (LU et al., 2005; PATWARDHAN et al., 2005; VAIRAPPAN et al., 2015; WRÓBLEWSKA et al., 2018) com essas propriedades. Em 2014, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) publicou a RDC 21/2014 (ANVISA, 2014), com o intuito de comercializar os produtos da Medicina Tradicional Chinesa no Brasil por três anos vista a sua relevância terapêutica para o tratamento de doenças, sendo prorrogada mais dois anos pela RDC 152/2017 (ANVISA, 2017), e atualmente encontra-se em debate para a devida regularização e fiscalização.

No caso da espécie *Guadua angustifolia* Kunth var. *angustifolia*, estudos anteriores indicaram a existência de compostos fenólicos e flavonoides em quantidade moderada, demonstrando extratos de folhas e colmos com atividades antioxidante e anti-tirosinase (DE OLIVEIRA, 2019). No entanto, o potencial total da *G. angustifolia*, como também dos demais bambus americanos, não foram ainda totalmente explorados. Além disso, o Brasil possui por volta de 32,5% das espécies americanas de bambus (LONDOÑO et al. 1998), o que evidencia a forte presença dessas espécies em sua flora.

Por fim, *Guadua angustifolia* var. *bicolor* Lodoño é classificada como uma subespécie, identificada pela primeira vez na Colômbia (LONDOÑO et al. 2000)., porém, ainda há dificuldades de diferenciá-la das demais em função da falta de publicações científicas sobre a mesma, não havendo estudos de sua composição química.

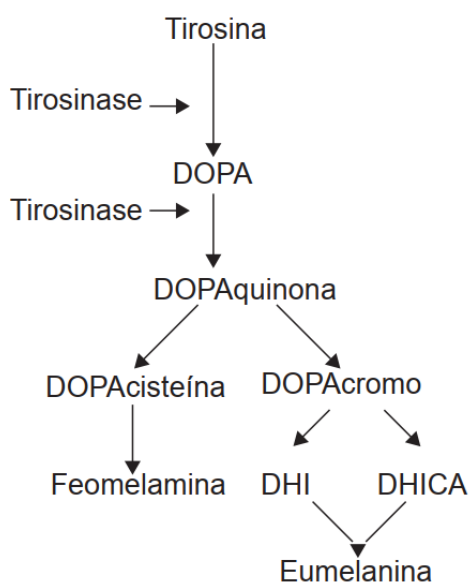
1.2-Atividade antioxidante

Agentes antioxidantes são frequentemente utilizados na indústria para retardar a degradação de alimentos e cosméticos. Também inibem o ataque de radicais livres em estruturas de DNA, RNA e proteínas nas células. Eles reagem com os radicais livres no meio formando estruturas de ressonância mais estáveis e pouco reativas, impedindo assim que as demais moléculas sejam afetadas (VALKO et al., 2006). Nos bambus, as principais substâncias antioxidantes são os compostos fenólicos e os flavonoides.

1.3- Atividade anti-tirosinase

A tirosinase é uma enzima presente nos melanócitos que promove a biossíntese da melanina (Figura 1), substância que dá cor à pele. A biossíntese da melanina inicia-se com a conversão da tirosina em dopamina, seguindo-se uma série de etapas oxidativas. A produção em excesso de melanina causa distúrbios dermatológicos, que levam ao aparecimento de melasmas, podendo evoluir para um melanoma, isto é, um câncer de pele. Desse modo, a atividade anti-tirosinase visa a inibição da enzima para retardar o crescimento de um melasma, ou auxiliar no tratamento de um melanoma (MUKHERJEEA et al., 2018).

Figura 1-Biossíntese da melanina, retirado de Rocha, Moreira (2007)



2-Objetivos

Avaliar a atividade oxidante e anti-tirosinase de *G. angustifolia* var. bicolor e tentar correlacionar essas atividades com os metabólitos presentes nas frações mais ativas da espécie vegetal.

3. Materiais e métodos

3.1- Coleta e identificação do material vegetal

As folhas de *Guadua angustifolia* var. bicolor Lodoño foram coletadas no Viveiro do Laboratório de Experimentação com Bambu da Universidade Estadual Paulista, Campus Bauru (22°21'24,3" S 49°01'38,6" O). O material vegetal recolhido foi então identificado pelo Dr. Tarcísio Filgueiras do Instituto de Botânica de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil). Uma amostra testemunha foi depositada no Herbário desta mesma instituição sob o número Moreno 600.

3.2-Extração

As folhas foram separadas e secas em temperatura ambiente à sombra por 2 semanas. Após, as folhas secas foram rasuradas e submetidas a extração em aparelho de Soxhlet usando álcool etílico 70% como solvente, até a exaustão do material. Finalizado o processo de extração, o solvente foi eliminado em um evaporador rotatório IKA RV 05 basic e aquecedor IKA HB 05.06 CN sob pressão reduzida. O extrato bruto obtido foi submetido à secagem em um recipiente contendo sílica no fundo, a fim de controlar a umidade, e em seguida, a pressão do sistema foi reduzida utilizando uma bomba de vácuo.

3.3-Fracionamento

O extrato vegetal foi fracionado por extração sólido-líquido da seguinte forma: o extrato seco foi suspenso em 100 mL de solvente por 10 minutos com o auxílio de um agitador magnético, repetindo-se o procedimento quatro vezes para cada solvente em ordem crescente de polaridade, utilizando-se os solventes *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol, respectivamente. Posteriormente os solventes foram, novamente, eliminados em evaporador rotatório sob pressão reduzida, resultando em quatro frações de polaridade distintas. As mesmas foram colocadas em um recipiente de vidro, pesadas e postas para secar em uma chapa de aquecimento a 60°C.

3.4- Separação e identificação dos metabólitos secundários.

3.4.1- Cromatografia em coluna (CC)

Para a CC, optou-se pelo uso das frações provenientes de diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol, pois tais frações demonstraram melhores resultados em estudos de outras espécies de bambu em relação à atividade antioxidante e anti-tirosinase. Foram dispostos 40 g de sílica gel em uma coluna de vidro com diâmetro de 4 cm, preenchendo-a até a altura de 5 cm, correspondendo a um volume aproximado de 63 mL. Para cada separação, a fração correspondente foi homogeneizada com 1 g de sílica e inserida na coluna, sendo 500 mg para a fração de diclorometano, 487 mg para a fração de acetato de etila e 279,6 mg para a fração de *n*-butanol. A sequência dos eluentes empregados para a Cromatografia em Coluna está detalhada no Quadro 1. Para cada composição de solvente foram realizadas três eluições com 90 mL do solvente, totalizando 270 mL em cada etapa.

Quadro 1- Sequência de eluentes utilizados para cada fração na realização da cromatografia em coluna.

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

3.4.2- 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 µm (Zorbax Eclipse Plus C18 p/n959963-902), célula de fluxo de 60mm, 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 1mL/min à 45°C, volume de injeção 3,0 µL. 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). .

3.4.3- 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 3G- Bruker Daltonics e HPLC Shimadzu LC 20AD XR. A coluna cromatográfica utilizada foi Phenomenex Luna C18 5 µm (250x4.6 mm) à 40 °C utilizando os solventes H₂O 0,1%AF (Solvente A) e ACN 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 detector de íons em modo negativo, onde foram captados MS¹ e MS². 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.

Quadro 2- Gradiente de solventes utilizado para CLAE-EM

Tempo (minutos)	% Solvente B
0	2
60	100
65	100
66	2
70	2

3.4.4- 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 no GNPS, termos técnicos e outras especificações foram compilados por WANG et al. (2016) e ARON et al. (2020).

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 maior ou igual à 0,7 e 6 picos correspondentes para comparar aos 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 estabelecido (WANG et. al, 2016). 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 Química (Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=QVw1K1dkplc>).

Todas as amostras foram analisadas pelo GNPS em um mesmo processo. Ao final desta análise, foram mostradas as opções presentes na Figura 2, das quais foram utilizadas as contidas em “Default Molecular Networking Results Views” para análise de resultados.

Figura 2- opções de análise fornecidas pelo GNPS



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 GNPS (WANG et. al, 2016).

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.

3.6- Determinação da atividade antioxidante

O teste colorimétrico com DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) foi realizado com uma solução de 0,02% em metanol, conforme o método descrito por DE OLIVEIRA (2019).

3.7.- Determinação da atividade anti-tirosinase

Para a determinação da atividade anti-tirosinase foi feito o teste colorimétrico com a enzima tirosinase fúngica, utilizando *L*-dopa (3,4-di-hidroxi-*L*-fenilalanina) como substrato (JUNG-HEE HWANG et al., 2007).

3.8-Quantificação de compostos fenólicos

Para se quantificar os fenólicos totais, foi utilizado o método descrito por DE OLIVEIRA (2019) que necessita do reagente de Folin-Ciocalteu.

3.9-Quantificação de flavonoides

Na quantificação de flavonoides foi utilizado como reagente complexante $AlCl_3$ à 1% em metanol (m/v), semelhante ao método descrito em DE OLIVEIRA (2019).

4.Resultados e discussão

4.1- Análises químicas

4.1.1-Rendimento do extrato bruto, das frações e subfrações

4.1.1.1-Extração

Das folhas secas da espécie vegetal *G. angustifolia* var. *bicolor* após a conclusão do processo de extração e secagem, a massa obtida nos extratos brutos foi de 6,08 g, representando um rendimento de 16,71%, rendimento extremamente próximo à de *G. angustifolia* var. *angustifolia* com 16,4% (DE OLIVEIRA, 2019) e *G. chacoensis* (Rojas Acosta) Londoño & P.M.Peterson com 18,67% (NUNES, 2020).

4.1.1.2-Fracionamento

Posteriormente, o extrato submetido a um fracionamento sólido-líquido, resultou em frações cujas massas obtidas em cada etapa foram expressas em miligramas na Tabela 1, juntamente com seus rendimentos.

Com base nos resultados obtidos (Tabela 1), verificou-se um maior rendimento nas frações de diclorometano e acetato de etila, sugerindo a possível presença de uma maior quantidade de compostos fenólicos e flavonoides não glicosilados, ácidos graxos e seus derivados, e alguns terpenos em maior quantidade nessa espécie. Para a fração acetato de etila, flavonoides, tanto glicosados como não glicosados, podem ocorrer nessa fração devido à polaridade do solvente. Ademais, a presença de uma grande quantidade de clorofila nas folhas pode ter influenciado significativamente a massa das frações.

Tabela 1 - Massas obtidas no fracionamento do extrato de folhas de *Guadua angustifolia* var. bicolor para cada solvente utilizado e seus rendimentos.

Fração	Massa das frações (mg)	Rendimento das frações (%)
Hexano	148,5	2,4
Diclorometano	1302,3	21,4
acetato de etila	760,01	12,5
<i>n</i> -butanol	279,6	4,5

4.1.1.3-Cromatografia em Coluna (CC) e subfrações

Cada uma das tabelas (Tabelas 2, 3 e Tab. 4) a seguir apresenta os resultados da separação realizada em cromatografia em coluna, com a composição dos solventes onde foram eluídas para gerar as respectivas subfrações, as massas obtidas em cada uma delas e seus rendimentos.

Tabela 2 - Sequência de eluentes para a fração de diclorometano das folhas de *Guadua angustifolia* var. bicolor com as massas obtidas em cada etapa com seus respectivos rendimentos.

Subfrações de diclorometano	Eluentes utilizados	Massa (mg)	Rendimento (%)
DiA	CHCl ₃ :hexano (50%, v/v)	9,8	1,96
DiB	CHCl ₃	8,6	1,72
DiC	CHCl ₃ :metanol (95%, v/v)	25,4	5,0
DiD	CHCl ₃ :metanol (90%, v/v)	15,3	3,06
DiE	CHCl ₃ :metanol (80%, v/v)	20,9	4,18
DiF	CHCl ₃ :metanol (70%, v/v)	25,6	5,12
DiG	CHCl ₃ :metanol (50%, v/v)	38,3	7,66
DiH	Metanol	24,6	4,93
DiI	metanol:H ₂ O (50%, v/v)	25,9	5,18

Tabela 3 - Sequência de eluentes para a fração de acetato de etila das folhas de *Guadua angustifolia* var. *bicolor* com as massas obtidas em cada etapa com seus respectivos rendimentos.

Subfrações de acetato de etila	Eluentes utilizados	Massa (mg)	Rendimento (%)
AcA	CHCl ₃ :acetato de etila (50%, v/v)	18,1	3,71
AcB	Acetato de etila	2,6	0,53
AcC	Acetato de etila:metanol (95%, v/v)	7,1	1,45
AcD	Acetato de etila:metanol (90%, v/v)	6,4	1,31
AcE	Acetato de etila:metanol (80%, v/v)	10,1	2,07
AcF	Acetato de etila:metanol (70%, v/v)	23,8	4,88
AcG	Acetato de etila:metanol (50%, v/v)	37	7,59
AcH	Metanol	196,7	40,39
AcI	metanol:H ₂ O (50%, v/v)	232,6	47,76

Tabela 4 - Sequência de eluentes utilizados para a fração de *n*-butanol das folhas de *Guadua angustifolia* var. *bicolor* com as massas obtidas em cada etapa com seus respectivos rendimentos.

Subfrações de <i>n</i> -butanol	Eluentes utilizados	Massa (mg)	Rendimento (%)
nButA	Clorofórmio	10,4	3,71
nButB	Clorofórmio:metanol (90%, v/v)	61,2	21,88
nButC	Clorofórmio:metanol (90%, v/v)	59,4	21,24
nButD	Clorofórmio:metanol (70%, v/v)	21	7,51
nButE	Clorofórmio:metanol (50%, v/v)	13,9	4,97
nButF	Clorofórmio:metanol (30%, v/v)	17,1	6,11
nButG	Clorofórmio:metanol (10%, v/v)	9,4	3,36
nButH	Metanol	5,6	2
nButI	metanol:H ₂ O (99%, v/v)	5,2	1,86
nButJ	metanol:H ₂ O (95%, v/v)	8,8	3,15
nButK	metanol:H ₂ O (90%, v/v)	15	5,36

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que os eluentes utilizados no processo foram efetivos na remoção de uma grande parte do material presente nas frações diclorometano e *n*-butanol da coluna cromatográfica. O menor rendimento observado na fração de acetato de etila pode ser atribuído à provável retenção de dos compostos mais polares da fração na coluna, possivelmente espécies de flavonoides.

Ao observar os rendimentos das subfrações de diclorometano (Tab. 2) e acetato de etila (Tab. 3), notou-se que suas subfrações H apresentaram o maior rendimento, indicando uma maior quantidade de compostos mais polares, provavelmente compostos fenólicos e flavonoides poli-hidroxilados, devido à sua maior interação com a fase estacionária. Por outro lado, as subfrações *n*But B e C obtiveram maior rendimento, 21,88% e 21,24%, respectivamente, sugerindo um menor teor de glicosilação já que estas eluíram da coluna com uma das misturas de solvente menos polares.

4.2-Atividade biológica

4.2.1-Ensaio de Tirosinase

Foram feitos ensaios preliminares com o extrato bruto e as frações de diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol, sendo que os resultados estão expressos na Tabela 5. O extrato bruto não demonstrou alta atividade inibitória se comparada à *G. angustifolia* var. *angustifolia*, onde o extrato à 1 mg/mL apresentou 28,98% de inibição (DE OLIVEIRA, 2019). A fração *n*-butanol foi aquela com melhor resultado entre a relação concentração x inibição em comparação com as demais, assim como em *G. angustifolia* var. *angustifolia*, com 35,04% de inibição (DE OLIVEIRA, 2019).

Tabela 5 - Ensaio preliminar de atividade anti-tirosinase com o extrato bruto e frações de diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol derivadas de folhas das de *Guadua angustifolia* var. bicolor.

Fração	Concentração na placa ($\mu\text{g/mL}$)	Inibição de tirosinase (%)
Extrato	700	12,86
Diclorometano	400	16,46
Acetato de Etila	400	5,56
<i>n</i> -Butanol	400	24,06

As subfrações obtidas com a cromatografia em coluna com rendimentos adequados para os ensaios foram selecionadas para o teste de atividade anti-tirosinase (Tabela 6). Os melhores resultados foram obtidos para as sub-frações: *n*-butanol B e C, diclorometano C, D, E e F. Com estas amostras, foi observada uma inibição razoavelmente alta com concentrações menores.

Tabela 6 - Resultados dos testes preliminares de atividade anti-tirosinase com as subfrações selecionadas de diclorometano e *n*-butanol das folhas de *Guadua angustifolia* var. bicolor.

Sub-fração	Concentração na placa ($\mu\text{g/mL}$)	Inibição (%)
DiC	262,5	40,66
DiD	273,5	37,14
DiE	225	39,78
DiF	225	33,27
nButB	375	46,47
nButC	262,5	35,38
nButD	400	29,92

4.2.2-Ensaio com DPPH

O extrato bruto e a fração de *n*-butanol demonstraram bons resultados em termos de atividade antioxidante (Tabela 7), quando comparados com *G. angustifolia* var. *angustifolia* (DE OLIVEIRA, 2019), cujos respectivos IC_{50} foram $360,60 \mu\text{g/mL}$ e $321 \mu\text{g/mL}$. No entanto, é importante observar que *G. chacoensis* (NUNES, 2020) apresentou um potencial ainda maior na neutralização do radical DPPH, tanto no extrato bruto quanto nas frações analisadas, respectivamente, $92,9 \mu\text{g/mL}$, $124 \mu\text{g/mL}$, $75,1 \mu\text{g/mL}$ e $67,5 \mu\text{g/mL}$.

Tabela 7- Testes de sequestro do radical DPPH realizados com o extrato bruto e frações de diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol das folhas de *Guadua angustifolia* var. *bicolor*

Frações	IC ₅₀ (µg/mL)
Extrato	163,55±5,2
Diclorometano	482,14±33,7
Acetato de Etila	437,48±28,4
<i>n</i> -Butanol	102,95±10,9

As mesmas subfrações testadas para a atividade anti-tirosinase foram submetidas também ao de atividade antioxidante (Tabela 8). Aquelas com melhores resultados foram: Diclorometano D, E, F, G e *n*-butanol B, C, D. No processo de fracionamento, observou-se uma redução da atividade na fração de *n*-butanol, enquanto que na fração de diclorometano, houve frações em que a atividade se concentrou.

Tabela 8- Testes de sequestro do radical DPPH realizados com as sub-frações de diclorometano e *n*-butanol das folhas de *Guadua angustifolia* var. *bicolor*.

Sub-fração	Concentração na placa (µg/mL)	Inibição (%)
DiC	650	70,62
DiD	675	88,625
DiE	387,5	74,58
DiF	550	76,08
nButB	237,64	50
nButC	400	50
nButD	316,5	50

4.3- Análise de compostos fenólicos e flavonoides

4.3.1-Frações e subfrações

Nas frações de folhas da variedade *G. angustifolia* var. *bicolor*, é notória a presença de compostos fenólicos em todas as amostras, com destaque para a fração *n*-butanólica (Tabela 9), o que é um indicativo da alta presença de espécies químicas poli-hidroxiladas e glicosadas. Quanto aos flavonoides, constatou-se que todas as frações exibiram valores semelhantes (Tab.9). Em comparação com um estudo anterior em *G. chacoensis* (NUNES, 2020), observa-se que o teor de fenólicos da mesma é significativamente inferior tanto no extrato como nas demais frações, apresentando, respectivamente, valores de $21,39 \pm 4,17$, $25,98 \pm 3,44$, $17,59 \pm 3,42$ e $48,54 \pm 5,23$ g de EQ/mg. Entretanto, é importante ressaltar que os níveis de fenólicos se assemelham aos relatados para *G. angustifolia* var. *angustifolia* (DE OLIVEIRA, 2019), enquanto as concentrações de flavonoides se mostraram superiores aos encontrados nessas duas espécies.

Tabela 9 - Determinação de compostos fenólicos e flavonóides no extrato e nas frações de diclorometano, acetato de etila, e *n*-butanol das folhas de *G. angustifolia* var. bicolor, expressos, respectivamente, em microgramas equivalentes de ácido gálico por miligrama de amostra (μg EAG/mg) e microgramas equivalentes de quercetina por miligrama de amostra (μg EQ/mg)

Fração	Fenólicos totais nas folhas (μg de EAG/mg)	Flavonóides totais nas folhas (μg de EQ/mg)
Extrato	21,39 \pm 4,17	0,86 \pm 0,12
Diclorometano	25,98 \pm 3,44	4,80 \pm 0,87
Acetato de etila	17,59 \pm 3,42	5,50 \pm 0,73
<i>n</i> -butanol	48,54 \pm 5,23	4,66 \pm 0,45

Para melhor compreensão das características químicas das subfrações que apresentaram melhores resultados nas atividades biológicas, os teores totais de fenólicos e flavonoides foram determinados. Os resultados das quantificações dessas classes químicas estão representados na Tabela 10. Vale ressaltar que DiC apresentou ausência de flavonóides em comparação com as demais subfrações, as quais exibiram valores próximos entre si. Pode-se observar uma correlação positiva entre o potencial antioxidante das sub-frações e o teor de compostos fenólicos determinado.

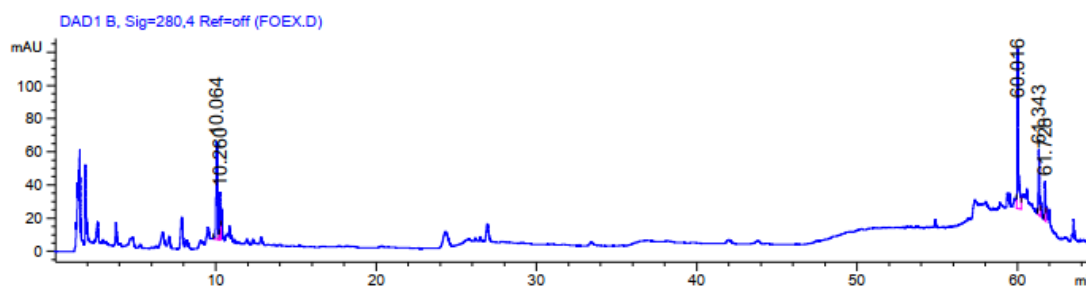
Tabela 10 - Determinação de compostos fenólicos e flavonóides nas subfrações de diclorometano (DiC, DiD, DiE), acetato de etila (AcG, AcH e AcI), e *n*-butanol (nButB, nButC, nButD) das folhas de *G. angustifolia* var. bicolor, expressos, respectivamente, microgramas equivalentes de ácido gálico por miligrama de amostra (μg EAG/mg) e microgramas equivalentes de quercetina por miligrama de amostra (μg EQ/mg)

Sub-fração	Fenólicos totais nas sub frações de folhas (μg de EAG/mg)	Flavonóides totais nas sub frações de folhas (μg de EQ/mg)
AcG	19,78 \pm 2,85	2,60 \pm 0,40
AcH	6,84 \pm 1,33	1,77 \pm 0,23
AcI	8,80 \pm 1,10	2,82 \pm 0,19
DiC	34,50 \pm 4,72	0,01 \pm 0,12
DiD	45,76 \pm 8,82	4,12 \pm 0,80
DiE	34,99 \pm 4,82	3,26 \pm 0,65
DiF	9,38 \pm 0,17	1,85 \pm 0,36
nButB	44,52 \pm 6,67	4,46 \pm 0,66
nButC	15,54 \pm 2,029	1,28 \pm 0,14
nButD	25,42 \pm 4,91	4,05 \pm 0,79

4.4- 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 (STALIKAS, 2009). A Figura 3 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 de substâncias conhecidas 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* (DE OLIVEIRA, 2019) e *G. chacoensis* (NUNES,2020) utilizando o mesmo método.

Figura 3- HPLC-DAD realizado com o extrato bruto de folhas de *G. angustifolia* var *bicolor*

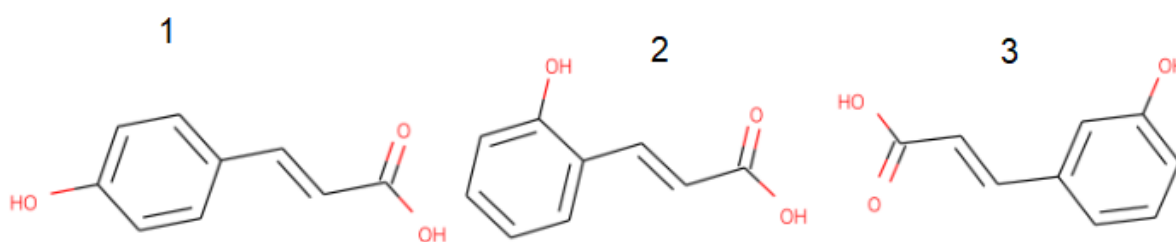


4.5-Análise por CLAE-EM com dados obtidos no GPNS

A fim de correlacionar as atividades biológicas apresentadas em 4.2 com suas composições químicas, foram analisadas as subfrações: DiC, DiD, DiE, DiF, DiG, nButB, nButC e nButD. A nButB foi um caso particular, pois a relação sinal/ruído na análise não permitiu a análise de sua composição. As subfrações AcG, AcH, AcI foram incluídas nas análises por CLAE-EM, a fim de enriquecer o estudo sobre o perfil químico da espécie vegetal, estas foram escolhidas por terem apresentado o maior rendimento dentre as sub-frações de acetato de etila.

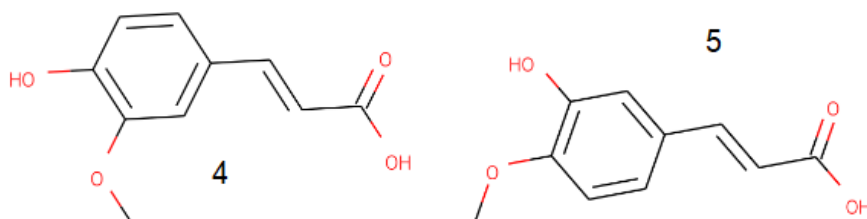
Ao todo, foram possíveis anotar 9 compostos fenólicos, 12 flavonoides, e 3 ácidos graxos e seus derivados. A seguir, foram discutidos os resultados apresentados pela análise gerada no GNPS, cujas estruturas estão ilustradas e enumeradas de 1 a 26.

A seguir, 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.

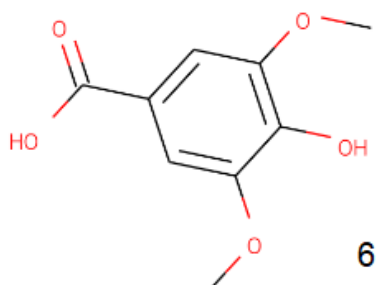


A estrutura de menor massa molar identificada pelo GNPS, presente em todas as subfrações entre 14,35-1,55 minutos de eluição, foi $C_9H_8O_3$ de massa molar 164,0474 Da. Sendo possivelmente ácido *p*-cumárico (1), *o*-cumárico (2) ou *m*-cumárico (3), sob a forma de íon pseudomolecular $163,0394\ m/z\ [M-H]^-$, no MS^2 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 trataria muito provavelmente, de ácido *p*-cumárico, uma vez que o mesmo foi relatado como a espécie química mais abundante em outros bambus do mesmo gênero, como *G. angustifolia* var. *angustifolia* (DE OLIVEIRA, 2019) e *G. chacoensis* (NUNES, 2020), além de também estar de acordo com o que observado pela análise em CLAE-DAD (4.4). O ácido *p*-cumárico é um fenilpropanóide derivado da desaminação das moléculas de *L*-fenilalanina e/ou *L*-tirosina, o qual está diretamente envolvido com a biossíntese de metabólitos secundários como antraquinonas, estilbenos, lignanas, cumarinas e flavonóides. Além disso, o ácido *p*-cumárico pode ser encontrado sob formas de ésteres com hidróxi-ácidos ou açúcares, e amidas. A presença de ácido *p*-cumárico

já foi relatada em diversas espécies de bambu e o composto apresentou atividade anti-tirosinase isoladamente (ILHAEM et al., 2008).

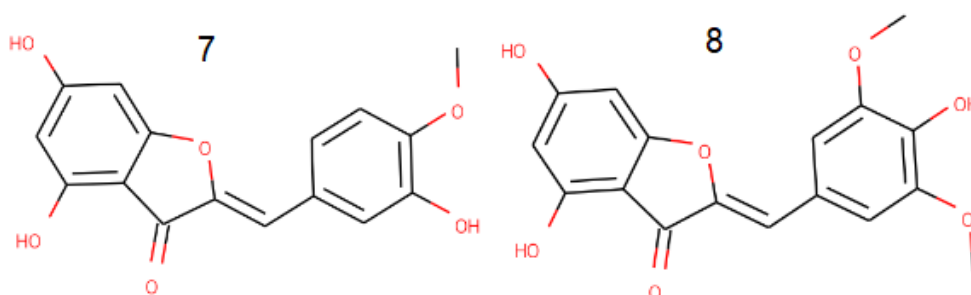


Bastante semelhantes ao ácido *p*-cumárico, presentes em DiC e DiD no tempo de retenção 17,0 à 17,6 minutos, foram propostos os isômeros (C₁₀H₁₀O₅) ácido ferúlico (4) e isoferúlico (5). Ambos com massa molar 194,0577 Da e íon pseudomolecular 193,0497 *m/z* [M-H]⁻, com apenas um único fragmento em 134.03 *m/z* compatível com [(M-H)-CH₃-CO₂]⁻. Comparando os dois isômeros em questão pelo método de CLAE-EM em modo negativo, houve uma clara diferença entre os dois espectros, além dos fragmentos formados serem distintos dos resultados aqui obtidos (KUHNER et al., 2010). Contudo, de acordo com SINOSAKI et al. (2020), existe a possibilidade de se tratar de ácido ferúlico, pois o autor relaciona a energia (eV) aplicada no sistema com a intensidade dos diferentes fragmentos obtidos, mostrando que para este isômero pode haver apenas a detecção do fragmento em 134 *m/z*. Assim como o ácido *p*-cumárico, o ácido ferúlico é frequentemente encontrado em bambus tropicais, além disso, possui atividade antioxidante e antihipertensiva relatada nos bambus *Phyllostachys edulis* (Carrière) J.Houz. (KWEON et. al, 2001) e *P. nigra* (Lodd. ex Lindl.) Munro em sinergismo com outras substâncias (CHOI et. al, 2018).



Outro composto fenólico, também identificado em DiC e DiD, foi o ácido siríngico (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

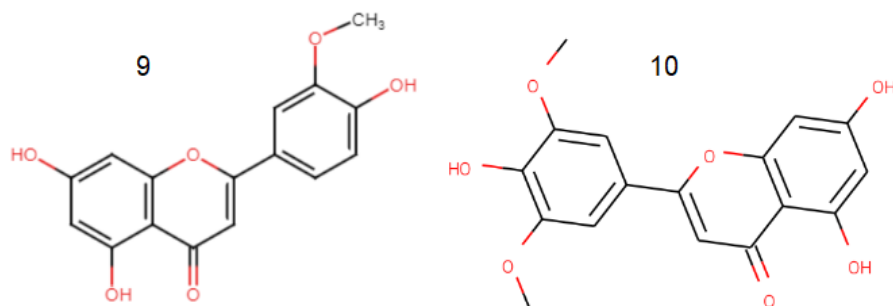
detectado entre 12,8 e 13,9 minutos, constatando dois fragmentos de MS² 123,00 m/z [(M-H)-CH₃-CH₃-CO₂]⁻ e 95,01 m/z [123-CO]⁻. Na fragmentação do ácido siríngico em modo negativo, utilizando fonte de ionização APCI (atmospheric pressure chemical ionization), é possível a formação dos íons detectados, contudo ocorrem juntamente com os fragmentos em 182 m/z, 121 m/z e 153 m/z (BIESAGA et al., 2009). Desse modo, os resultados obtidos não permitem confirmar a identidade desta substância. Por outro lado, ao analisar os espectros em modo negativo de outros ácidos fenólicos, é possível notar que a maioria deles possui fragmentos próximos de 123 m/z e 95 m/z (BIESAGA et al., 2009). Assim, o composto detectado deve pertencer a essa classe de compostos.



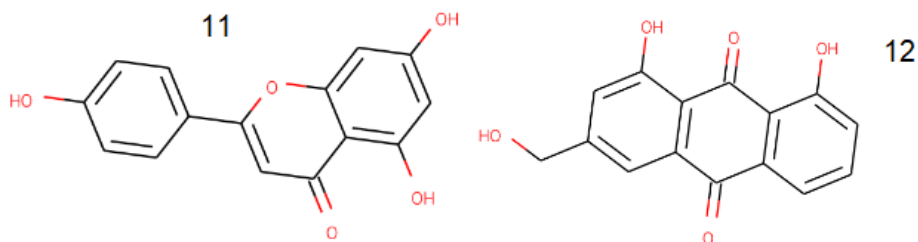
Nas subfrações DiC e DiD, para os tempos de retenção entre 26,2 e 27,0 minutos, o GNPS sugeriu a estrutura de duas substâncias para as quais não há relatos de sua presença em bambus ou mesmo em Poaceae, ambas pertencentes à classe das auronas. Essa classe de compostos está presente majoritariamente em eudicotiledôneas das famílias Asteraceae, Cucurbitaceae, Elaeagnaceae, Fabaceae, Moraceae, Rosaceae e Phyllanthaceae (YANG et al., 2023), mas também ocorrem em plantas inferiores como Aspleniaceae, Marchantiaceae, Conocephalaceae e Carrpaceae (IWASHINA, 2000). Pertencentes à subclasse de flavonóides denominadas auronas, são pigmentos que conferem uma coloração amarela brilhante às pétalas e desempenham funções essenciais, especialmente no que diz respeito à atração de polinizadores (YANG et al., 2023).

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, apresentando fragmentos 284,03 m/z [(M-H)-CH₃]⁻ e 256,03 m/z [284-CO]⁻, contudo não foram encontrados estudos do MS² desta

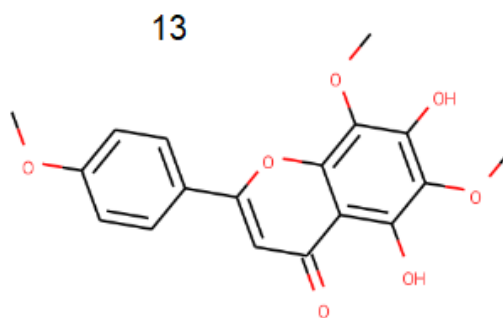
substância em modo negativo, apenas em modo positivo (WANG et al. 2022). A segunda sugestão seria a 4,6-di-hidroxi-3',5'-dimetóxi-4'-hidroxi aurona (8), com íon pseudomolecular $329,0653 \text{ m/z}$ $[\text{M-H}]^-$, fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$ e massa molar $330,0733 \text{ Da}$, apresentando fragmentos em $299,01 \text{ m/z}$ $[(\text{M-H})-\text{CH}_3-\text{CH}_3]^-$ e $271,02 \text{ m/z}$ $[\text{299-CO}]^-$. Para este composto foram encontrados dois espectros para esta substância no MassBank of North America (MoNA, 2023 A e B), os quais foram semelhantes ao espectro obtido. No entanto, por não haver relatos das mesmas em Poaceae, é necessário a confirmação por meio CLAE-EM com um padrão da substância ou o isolamento e identificação da mesma.



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 $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$ e $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$ com o mesmo padrão de fragmentação observados para os íons em $299,0549 \text{ m/z}$ e $329,0653 \text{ m/z}$, podendo se tratar respectivamente de crisoeriol (9) (FRIŠČIĆ et al., 2016) e tricina (10) (KANG et al., 2006), sendo ambos flavonóides já descritos em bambus asiáticos (GONG et. al, 2015). Crisoeriol é relatado na literatura com atividade biológica diversificada, dentre elas potencial anticâncer, antiinflamatório, antibacteriano, antifúngico, anti-osteoporose, anti-inseticida, antioxidante e neuroprotetor (ABOULAGHRAS et al., 2022). A tricina, além de possuir atividade antioxidante, também apresenta propriedades antifúngicas e herbicidas, atuando contra infecções nas plantas (ZHOU AND IBRAHIM, 2009). Desse modo, para atribuição inequívoca dessas estruturas serão necessários estudos complementares. Contudo, o isolamento prévio desses flavonóides em espécies de bambu confere uma maior probabilidade para as últimas estruturas.

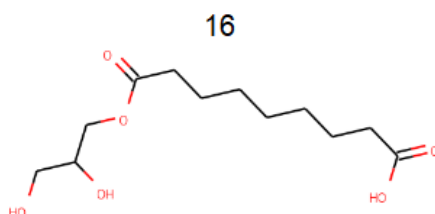


Neste contexto, a presença de um outro flavonóide ou uma antraquinona foi indicada nas subfrações DiC, DiD e DiE. No tempo de retenção entre 25,6-26,2 minutos ocorreu o fragmento 269,0446 m/z , o GNPS indicou a possibilidade de tratar de duas moléculas, apigenina (11) ou alo-emodina (12), ambas de fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_3$ e massa molar 270,0526 Da. O MS^2 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 MS^2 da alo-emodina indicou uma inconsistência entre a fragmentação observada e àquela relatada na literatura (FENGGUO XU et al., 2008; QUIN YU et al., 2009; ZHANG et al., 2013), que ao comparar os dados da literatura entre si, há apenas a concordância do pico de 268 m/z , não sendo possível determinar se esta seria a substância em análise. Contudo, ao observar o mecanismo de fragmentação apresentado para flavonas (FRABE et al 2001), foi possível estabelecer uma relação com o resultado obtido, levando a crer que o composto alvo se trata, de fato, da apigenina, sendo as fragmentações observadas derivadas do mecanismo de retro Diels-Alder (RDA) para a molécula proposta (FRABE et al 2001). Ademais, a apigenina é a genina mais comum encontrada nos flavonóides isolados de diversas espécies de bambu (KIM et al, 2009), o que aumenta a possibilidade de que se trate desta molécula (11).

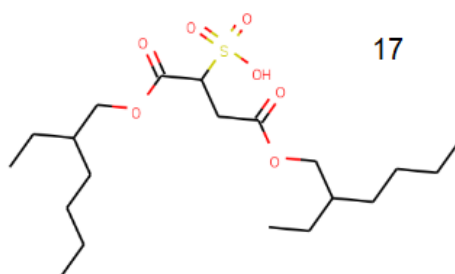


Além da apigenina, também foi proposta a estrutura de outro flavonoide no tempo de retenção 33,0-33,6 minutos a partir do íon pseudomolecular 343,0806 m/z $[M-H]^-$, a nevadensina (13), de fórmula molecular $C_{18}H_{16}O_7$ e massa molar 344,088 Da. Os fragmentos 313,03 m/z $[(M-H)-CH_3-CH_3]^-$, 285,03 m/z $[313-CO]^-$, 241,04 m/z

al., 2022). O outro composto detectado nessas subfrações foi o de íon pseudomolecular 271,2277 m/z , referenciado como ácido 16-hidroxi palmítico (ácido junípero) (15) ($C_{16}H_{32}O_3$), não sendo encontrados na literatura os registros de seu padrão de 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 um produto de descarboxilação (FARHAT et al., 2011)



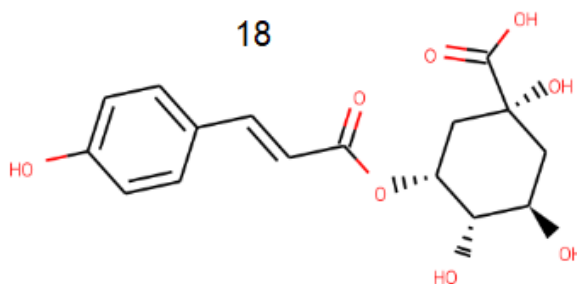
Uma forma esterificada de ácido graxo foi detectada apenas nas subfrações DiC e DiD, e menor quantidade em DiE. No tempo de retenção 18-18,5 minutos, com fragmento 261,1337 m/z foi proposto o ácido 9-(2,3-dihidroxiopropoxi)-9-oxononanoico (16) de fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_6$ e massa molar 272,2357 Da, sua fragmentação apresentou picos em 235,02 m/z , 187,09 m/z , 125,10 m/z e 97,06 m/z . É relevante notar que este composto é uma forma esterificada do ácido azelaico com glicerol, o que resulta em semelhanças nos fragmentos, como evidenciado pelos valores de 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 composto (XU et al., 2022).



O composto com tempo de retenção de 61,8-62,2 minutos, presente na subfração DiD, 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 os dados previamente reportados na literatura (FLURER et al., 2010). Apesar de ser relatado como um produto natural, vale ressaltar que o estudo foi realizado em frutos do mar. Este composto é descrito

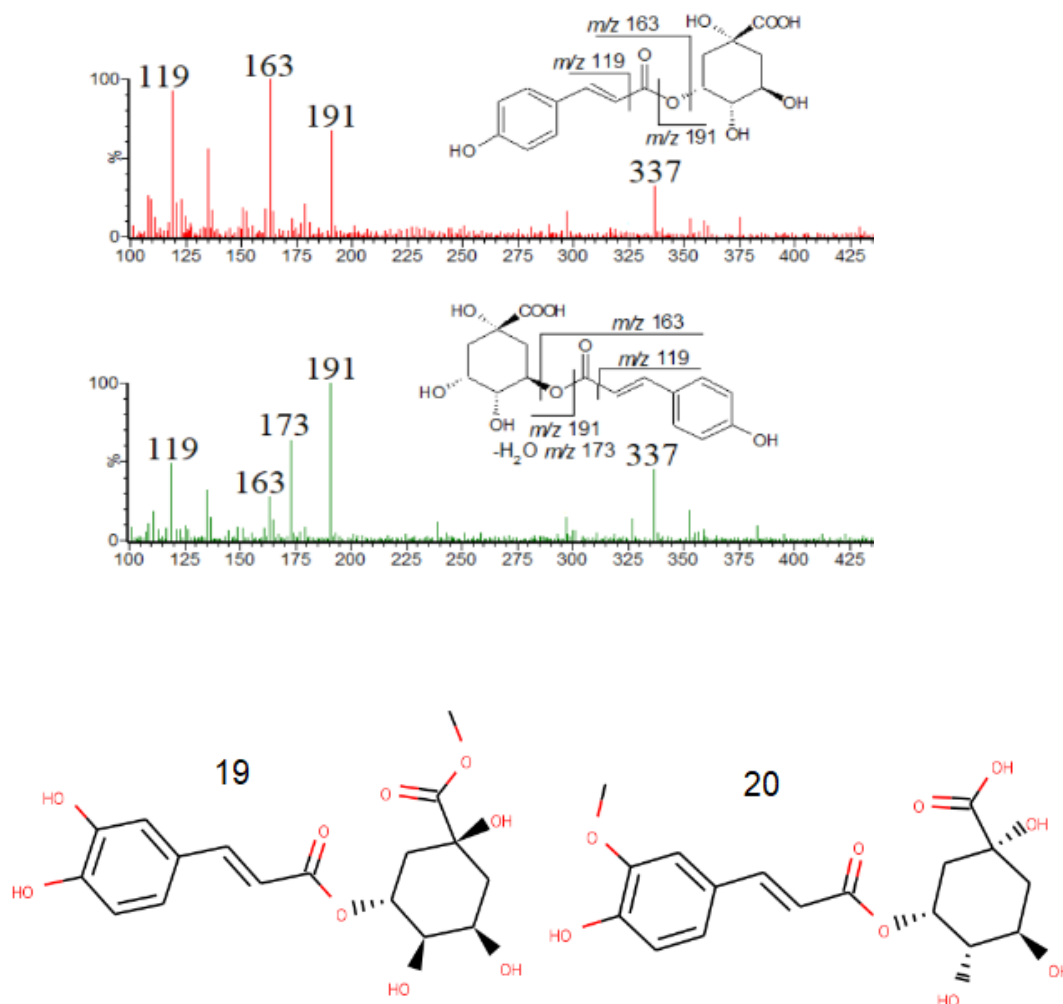
como um componente de pesticidas para plantas, indicando que em nosso caso não se trata de um produto natural (LI et al., 2023; AZIZI, 2023), mas um artefato, uma vez que as amostras foram coletadas em campos experimentais agrícolas.

Como comentado anteriormente, compostos fenólicos e flavonóides também podem se apresentar sob a forma conjugada com glicosídeos. A ocorrência dessas substâncias em ácidos fenólicos de bambus é maior em sua forma esterificada, enquanto os flavonoides são glicosilados por meio de ligações C-C ou C-O. Nas subfrações AcG, AcH, Acl e nButD foram encontradas algumas dessas estruturas.

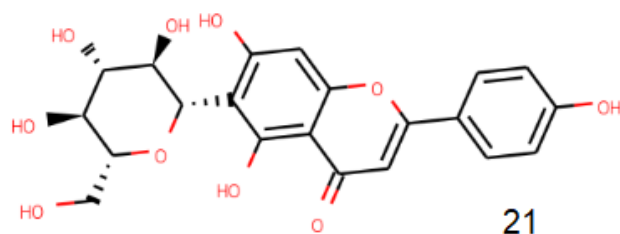


Um desses derivados esterificados foi um derivado do ácido *p*-cumárico, anteriormente abordado nesta análise, conjugado com o ácido quínico, denominado ácido cumaroilquínico (18) (C₁₆H₁₈O₈) de massa molar 338,1009. Sendo detectado na subfração nButC e AcH entre 13,0 e 14,0 minutos à partir do íon pseudomolecular 337,0929 *m/z*. Dentre os íons obtidos no MS², dois, 119,05 *m/z* e 93,03 *m/z*, correspondiam à fragmentação do ácido *p*-cumárico, e outros dois, 191,06 *m/z* e 173,04 *m/z*, seriam referentes à fragmentação de outras partes da molécula. Na Figura 4 apresentamos o mecanismo de fragmentação dessa substância (SZYMBORSKA et al., 2022), em concordância com os resultados obtidos.

Figura 4- Fragmentação em modo negativo do ácido cumaroilquínico proposto por SZYMBORSKA et al.,2022.

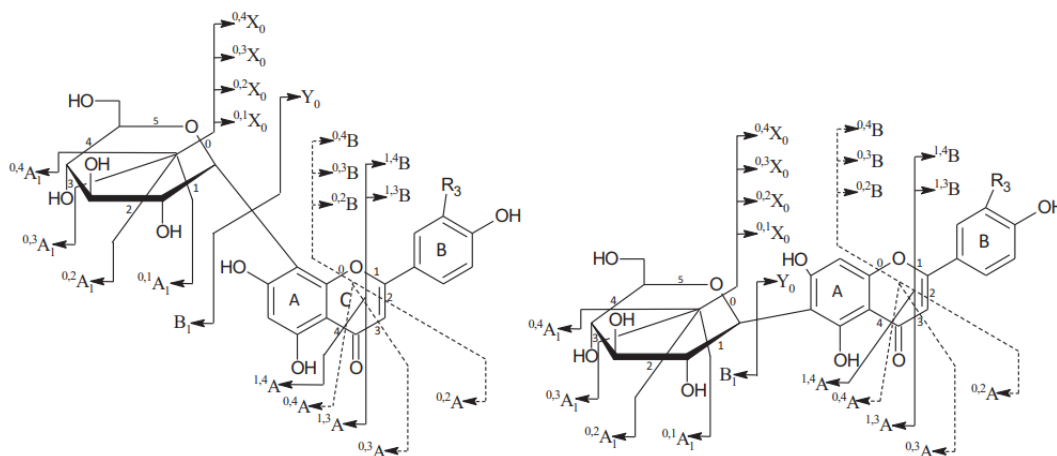


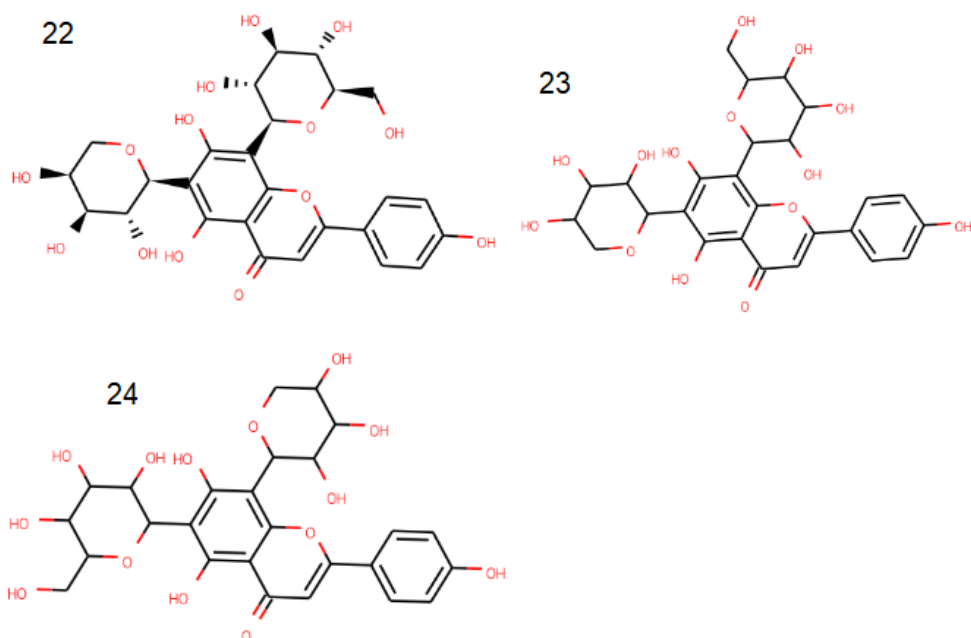
O íon pseudo molecular 367,1027 m/z também foi sugerido pelo GNPS como um possível composto fenólico esterificado. Neste caso, foram propostos dois isômeros de fórmula molecular $C_{17}H_{20}O_9$, sendo clorogenato de metila (19) e/ou ácido 3'-metoxi-clorogénico (20), ambos de massa molar 368,1107 Da. 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 MS^2 em 193,04 m/z , 173,04 m/z , 134,03 m/z e 93,03 m/z . Segundo a literatura consultada (SZYMBORSKA et al., 2022), os padrões observados não se tratam de nenhum dos dois compostos, provavelmente se tratando de um outro isômero. Vale ressaltar que fenóis glicosados, como os apresentados, são os compostos abundantes em bambus de origem sul-americana (WRÓBLEWSKA, 2019), além disso possuem relatada atividade antioxidante (DANGLES, 2012).



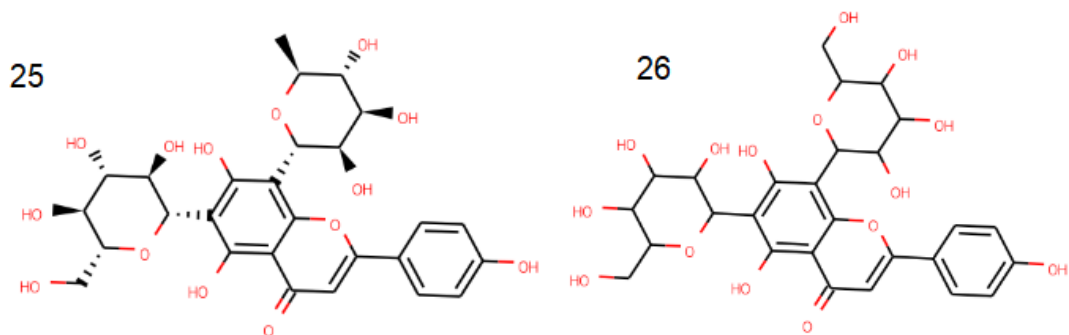
Seis flavonóides glicosilados também foram sugeridos pelo GNPS. Um deles sendo isovitexina (21) ($C_{21}H_{20}O_{10}$) no tempo de retenção entre 15,6-15,9 minutos, presente em Acl e com íon pseudo molecular $431,0904 m/z [M-H]^-$, com fragmentos $341,06 m/z$, $323,05 m/z$, $311,05 m/z$ e $283,06 m/z$, estando de acordo com os resultados obtidos por Guo et al. (2013). Seguindo o esquema de fragmentação da Figura 5, os íons em MS^2 citados anteriormente correspondem respectivamente a $[^{0,3}X_0-H]^-$, $[^{0,3}X_0-H-H_2O]^-$, $[^{0,2}X_0-H]^-$ e $[^{0,1}X_0-H]^-+2H$.

Figura 5- possíveis fragmentações de flavonoides C-glicosilados, adaptado de de GUO et al. (2013).





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* (Wang et al., 2020). 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 Viceninina-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 compostos (RAFFAELLI et al., 1997), 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 , sendo estes dados são semelhantes aos reportados na literatura (KOIKE, 2015), e DE ATHAYDE (2019) sugere mecanismos de fragmentação para o mesmo. Enquanto que em Ach aos 12,4 minutos, a apigenina 6,8-digalactosídeo (26) ($C_{27}H_{30}O_{15}$) 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.

5. 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 compostos fenólicos em geral se mostraram mais abundantes na fração *n*-butanol de acordo com os resultados obtidos com o reagente de Folin-Ciocalteu, na qual apenas formas glicosiladas dessas substâncias foram identificadas nessa fração (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. Assim sendo, é possível concluir que essa quantidade elevada de compostos fenólicos está diretamente atrelada à atividade antioxidante da fração ao compará-la com as demais.

Os fenóis não glicosados (ácido ferúlico, isoferúlico, ácido siríngico e nevadensina) foram encontrados na fração diclorometano, principalmente nas subfrações DiC, DiD e DiE, que apresentaram bons resultados no que diz respeito ao sequestro do radical DPPH.

As frações mostraram quantidades próximas de flavonoides, sendo as geninas presentes na fração diclorometano, enquanto os glicosados foram detectados nas frações acetato de etila e *n*-butanol. As subfrações apresentaram diferentes quantidades de flavonóides, no entanto, essas quantidades parecem não haver relação com a atividade biológica delas, uma vez que DiC não possui flavonoides e apresenta atividade biológica significativa.

Em relação a atividade inibidora da tirosinase, muitas das substâncias apresentadas neste trabalho são reportadas na literatura como promotoras dessa ação, logo, não é possível associar a apenas uma delas esse fenômeno, sendo que efeitos aditivos positivos ou negativos podem ocorrer, afetando seu resultado. Contudo, o ácido *p*-cumárico, muito abundante na espécie em estudo, pode contribuir para grande parte dos valores, uma vez que estudos apontam sua atividade de maneira isolada.

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.

6.Referências

ABOULAGHRAS, S., et al. "Health Benefits and Pharmacological Aspects of Chrysoeriol." **Pharmaceuticals**, vol. 15, no. 8, 7 Aug. 2022, p. 973, Doi: <https://doi.org/10.3390/ph15080973>.

AFIFI, F.; SHERVINGTON, A.; DARWISH, R. M. Phytochemical and biological evaluation of *Arum palaestinum*. Part 1: Flavone C-glycosides. **Acta Technologiae et Legis Medicamenti**, v. 8, p. 105-11, 1997.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – **RDC Nº 21**, DE 25 DE ABRIL DE 2014. Acessado em: Acesso em: 16 out. 2023. Doi: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0021_25_04_2014.pdf

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - **RDC N° 152**, DE 26 DE ABRIL DE 2017. Acessado em: 16 out. 2023. Doi:

https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2017/rdc0152_26_04_2017.pdf

ARON, A. T., et al. “Reproducible Molecular Networking of Untargeted Mass Spectrometry Data Using GNPS.” **Nature Protocols**, vol. 15, no. 6, pp. 1954–1991, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0317-5>.

AZIZI, K. “Effect of Wood Vinegar, Chloro Carboxylic Acid and Sodium Dioctyl Sulfosuccinate against *Pratylenchoides Ritteri* on Chickpea.” **Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)**, vol. 45, no. 4, 20 Feb. 2023, pp. 77–82, plantprotection.scu.ac.ir/article_17998_en.html, Doi: <https://doi.org/10.22055/ppr.2023.17998>.

BIESAGA, M., & PYRZYNSKA, K. (2009). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry studies of the phenolic compounds in honey. **Journal of Chromatography A**, 1216(38), 6620–6626. Doi: [doi:10.1016/j.chroma.2009.07.066](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.07.066)

CHOI, M.-H. et al. (2018). Antioxidative and anti-melanogenic activities of stems (*Phyllostachys nigra* variety henosis) via PKA/CREB-mediated MITF downregulation in B16F10 melanoma cells. **International Journal of Molecular Sciences**. Vol. 19. No. 2. p. 409. doi: [10.3390/ijms19020409](https://doi.org/10.3390/ijms19020409)

DANGLES, Olivier. “Antioxidant Activity of Plant Phenols: Chemical Mechanisms and Biological Significance.” **Current Organic Chemistry**, vol. 16, no. 6, 2012, pp. 692–714, www.eurekaselect.com/article/42038, Doi: <https://doi.org/10.2174/138527212799957995>.

DE ATHAYDE, A. E.. **Arnica no Brasil: do perfil químico a morfoanatomia, uma comparação entre as espécies**. 2019 Tese (Mestrado em Farmácia) Universidade Federal de Santa Catarina. Doi: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/211605>

DE OLIVEIRA D. C. S. **Composição química e atividades biológicas de extratos de *Guadua angustifolia* Kunth**. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

FABRE N., RUSTAN I., DE HOFFMAN E., QUETIN-LECLERCQ J. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal American Society of Mass Spectrometry**;12(6):707-15, 2001. Doi: doi: 10.1016/S1044-0305(01)00226-4.

FARHAT, Y., ET AL. Mass Spectrometric Characterization of Isomeric Terpenoid Acids from the Oxidation of α -Pinene, β -Pinene, D-Limonene, and Δ^3 -Carene in Fine Forest Aerosol. **Journal Mass of spectrometry**, Vol. 46, no. 4, pp. 425–442, 2011. Doi: <https://doi.org/10.1002/jms.1911>.

FENGGUO XU, YING LIU, ZUNJIAN ZHANG, RUI SONG, HAIJUAN DONG, YUAN TIAN, Rapid simultaneous quantification of five active constituents in rat plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry after oral administration of Da-Cheng-Qi decoction, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Volume 47, Issue 3, Pages 586-595, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.02.005>.

FLURER, R., BOYD, B., GAMBLE, B., GRATZ, S., MULLIGAN, K., BENNER, R., SAID, K., JESTER, E., BURROWS, D., DA SILVA, D., KRAHN, M., REICHERT, W., & YLITALO, G. (2010). **Determination of dioctylsulfosuccinate in select seafoods using a quechers extraction with liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry**. Doi: <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=d848b91d7193e9e69d2600a70f17841aa61142f5>

FRIŠČIĆ, M.; BUCAR, F.; HAZLER PILEPIĆ, K. LC-PDA-ESI-MSⁿ analysis of phenolic and iridoid compounds from *Globularia* spp. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 51, n. 12, p. 1211–1236, 2016.

GÓMEZ, J., et al. "Antioxidant, Gastroprotective, Cytotoxic Activities and UHPLC PDA-Q Orbitrap Mass Spectrometry Identification of Metabolites in *Baccharis Grisebachii* Decoction." **Molecules**, vol. 24, no. 6, p. 1085, 2019. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules24061085>.

GONG, J. et al. (2015). Functional components of bamboo shavings and bamboo leaf extracts and their antioxidant activities in vitro. **Journal of Medicinal Food**. Vol. 18. No. 4. pp. 453–459. doi: 10.1089/jmf.2014.3189

GROMBONE-GUARATINI M.T., FURLAN C.M., LOPES P.S., BARSALOBRA K.P., LEITE E SILVA V.R., MORENO P.R.H., Antioxidant and Photoprotective Properties of Neotropical Bamboo Species, In: EKIERT H.M., RAMAWAT K.G., ARORA J. (eds) **Plant Antioxidants and Health**. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham., 15 Apr. 2021

GUO, X., YUE, Y., TANG, F., WANG, J., YAO, X., & SUN, J. (2013). A comparison of C-glycosidic flavonoid isomers by electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry in negative and positive ion mode. **International Journal of Mass Spectrometry**, 333, 59–66. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2012.08.035>

HSIUNG, W. Prospects for bamboo development in the world. **The Journal of the American Bamboo Society**, v.8, v.1-2, p.168-178, 1991.

ILHAM, A. & VIMALA, S. & RASHIH, A. & SAHDAN, ROHANA & JAMALUDDIN, MUHAMMAD & JULIZA, M., Antioxidant and antityrosinase properties of Malaysian bamboo leaf extracts. **Journal of Tropical Forest Science**, 20, 123-131, 2018.

IWASHINA, T.. "The Structure and Distribution of the Flavonoids in Plants." **Journal of Plant Research**, vol. 113, no. 3, Sept. 2000, pp. 287–299, Doi: <https://doi.org/10.1007/pl00013940>.

JUNG-HEE HWANG & BYUNG MU LEE, Inhibitory Effects of Plant Extracts on Tyrosinase, L-DOPA Oxidation, and Melanin Synthesis, **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Part A, 70:5, 393-407, 2007.

KANG, J. et al. Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of sorghum wholegrains by LC-ESI-MSn. **Food Chemistry**, v. 211, p. 215–226, 2016.

KAZAZ, S., et al. “Plant Monounsaturated Fatty Acids: Diversity, Biosynthesis, Functions and Uses.” *Progress in Lipid Research*, vol. 85, Jan. 2022, p. 101138, Doi: <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101138>.

KIM, C. Y. et al. (2009). 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**. Vol. 52. No. 6. pp. 613–619. doi.org/10.3839/jksabc.2009.102

KOIKE, A. C. R.. **Compostos bioativos em flores comestíveis processadas por radiação**. 2015. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015. [doi:10.11606/T.85.2015.tde-17082015-102839](https://doi.org/10.11606/T.85.2015.tde-17082015-102839). Acesso em: 2023-10-13.

KUHNERT, NIKOLAI, ET AL. “How to Distinguish between Feruloyl Quinic Acids and Isoferuloyl Quinic Acids by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry.” **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, vol. 24, no. 11, pp. 1575–1582, 2010. Doi: <https://doi.org/10.1002/rcm.4537>.

KWEON, M.-H., HWANG, H.-J.; SUNG, H.-C. (2001). Identification and antioxidant activity of novel chlorogenic acid derivatives from bamboo (*Phyllostachys edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 49. No. 10. pp. 4646–4655. doi: [10.1021/jf010514x](https://doi.org/10.1021/jf010514x)

LI, Y., et al. "Effect of Adjuvants on Physicochemical Properties of Lime Sulfur on Flower/Paraffin and Application on Flower Thinning." **Frontiers in Plant Science**, vol. 14, 11 Sept. 2023, Doi: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10536241/](https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1257672), <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1257672>.

LIANG, C., et al. "Metabolism Profiling of Nevadensin in Vitro and in Vivo by UHPLC-Q-TOF-MS/MS." *Journal of Chromatography B*, vol. 1084, 1 May 2018, pp. 69–79, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.03.032>.

LONDOÑO, X. A decade of observations of a *Guadua angustifolia* plantation in Colombia. **The Journal of the American Bamboo Society**, v. 12, p. 37-43, 1998.

LONDOÑO, X. 2000. *Guadua*. 39: 58–62. In E. J. Judziewicz, R. J. Soreng, G. Davidse, P. M. Peterson, T. S. Filgueiras & F. O. Zuloaga (eds.) **Catalogue of New World Grasses** (Poaceae): I. Subfamilies Anomochlooideae, Bambusoideae, Ehrhartoideae, and Pharoideae, Contr. U.S. Natl. Herb.. Smithsonian Institution, Washington, D.C.

LU, B.; WU, X.; TIE, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y. Toxicology and safety of antioxidant of bamboo leaves. Part 1: Acute and subchronic toxicity studies on antioxidant of bamboo leaves. **Food and chemical toxicology**, v. 43, p. 783-792, 2005.

MONA - MassBank of North America 2023 A. Disponível em:

[<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/browse?query=exists\(compound.metadata.name:%27InChIKey%27%20and%20compound.metadata.value:%27LOVMOOUQHWMIHZ-RZNTYIFUSA-N%27\)>](https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/browse?query=exists(compound.metadata.name:%27InChIKey%27%20and%20compound.metadata.value:%27LOVMOOUQHWMIHZ-RZNTYIFUSA-N%27)) Acessado em: 5 out. 2023.

MONA - MassBank of North America 2023 B. Disponível em:

[<https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/browse?query=exists\(compound.metadata.name:%27InChIKey%27%20and%20compound.metadata.value:%27LOVMOOUQHWMIHZ-RZNTYIFUSA-N%27\)>](https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/browse?query=exists(compound.metadata.name:%27InChIKey%27%20and%20compound.metadata.value:%27LOVMOOUQHWMIHZ-RZNTYIFUSA-N%27)) Acessado em: 5 out. 2023.

MUKHERJEE, Pulok K. *et al.* Validation of medicinal herbs for anti-tyrosinase potential. **Journal of Herbal Medicine**, v.14, p.1-16. Doi:

<https://doi.org/10.1016/j.hermed.2018.09.002>

NUNES, F. A. **Composição química e atividades biológicas de extratos e frações de *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P.M. Peterson**. Dissertação (Mestrado em Química)- Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

QIN YU, JIN XIANG, WENFU TANG, MAOZHI LIANG, YONGPING QIN, FENG NAN, Simultaneous determination of the 10 major components of Da-Cheng-Qi decoction in dog plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry, **Journal of Chromatography B**, Volume 877, Pages 2025-2031, Issue 22, 2009.

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.05.030>

RAFFAELI, A., *et al.* "Mass Spectrometric Characterization of Flavonoids in Extracts from *Passiflora Incarnata*." **Journal of Chromatography A**, vol. 777, no. 1, pp. 223–231, 1997. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(97\)00260-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(97)00260-4).

REYMOND, C., *et al.* "Characterization of Liquid–Liquid Extraction Fractions from Lignocellulosic Biomass by High Performance Liquid Chromatography Hyphenated to Tandem High-Resolution Mass Spectrometry." **Journal of Chromatography A**, vol. 1610, p. 460569, 2020. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460569>.

RHO, HO SIK, *et al.* "Changes in Flavonoid Content and Tyrosinase Inhibitory Activity in Kenaf Leaf Extract after Far-Infrared Treatment." **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol. 20, no. 24, Dec. 2010, pp. 7534–7536, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.09.082>.

SEARLE, T., *et al.* "The Versatility of Azelaic Acid in Dermatology." **Journal of Dermatological Treatment**, 4 Aug. 2020, pp. 1–11, Doi: <https://doi.org/10.1080/09546634.2020.1800579>.

SINGHAL, P. *et al.* (2013). Bamboo Shoots: A Novel Source of Nutrition and

Medicine. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. Vol. 53. No. 5. pp. 517–534. doi: 10.1080/10408398.2010.531488.

SINOSAKI, N., et al. “Structural Study of Phenolic Acids by Triple Quadrupole Mass Spectrometry with Electrospray Ionization in Negative Mode and H/D Isotopic Exchange.” **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2020. Doi: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190197>.

SORENG, R. J., G. DAVIDSE, P. M. PETERSON, F. O. ZULOAGA, E. J. JUDZIEWICZ, T. S. FILGUEIRAS & O. MORRONE. 2003 and onwards. On-line taxonomic novelties and updates, distributional additions and corrections, and editorial changes since the four published volumes of the Catalogue of New World Grasses (Poaceae) published in **Contributions from the United States National Herbarium**. vols. 39, 41, 46, and 48. Doi: <http://www.tropicos.org/Project/CNWG>.

STALIKAS, C. D. “Phenolic Acids and Flavonoids: Occurrence and Analytical Methods.” **Methods in Molecular Biology**, 25 Nov. 2009, pp. 65–90. Doi: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-029-8_5.

SZYMBORSKA, K., FRAŃSKI, R., & BESZTERDA-BUSZCZAK, M.; Extraction with Acidified Methanol—An Easy and Effective Method of Methyl Chlorogenate Formation, as Studied by ESI-MS. **Molecules**, 27(21), 7543. 2022. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules27217543>

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer; **Chemico-Biological Interactions**, V.160, p 1 – 40. 2006

WANG, M., CARVER, J. J., PHELAN, V. V., SANCHEZ, L. M., GARG, N., PENG, Y., LUZZATTO-KNAAN, T.; Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, 34(8), 828–837, 2016. Doi: doi:10.1038/nbt.3597

WANG, M., YAO, C., LI, J., WEI, X., XU, M., HUANG, Y., MEI, Q., & GUO, D.; Software Assisted Multi-Tiered Mass Spectrometry Identification of Compounds in Traditional Chinese Medicine: *Dalbergia odorifera* as an Example. **Molecules**, 27(7), 2333, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27072333>

WANG, Y., et al. “A Systematic Review on the Composition, Storage, Processing of Bamboo Shoots: Focusing the Nutritional and Functional Benefits.” **Journal of Functional Foods**, vol. 71, Aug. 2020, p. 104015, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104015>.

WRÓBLEWSKA, K. B. et al. (2019). In vitro antioxidant and photoprotective activity of five native Brazilian bamboo species. *Industrial Crops and Products*. Vol. 130. pp. 208–215. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.12.081.

XU, H., GAO, H., LIU, F., & GONG, L.; Red-Skin Extracts of Lotus Seeds Alleviate High-Fat-Diet Induced Obesity via Regulating Lipoprotein Lipase Activity. **Foods**, 11(14), 2085, 2022. Doi: <https://doi.org/10.3390/foods11142085>

YANG, J., et al. “An Update of Aurones: Food Resource, Health Benefit, Biosynthesis and Application.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 21 Aug. 2023, pp. 1–20, Doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2248244>.

ZHANG, YONG-XIN, et al. “Comparative Pharmacokinetics of Aloe-Emodin, Rhein and Emodin Determined by Liquid Chromatography–Mass Spectrometry after Oral Administration of a Rhubarb Peony Decoction and Rhubarb Extract to Rats.” **Die Pharmazie** - an International Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 68, no. 5, pp. 333–339, 2013. Doi: <https://doi.org/10.1691/ph.2013.2855>.

ZHOU, JIAN-MIN, AND RAGAI K. IBRAHIM. “Tricin—a Potential Multifunctional Nutraceutical.” **Phytochemistry Reviews**, vol. 9, no. 3, 29 Dec. 2009, pp. 413–424, <https://doi.org/10.1007/s11101-009-9161-5>.

Paulo Roberto M. Gomes

Data e assinatura do aluno(a)

29/11/2023 orientador

7.Anexos

Anexo 1-Cromatogramas CLAEM das subfrações DiC, DiD, DiE, DiF, DiG, AcG, AcH, Acl, nButB, nButC e nButD:

