

REDES MOLECULARES APLICADA A DESREPLICAÇÃO E ANOTAÇÃO DE FLAVONOIDES DAS FOLHAS DE ESPÉCIES DE BAMBU

Ana Beatriz de Morais Salero (IC) e Edgard Antonio Ferreira (Orientador)

Apoio: PIBIC CNPq

RESUMO

A química de produtos naturais cada vez mais dispõe de abordagens modernas de bioinformática visando uma melhor organização e interpretação de um conjunto complexo de dados de a partir de uma coleção de amostras, como extratos vegetais e fases orgânicas obtidas a partir de extratos. A partir dessa abordagem, o presente trabalho visou o estudo das fases orgânicas em *n*-butanol obtidas a partir da partição líquido-líquido do extrato bruto em metanol das espécies *Phyllostachys makinoi* e *Phyllostachys pubescens*. Inicialmente o perfil cromatográfico foi obtido e então observado a ocorrência de compostos fenólicos, sobretudo flavonoides com base dos espectros na região do ultravioleta. A condição cromatográfica obtida nas análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi aplicada na análise das mesmas fases orgânicas por cromatografia líquida e espectrometria de massas (CLAE-IES-MS/MS). Os dados obtidos a partir dessas análises foram então tratados no software mzMine 2.53 e então submetidos a plataforma Global Natural Products Social Molecular Network (GNPS) para então gerar as redes moleculares visando observar as correlações entre os compostos presentes duas espécies vegetais e as anotações geradas com base na similaridade dos espectros de massas das amostras e do banco de dados do GNPS. Como resultado, foram anotados flavonoides e cumarinas em ambas as fases orgânicas, além da organização dos flavonoides em dois clusters em que os flavonoides O-glicosilados e C-glicosilados ficaram agrupados em clusters distintos.

Palavras-chave: Redes moleculares. Bambu. Cromatografia.

ABSTRACT

The chemistry of natural products increasingly makes use of modern bioinformatics approaches aiming a better organization and interpretation of a complex set of data from a collection of samples, such as plant extracts and organic phases obtained from extracts. Based on this approach, the present work aimed to study the organic phases in *n*-butanol obtained from the liquid-liquid partition of the crude extract in methanol of *Phyllostachys makinoi* and *Phyllostachys pubescens* species. Initially, the chromatographic profile was obtained and then the occurrence of phenolic compounds, especially flavonoids, was observed based on the spectra in the ultraviolet region. The chromatographic condition obtained in the analyzes by high performance liquid chromatography (HPLC) was applied in the analysis of the same organic phases by liquid chromatography and mass spectrometry (HPLC-IES-MS/MS). The data obtained from these analyzes were treated in the mzMine 2.53 software and then submitted to the Global Natural Products Social Molecular Network (GNPS) platform to generate molecular networks to observe the correlations between the compounds present in two plant species and the annotations generated with based on the similarity of the mass spectra of the samples and the GNPS database. As a result, flavonoids and coumarins were annotated in both organic phases, in addition to the organization of flavonoids in two clusters in which the O-glycosylated and C-glycosylated flavonoids were grouped in different clusters.

Keywords: Molecular networking. Bamboo. Chromatography.

1 INTRODUÇÃO

Entre espécies nativas e exóticas, o Brasil possui em sua flora 258 espécies de bambus (INBAR, 2022). Contudo, o número de espécies e trabalhos encontrados na literatura, estão muito aquém do que poderia ser, tendo em vista a potencialidade dessas espécies vegetais em áreas de ciência e tecnologia. O uso do bambu, de forma geral, é em grande parte pela utilização do colmo “caule”, e as são folhas descartadas. Entretanto, estudos sobre a composição das folhas demonstram que as folhas são ricas em flavonoides, (SUN *et. al.* 2017; LI *et. al.*, 2021; IBRAHIM *et. al.*, 2021) classe de compostos de grande interesse devido ao amplo espectro de efeitos biológicos relatados, como antioxidante, hepatoprotetor, antibactericida, anti-inflamatório, antitumoral, antiviral, entre outros (NIRMALA *et. al.*, 2018; JUCÁ, *et. al.* 2020).

Entre as classes de compostos naturais, os flavonoides têm grande representatividade em relação ao número de compostos já conhecidos, e seus representantes bioativos (KOIRALA *et. al.*; 2016; PANCHE *et. al.* 2016).

Neste contexto, a o estudo da composição química e efeitos biológicos de compostos obtidos de espécies vegetais, incluindo o bambu são significantes. Desta forma a química de produtos naturais, pode contribuir com o conhecimento acerca dos compostos químicos presentes em espécies de bambus.

A química de produtos naturais cada vez mais dispõe de abordagens modernas visando uma melhor organização e interpretação de um conjunto complexo de dados de uma coleção de amostras. Neste contexto, a bioinformática, quimioinformática e estatística vem desempenhando um papel crucial na organização, racionalização e otimização dos estudos de química de produtos naturais (FOX RAMOS *et. al.* 2019). A partir de plataformas *online* e softwares de livre acesso, os estudos voltados para área de química de produtos naturais, sobretudo desreplicação, anotação e relação estrutura/atividade biológica, vem ganhando notoriedade na comunidade científica pela utilização destas ferramentas. Neste quesito, a plataforma *online Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) se destaca no auxílio no processo de organização, desreplicação e anotação de compostos pela utilização de dados de espectrometria de massas e bibliotecas espectrais.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo o estudo das folhas de espécies de bambus *Phyllostachys pubescens* e *P. makinoi* a partir de abordagens modernas de informática e espectrometria de massas visando a obtenção de informações a respeito da composição química e a construção de redes moleculares para estabelecer relações entre os constituintes químicos presentes nas duas espécies.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bambu

De acordo com registros, há cerca de aproximadamente 2 mil anos atrás já havia plantações de bambu com finalidade comercial na Ásia (LAWS, 2013).

São conhecidas 1662 espécies que estão distribuídas em 121 gêneros (CANAVAN *et. al*, 2017). Geograficamente estão localizadas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas.

O Brasil é o país com maior número de espécies de bambu da América Latina com 258 espécies, e o segundo no mundo, ficando apenas atrás da China (INBAR, 2022).

2.2 Aspectos químicos e biológicos

Apesar do grande número de espécies de bambus, muitas espécies não apresentam qualquer descrição da composição química ou propriedades biológicas associadas e seus compostos. Entre as espécies que tiveram o estudo fitoquímico realizado, os constituintes químicos essencialmente isolados e/ou identificados foram flavonoides, compostos fenólicos glicosilados e ácidos fenólicos (SUN *et. al*. 2017; LI *et. al.*, 2021; IBRAHIM *et. al.*, 2021).

Os flavonoides, substâncias polifenólicas, formam um grupo de metabólitos especiais com mais de 8000 substâncias já relatadas (KOIRALA *et. al*, 2016). Apresentam grande potencial biológico, com uma vasta gama de atividades farmacológicas; antioxidante, hepatoprotetora, antibactericida, anti-inflamatória, antitumoral, antiviral (NIRMALA *et. al.*, 2018; JUCÁ, *et. al*. 2020).

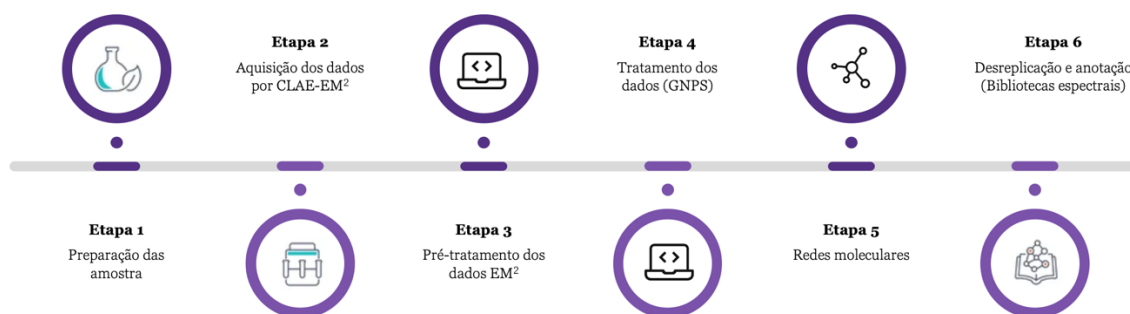
Em relação a atividade biológica dos extratos e substâncias isoladas de espécies de bambus, a atividade antioxidante tem destaque, pois apresenta em sua composição como principais compostos alta concentração de substâncias fenólicas. No teste de atividade antirradicalar realizado a partir da reação dos extratos de quinze espécies com o radical livre DPPH, foi verificado que todos os extratos possuíam atividade antirradicalar (WANG *et. al*, 2012).

2.3 Redes moleculares

Com o recente e importante avanço de abordagens de informática voltadas para o campo da biologia e química, a química de produtos naturais, neste contexto, tem encontrado suporte para o avanço racional na forma de explorar a diversidade molecular de amostras complexas com maior rapidez e confiabilidade dos resultados (FOX RAMOS, *et. al*, 2019). A partir de tais abordagens, busca-se estabelecer organização e compreensão de um grande conjunto de dados. Neste cenário, em 2012 foi divulgado o estudo por redes moleculares para

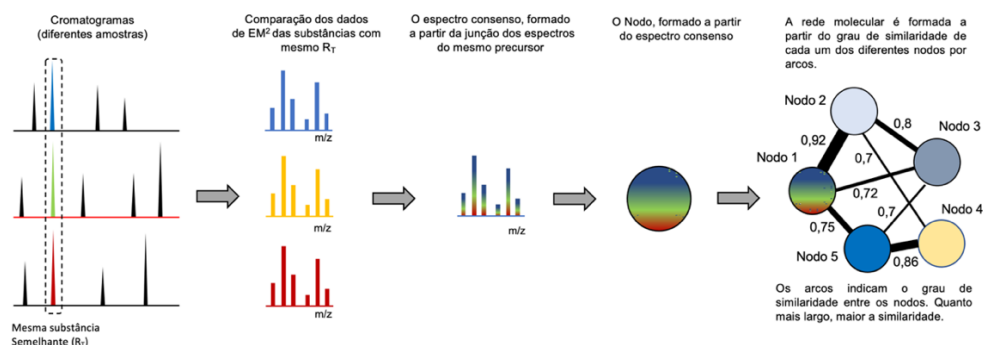
a análise de pequenas moléculas (< 2000 Da) por espectrometria de massas por múltiplos estágios (íons fragmento) com a finalidade de mapear a diversidade química e interações em colônia de bactérias (WATROUS *et. al*, 2012). As redes moleculares são ferramentas voltadas para a organização e visualização de dados espectrais para estabelecer relações com base nas semelhanças e diferenças espectrais entre conjuntos de metabólitos de uma ou múltiplas amostras. A desreplicação (identificação de compostos já conhecidos) e anotação (atribuição da estrutura molecular pela utilização de bibliotecas) de compostos com base na comparação dos espectros de massa da amostra com os dados das bibliotecas espectrais também ganhou ênfase neste cenário e atua de forma conjunta com os trabalhos de redes moleculares. Para a construção de redes moleculares, desreplicação e anotação molecular seis etapas são necessárias (Figura 1).

Figura 1: Etapas para obtenção de redes moleculares e anotação molecular.



Fonte: Elaborado pelo autor

A plataforma *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) apresentada a comunidade científica em 2016 (WANG *et. al*, 2016), tem como base o alinhamento espectral em pares a partir de um algoritmo de similaridade do cosseno entre os espectros. A partir desta comparação são gerados grupos espectrais tendo como base um valor pré-determinado de cosseno (0 a 1), onde 0 significa que são completamente diferentes e 1 apresentam 100% de similaridade. Caso um pareamento de espectros for maior ou igual ao valor de cosseno pré-determinado, uma conexão entre os espectros é criada. Levando em consideração que uma substância pode ser representada por um conjunto de espectros de massas de diferentes amostras e/ou com base na largura do sinal cromatográfico e quantidade de *scans*, os íons provenientes destes espectros pertencentes a mesma substância necessitam ser agrupados em um nodo. Por final, a partir dos dados espectrais agrupados em cada nodo a desreplicação e anotação pode ser realizada por comparação com bibliotecas espectrais (figura 2).

Figura 2: Formação de uma rede molecular a partir de dados de EM².

Fonte: Elaborado pelo autor

A conexão entre os nós está relacionada a um valor de cosseno pré-estabelecido pelo usuário da plataforma que varia entre 0 e 1, conforme mencionado anteriormente. Caso o pareamento entre os espectros possuir uma similaridade que seja maior ou igual ao valor pré-estabelecido, uma conexão será formada. Quanto maior o valor pré-estabelecido, maior será o rigor para que ocorra o pareamento de espectros e consequentemente para a conexão entre nós. Quanto mais próximo de 1 for este valor, maior o qual grau de similaridade entre os espectros e consequentemente das estruturas moleculares, uma vez que substâncias com estruturas químicas similares apresentam padrões de fragmentação similares. Trabalhos publicados na literatura a partir da implementação de redes moleculares, desreplicação e anotação vem demonstrando a eficiência desta ferramenta. A partir da obtenção de redes moleculares e técnicas clássicas de fitoquímica, Carriot e colaboradores (2021) apresentaram a anotação de metabólitos a partir de algas marrons. A utilização de redes moleculares para investigação de compostos já conhecidos e seus análogos das folhas de beterraba e relação com efeito antiobesidade (HEGAZI *et. al*, 2020). A aplicação de redes moleculares também foi implementada na investigação do perfil químico e atividade anti-trypanossoma cruzi de *Hyacinthoides non-scripta* (RAHEEM *et. al*, 2019).

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes e solventes

Os solventes utilizados para extrações e partições líquido-líquido foram metanol, hexano, acetato de etila e *n*-butanol grau P.A. da marca Labsynth.

Para as análises cromatográficas foram utilizados acetonitrila (ACN) de grau HPLC da marca Merck. A água ultrapura utilizada foi purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA).

As amostras injetadas em CLAE foram previamente filtradas em filtro de seringa PVDF hidrofílico (0,22 µm).

O ácido utilizado na fase móvel foi o ácido fórmico gral P.A da marca Labsynth.

3.2 Equipamentos

Os solventes foram removidos dos extratos e fases orgânicas por evaporação a pressão reduzida utilizando o equipamento de evaporação rotativa Büchi R-100 acoplado ao controlador de vácuo V-850 e bomba de vácuo V-700.

Para a obtenção do perfil cromatográfico foi utilizado equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE1) da marca Agilent modelo 1260 Series Infinity Liquid Chromatograph, com detector espectrofotométrico por arranjo de diodo (DAD) utilizando coluna cromatográfica Luna Phenomenex® C18 (5 µm, 250 x 4,6 mm).

Para os experimentos de espectrometria de massas por múltiplo estágio (EM²), as amostras foram analisadas utilizando o equipamento de Cromatografia Líquida de alta Eficiência (CLAE2) da marca Dionex Ultimate 3000 Thermo Fisher Scientific acoplado ao Espectrômetro de massas com analisador Ion Trap 3D (resolução unitária) LCQ Fleet da Thermo Fisher Scientific equipado com coluna cromatográfica Purospher STAR – C18 endcapped, LiChroCART (5µm, 250 x 4.6 mm) – MERCK e o método cromatográfico estabelecido em CLAE1, com ionização por *electrospray* (IES) e aquisição no modo positivo e negativo.

3.3 Coleta do material vegetal

O material vegetal (folhas) das espécies *Phyllostachys pubescens* e *P. makinoi* foi obtido junto ao banco de Geoplasma da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento da Agência Paulista de Tecnologia de Agronegócios (Apta) localizado na cidade Tatuí/SP.

3.4 Preparo do extrato e fases orgânicas

O material vegetal foi submetido à secagem em estufa sob ventilação a 40°C, visando eliminação de água. Então, moído e submetido a extração por maceração com metanol. O solvente removido a pressão reduzida para gerar os extratos brutos metanólicos. Os extratos obtidos foram parcialmente solubilizados em uma mistura metanol/água 9:1 (v:v) e então, submetidos a um processo de extração líquido-líquido utilizando inicialmente hexano até esgotamento da extração, seguido de acetato de etila e finalmente n-butanol. Os solventes

foram então removidos a pressão reduzida por meio de evaporação rotatória a pressão reduzida para gerar as fases orgânicas em hexano, acetato de etila e *n*-butanol.

3.5 Preparo do extrato metanólico da espécie *Phyllostachys pubescens*

As folhas secas moídas foram submetidas a um processo de extração, onde 30 g foram adicionadas a um erlenmeyer de 250 mL, e a este foi adicionado 125 mL de metanol. As folhas permaneceram em contato com o solvente por trinta minutos, e então, o solvente foi removido por filtração. As folhas foram submetidas a este processo de extração com mais cinco porções de metanol. Em seguida, as fases orgânicas foram reunidas e o solvente removido sob pressão reduzida para gerar o extrato seco em metanol obtendo-se uma massa de 4,4 g.

3.6 Fracionamento do extrato da espécie *Phyllostachys pubescens*

O extrato metanólico da espécie *Phyllostachys pubescens* (4,0 g) foi ressuspendido em 250 mL de uma solução de metanol/água (9:1 / v:v) e transferido para um funil de separação de 1000 mL. Nesta suspensão foram realizadas sucessivas lavagens com solventes em porções de 75 mL em ordem crescente de polaridade, hexano, acetato de etila e butanol.

As amostras obtidas foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida obtendo-se, então, os respectivos extratos em hexano 0,48 g, acetato de etila 0,654 g e butanol 0,48 g.

3.7 Preparo do extrato bruto da espécie *Phyllostachys makinoi*

As folhas secas moídas foram submetidas a um processo extrativo, onde 80 g foram adicionados a um erlenmeyer de 500 mL, e a este foi adicionado 250 mL de metanol. As folhas permaneceram em contato com o solvente por trinta minutos, e então, o solvente foi removido por filtração. As folhas foram submetidas a este processo de extração com mais sete porções de 250 mL metanol. Em seguida, as fases orgânicas foram reunidas e o solvente removido sob pressão reduzida para gerar o extrato em metanol com massa de 6,90 g.

3.8 Fracionamento do extrato da espécie *Phyllostachys makinoi*

O extrato metanólico da espécie *Phyllostachys makinoi* (6 g) foi ressuspendido em 250 mL de uma solução de metanol/água (1:9 / v:v) e transferido para um funil de separação de

1000 mL. A esta suspensão foram realizadas sucessivas lavagens com solventes em porções de 150 mL em ordem crescente de polaridade (hexano, acetato de etila e butanol).

As amostras obtidas foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida obtendo-se, então, os respectivos extratos em hexano (1,68 g), acetato de etila (0,45 g) e butanol (1,1 g).

3.9 Perfil cromatográfico das fases em *n*-butanol

O perfil cromatográfico foi obtido pela injeção de 10 mL de uma solução de cada uma das fases em *n*-butanol (1,0 mg.mL⁻¹) no equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência da marca Agilent modelo Infinity 1260 series (CLAE1) com detector DAD ajustado para 354 nm, utilizando como fase estacionária a coluna de fase reversa Phenomenex Luna (250 x 4,60 mm) e 5 µm de diâmetro de partícula, mantido sob temperatura constante de 25 °C e eluição realizada sob gradiente da fase móvel composta por acetonitrila e uma solução de ácido fórmico 0,1%, seguindo os parâmetros apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Gradiente de solventes utilizados na análise por CLAE do extrato em butanol

Tempo (min.)	Ácido fórmico 0,1 % (%)	Acetonitrila (%)
0	95	5
45	65	35
50	95	5

Fonte: Elaborado pelo autor

4.0 Análise por CLAE-IES-EM²

As análises por CLAE-ESI-MS/MS foram realizadas na central analítica do departamento de produtos naturais e alimentos (CA-DPNA) – Faculdade De Farmácia, CCS – UFRJ pelo doutorando Me. Brendo Araujo Gomes.

A condição cromatográfica para a análise por CLAE-IES-EM² manteve-se a mesma utilizada em CLAE1. A análise foi realizada Cromatógrafo em fase líquida Dionex Ultimate 3000 Thermo Fisher Scientific acoplado ao Espectrômetro de massas com analisador Ion Trap 3D (resolução unitária) LCQ Fleet da Thermo Fisher Scientific. Equipado com coluna cromatográfica Purospher STAR – RP18 endcapped, LiChroCART 250 – 4.6 (5µm) – MERCK. Foi injetado 15 µL de cada uma das amostras em butanol amostra com concentração de 2mg/mL. A ionização do analito foi realizado por ionização por *electrospray* (IES) no modo positivo e negativo de ionização operando conforme as seguintes condições: *sheat gas flow*: 50; *auxiliary gas flow*: 10; *source voltage*: 5 Kv – modo negativo; - 6 Kv – modo negativo *source current*: 100 µA; *tube lens*: 80 V – modo positivo; -121 V – modo negativo; temperatura do

capilar: 335 °C; voltagem do capilar: 43 V – modo positivo; -39V – modo negativo; temperatura da fonte: 450 °C.

A faixa de aquisição dos espectros ocorre com m/z de 100 a 1000 Da. A fragmentação teve como base os três íons mais intensos e CID de 35 eV.

4.10 Construção das redes moleculares, anotação e desreplicação

A construção das redes moleculares teve apoio no tratamento de dados e submissão na plataforma GNPS pelo doutorando Me. Brendo Araujo Gomes da Faculdade De Farmácia, da UFRJ.

Os dados das análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas por múltiplo estágio com ionização por *electrospray* (CLAE-IES-EM²) foram submetidos ao pré-tratamento no software de livre acesso MZmine 2.53. Os dados foram tratados seguindo a sequência: (i) importação dos dados brutos, (ii) detecção dos espectros de EM¹, (iii) detecção dos espectros de EM², (iv) construção dos cromatogramas de EM¹, (v) deconvolução espectral dos cromatogramas, (vi) agrupamento de isótopos, (vii) alinhamento, (viii) exportação dos dados para plataforma GNPS. Foi necessária a conversão dos arquivos com extensão raw para a extensão mzML, com a utilização do software MSConvert, para então, os dados serem submetidos ao tratamento utilizando um conjunto de variáveis buscando a melhor organização dos dados e combinação entre os nodos. Para isto, os seguintes parâmetros foram utilizados: (Tabela 2):

Tabela 2: parâmetros utilizados no tratamento dos dados no software MZmine 2.53

PARÂMETROS	ESI(+)	ESI(-)
Mass detector		
- MS ¹ (noise level)	8E2	5E2
- MS ² (noise level)	1E0	1E0
Chromatogram builder (ADAP)		
- #scanst	3	3
- intensity threshold	8E2	5E2
- min intensity	1E3	8E2
- m/z tolerance	0.5	0.5
Chromatogram decovolution (wavelets ADAP)		

- <i>S/N threshold</i>	3	3
- <i>min feature height</i>	1E3	8E2
- <i>coefficiente/area threshold</i>	0	0
- <i>peak duration range</i>	0.01-2.0	0.01-2.0
- <i>rt wavelet range</i>	0.001-0.50	0.001-0.20

Isotopic peaks grouper (representative - most intense)

- <i>m/z tolerance</i>	0.5	0.5
- <i>rt tolerance</i>	0.5	0.5
- <i>maximun charge</i>	1	1

Join aligner

- <i>m/z tolerance</i>	0.5	0.5
- <i>weight for m/z</i>	3	3
- <i>RT tolerance</i>	0.5	0.5
- <i>weight for RT</i>	1	1

Fonte: Elaborado pelo autor

Após o processamento, a *table list* final foi exportada em modo de compatibilidade com a construção de redes quantitativas (FBMN) no GNPS. As informações sobre MS¹, RT e as áreas dos sinais encontravam-se em arquivos .csv, enquanto as informações de MS² estavam presentes em arquivo (.mgf).

Para a construção das redes moleculares quantitativas (FBMN) foram utilizados os arquivos processados (.csv) e (.mgf) exportados do software MZmine, assim como os arquivos originais na extensão livre (.mzML).

Os parâmetros utilizados seguem na tabela 3 para a obtenção das redes moleculares.

Tabela 3: Parametros utilizados para obtenção das redes moleculares.

Parâmetros	ESI (+)	ESI (-)
MS ¹ (noise level)	8,00E+02	5,00E+02
MS ² (noise level)	1,00E+00	1,00E+00
#scans	3	3
Intensity treshold	8,00E+02	5,00E+02
Min intensity	1,00E+03	8,00E+02
m/z tolerance	0,5	0,5
S/N threhold	3	3
Min feature height	1,00E+03	8,00E+02
Coefficiente/area threshold	0	0
Peak duration range	0,01-2,0	0,01-2,0

Rt wavelet range	0,001-0,50	0,001-0,20
m/z tolerance	0,5	0,5
Rt tolerance	0,5	0,5
Maximun charge	1	1
m/z tolerance	0,5	0,5
Weight for m/z	3	3
RT tolerance	0,5	0,5
Weight dor RT	1	1

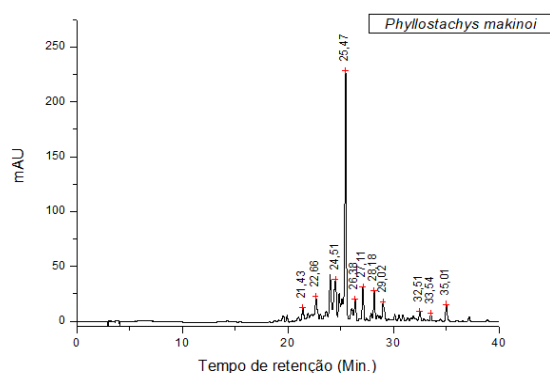
Fonte: Elaborado pelo autor

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Perfil cromatográfico das fases em *n*-butanol

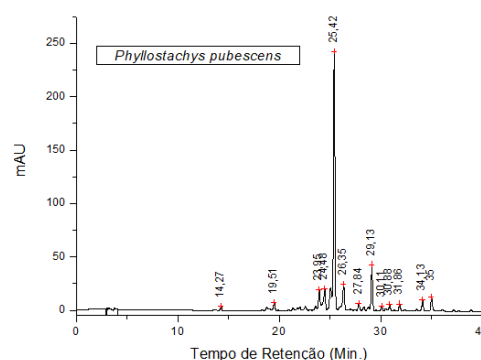
Amostras de fases e extratos vegetais apresentam grande complexidade tendo em vista o número de compostos que estão presentes a amostra, o que torna uma tarefa muito complexa conseguir a resolução mínima para que não ocorra a sobreposição de picos cromatográficos. Desta forma, o desenvolvimento do método cromatográfico visou a melhor resolução possível entre os picos cromatográficos para ter bom método para ser aplicado na análise de CLAE-IES-MS². Assim, após diversas análises obteve-se um resultado muito satisfatório para o propósito do trabalho (Figuras 3 e 4).

Figura 3: Perfil cromatográfico da *P. Makinoi*



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 4: Perfil cromatográfico da *P. Pubescens*



Fonte: Elaborado pelo autor

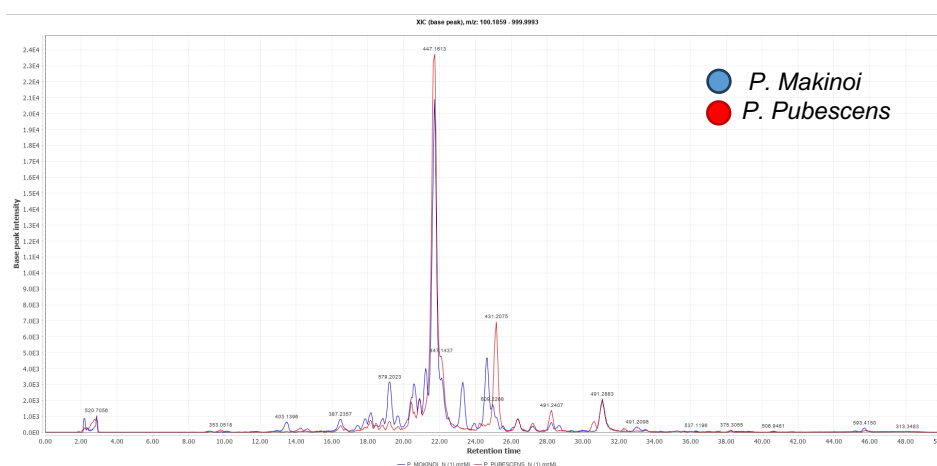
Ao comparar os perfis cromatográficos para ambas as espécies é possível notar grande similaridade nos tempos de retenção dos picos cromatográficos.

Com isto, pode-se supor a ocorrência de substâncias iguais em ambas as fases em *n*-butanol. No entanto, não bastava apenas essa comparação para afirmar tal suposição. Assim,

a análises dessas fases por CLAE-IES-MS² poderia fornecer informações valiosas sobre os padrões de fragmentação e consequentemente estabelecer uma relação precisa sobre as substâncias presentes nas duas fases orgânicas, além de poder realizar a anotação com base em bibliotecas espectrais e finalmente construir as redes moleculares e ter uma visão global sobre o perfil do extrato como um todo.

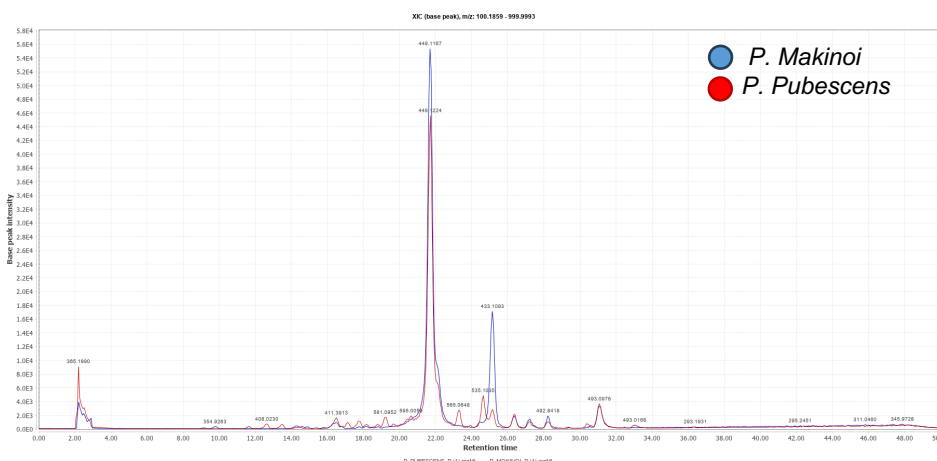
Com isto, as amostras foram analisadas por CLAE-IES-MS² tanto para o modo negativo como para o modo positivo de ionização (figuras 5 e 6).

Figura 5: Perfil cromatográfico de *P. Pubescens* e *P. Makinoi* no modo negativo de ionização.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 6: Perfil cromatográfico de *P. Pubescens* e *P. Makinoi* no modo positivo de ionização.



Fonte: Elaborado pelo autor

Diante da obtenção do perfil cromatográfico e observação da ionização das espécies presentes nas fases orgânicas tanto no modo negativo como positivo, os dados foram tratados no software MZmine 2.53 e então submetidos a processamento para gerar as redes moleculares na plataforma GNPS.

4.2 Redes moleculares

As redes moleculares obtidas resultaram na anotação de 17 compostos pelo modo negativo de ionização e 11 pelo modo positivo de ionização. Essencialmente, os compostos anotados fazem parte de três classes de compostos, flavonoides O-glicosilados, flavonoides C-glicosilados e cumarinas.

As redes moleculares geradas tanto para o modo positivo de ionização quanto para o modo negativo apresentaram regiões distintas (*clusters*), tendo em vista as semelhanças e diferenças estruturais e como resultado, geram diferentes íons fragmento na análise de espectrometria de massas e desta forma ocorre os agrupamentos (Figuras 7 e 8).

Figura 7: Rede molecular modo negativo da *P. Pubescens* e *P. Makinoi*

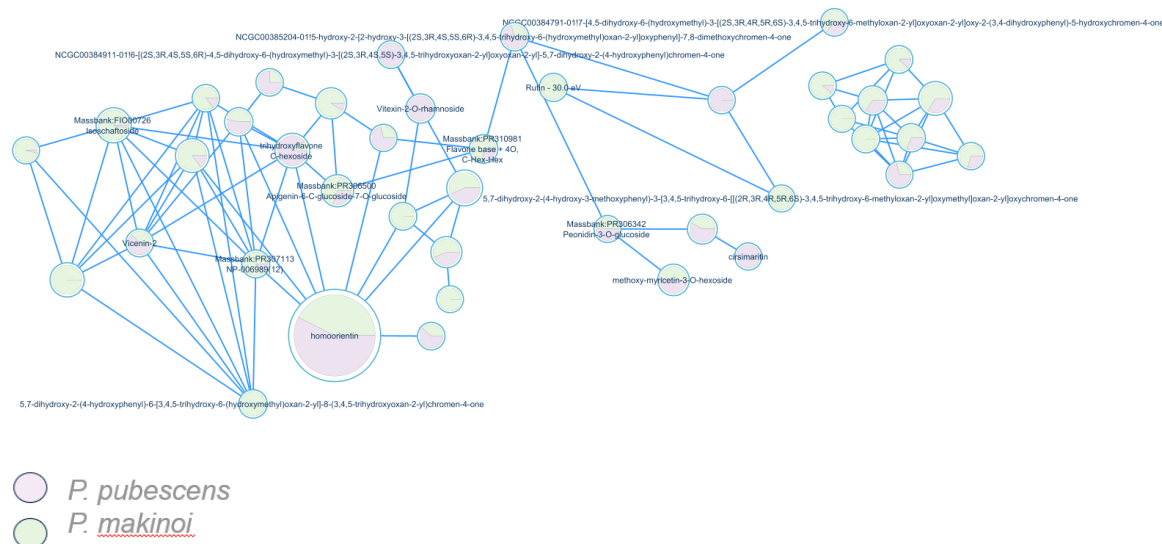
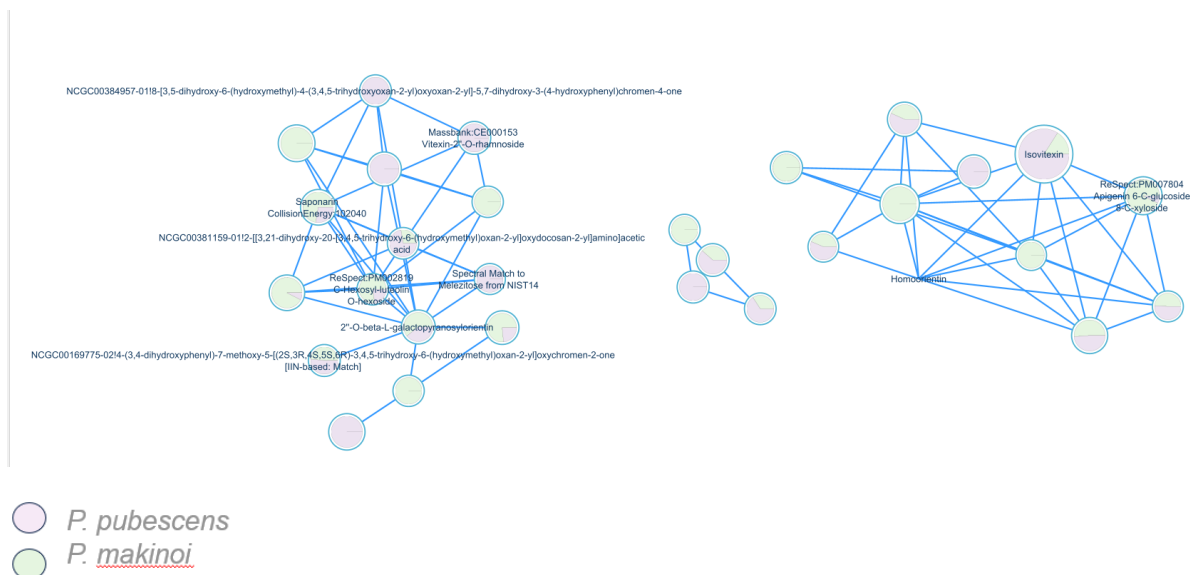
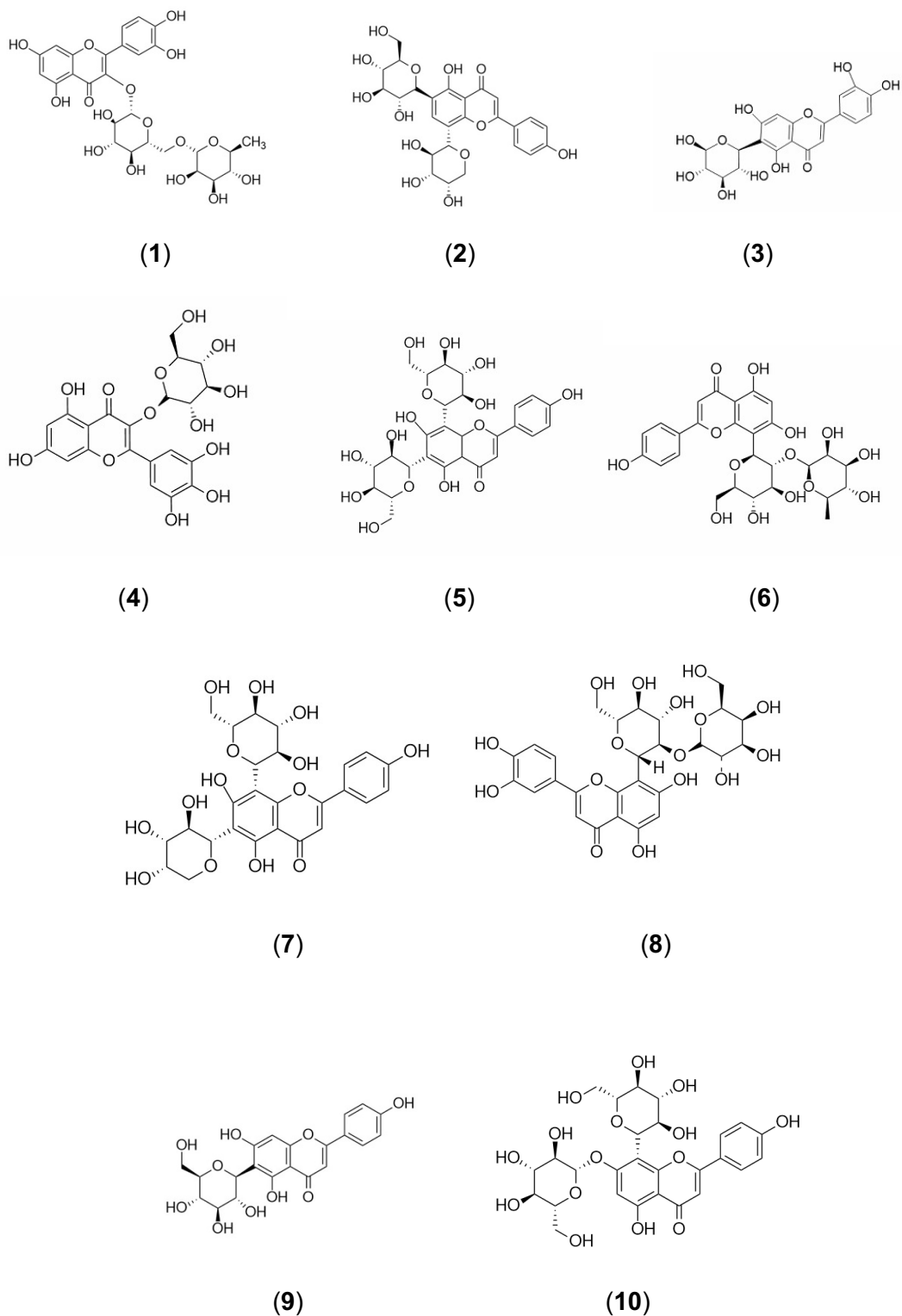


Figura 8: Rede molecular modo positivo da *P. Pubescens* e *P. Makinoi*

Tendo em vista relatos anteriores da ocorrência de flavonoides em espécies de bambus, dos 17 compostos anotados, 10 correspondem a flavonoides (Tabela 4) (Figura 9). Com base nas redes moleculares pode-se perceber grande similaridade de flavonoides em ambas às espécies, representados por nodos com duas cores. A partir destes mesmos resultados pode-se inferir sobre qual composto foi o majoritário, Homoorientina, uma vez que seu nodo é o maior.

Tabela 4: Compostos anotados pelo GNPS

	Composto Anotado	Espécie
1	Rutin	<i>P. makinoi</i>
2	Schaftoside	
3	Homoorientin	<i>P. makinoi</i> <i>P. pubescens</i>
4	methoxy-myricetin-3-O-hexoside	
5	vitecina-2''-O-shmnsoside	
6	vicenin-2	
7	2''-O-beta-L-galactopyranosylorientin	
8	Isoschaftoside	
9	apigenin 6C-glucoside 8-C-xyloside	
10	Isovitexin	

Figura 9: Estrutura molecular dos flavonoides anotados de *P. makinoi* e *P. pubescens*

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho apresentou o potencial das duas espécies de bambus como fonte flavonoides. A plataforma GNPS foi muito eficiente na formação das redes moleculares tendo em vista a organização realizada dos dados, além da anotação de 17 compostos, dos quais 10 foram flavonoides. Ainda há compostos presentes nas redes moleculares que não tiveram a anotação realizada, no entanto com base na organização das redes moleculares por similaridade dos perfis de fragmentação dos compostos, pode-se sugerir compostos com estruturas moleculares relacionadas aos compostos anotados.

6 REFERÊNCIAS

CARRIOT, N.; PAIX, B.; GREEF, S.; VIGUIER, B.; BRIAND, J-F. Integration of LC/MS-based molecular networking and classical phytochemistry approach allows in-depth annotation of the metabolome of non-model organisms – The case study of the brown seaweed *Taonia atomaria*. **Talanta**, v. 225, 121925, 2021.

FOX RAMOS, A. E.; Evanno, L.; Poupon, E.; Champy, P.; Benididir, M. A. Natural products targeting strategies involving molecular networking: different manners, one goal. **Natural Products Reports**, v. 36, p. 960-980, 2019.

HEGAZI, N. M.; RADWAN, R. A.; BAKRY, S. M.; SAAD, H. H. Molecular networking aided metabolomic profiling of beet leaves using three extraction solvents and in relation to its anti-obesity effects. **Journal of Advanced Research**, v. 24, p. 545-555, 2020.

IBRAHIM, A. K.; ABDELHAMEED, R. F. A.; HABIB, E. S.; IBRAHIM, A. K.; AHMED, S. A.; BADR, J. M. Chemistry of Bamboo *Phyllostachys* Genus: A mini Review. **Records of Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 2, p. 41-52, 2021.

INTERNATIONAL BAMBOO AND RATTAN ORGANIZATION (INBAR). Brazilian Bamboo Industry Boosted. Disponível em: <https://www.inbar.int/brazilian-bamboo-industry-boosted/#:~:text=258%20species%20of%20bamboo%20are,Brazil%2C%20most%20of%20them%20endemic>. Acesso em: 08 de ago. 2023.

JUCÁ, M. M.; FILHO, F. M. S. C.; ALMEIDA, J. C.; MESQUITA, D. S.; BARRIGA, J. R. M.; DIAS, K. C. F.; BARBOSA, T. M.; VASCONCELOS, L. C.; LEAL, L. K. A. M.; RIBEIRO, J. E.; VASCONCELOS, S. M. M. Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. **Natural Product Research**, v. 34, p. 692-705, 2020.

KOIRALA, N.; HUY THUAN N.; GHIMIRE G. P.; THANG, D. V.; SOHNG J. K. Methylation of flavonoids: Chemical structures, bioactivities, progress and perspectives for biotechnological production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 86, p. 103-116, 2016.

LAWS, Bill. **50 plantas que mudaram o rumo da história**. 1 ed. Rio de Janeiro: Sextante. p.224, 2013.

LI, X.; Tao, W.; Xun, H.; Yao, X.; Wang, J.; Sun, J.; Yue, Y.; Tang, F. Simultaneous Determination of flavonoids from bamboo leaf extracts using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, p. 347-352, 2021.

NIRMALA, C.; BISHT, M. S.; BAJWA, H. K.; SANTOSH, O. Bamboo: A rich source of natural antioxidants and its applications in the food and pharmaceutical industry. **Trends in food science & Technology**, v. 77, p. 91-99, 2018.

PANCHE, A. N.; Diwan, A. D.; Chandra, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional science**, v. 5, p. e47.

RAHEEM, D. J.; TAWFIKE, A. F.; ABDELMOHSEN, U. R.; EDRADA-EBEL, R.; FITZSIMMONS-THOSS, V. Application of metabolomics and molecular networking in investigating the chemical profile and antitrypanosomal activity of British bluebells (*Hyacinthoides non-scripta*). **Scientific Reports**, v. 9, p. 2547, 2019.

SUN, Y. et al. Homogenate-assisted Vacuum-powered Bubble Extraction of Moso Bamboo Flavonoids for On-line Scavenging Free Radical Capacity Analysis. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 22, n. 7, 11 jul. 2017.

WANG J.; YUE. Y.; TANG F.; SUN J. TLC Screening for Antioxidant Activity of Extracts from Fifteen Bamboo Species and Identification of Antioxidant Flavone Glycosides from Leaves of *Bambusa. textilis* McClure. **Molecules**. v. 17, p. 12297-12311, 2012.

WANG, M.; CARVER, J. J.; PHELAN, V. V.; SANCHEZ, L. M.; GARG, N.; PENG, Y.; NGUYEN, D. D.; WATROUS, J.; KAPONO, C. A.; LUZZATTO-KNAAN, T.; PORTO, C.; BOUSLIMANI, A.; MELNIK, A. V.; MEEHAN, M. J.; LIU, W. T.; CRÜSEMANN, M.; BOUDREAU, P. D.; ESQUENAZI, E.; SANDOVAL-CALDERÓN, M.; KERSTEN, R. D.; PACE, L. A.; QUINN, R. A.; DUNCAN, K. R.; HSU, C. C.; FLOROS, D. J.; GAVILAN, R. G.; KLEIGREWE, K.; NORTEN, T.; DUTTON, R. J.; PARROT, D.; CARLSON, E. E.; AIGLE, B.; MICHELSEN, C. F.; JELSBÄK, L.; SOHLENKAMP, C.; PEVZNER, P.; EDLUND, A.; MCLEAN, J.; PIEL, J.; MURPHY, B. T.; GERWICK, L.; LIAW, C. C.; YANG, Y. L.; HUMPH, H. U.; MAANSSON, M.; KEYZERS, R. A.; SIMS, A. C.; JOHNSON, A. R.; SIDEBOTTOM, A. M.; SEDIO, B. E.; KLITGAARD, A.; LARSON, C. B.; BOYA, C. A. P.; TORRES-MENDOZA, D.; GONZALEZ, D. J.; SILVA, D. B.; MARQUES, L. M.; DEMARQUE, D. P.; POCIUTE, E.; O'NEILL, E. C.; BRIAND, E.; HELFRICH, E. J. N.; GRANATOSKY, E. A.; GLUKHOV, E.; RYFFEL, F.; HOUSON, H.; MOHIMANI, H.; KHARBUSH, J. J.; ZENG, Y.; VORHOLT, J. A.; KURITA, K. L.; CHARUSANTI, P.; MCPHAIL, K. L.; NIELSEN, K. F.; VUONG, L.; ELFEKI, M.; TRAXLER, M. F.; ENGINE, N.; KOYAMA, N.; VINING, O. B.; BARIC, R.; SILVA, R. R.; MASCUCH, S. J.; TOMASI, S.; JENKINS, S.; MACHERLA, V.; HOFFMAN, T.; AGARWAL, V.; WILLIAMS, P. G.; DAI, J.; NEUPANE, R.; GURR, J.; RODRÍGUEZ, A. M. C.; LAMSA, A.; ZHANG, C.; DORRESTEIN, K.; DUGGAN, B. M.; ALMALITI, J.; ALLARD, P. M.; PHAPALE, P.; NOTHIAS, L. F.; ALEXANDROV, T.; LITAUDON, M.; WOLFENDER, J. L.; KYLE, J. E.; METZ, T. O.; PERVEY, T.; NGUYEN, D. T.; VANLEER, D.; SHINN, P.; JADHAV, A.; MÜLLER, R.; WATERS, K. M.; SHI, W.; LIU, X.; ZHANG, L.; KNIGHT, R.; JENSEN, P. R.; PALSSON, B.; POGLIANO, K.; LININGTON, R. G.; GUTIÉRREZ, M.; LOPES, N. P.; GERWICK, W. H.; MOORE, B. S.; DORRESTEIN, P. C.; BANDEIRA, N. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, p. 828, 2016.

WATROUS, J.; ROACH, P.; ALEXANDROV, T.; HEATH, B. S.; YANG, J. Y.; KERSTEN, R. D.; VAN DER VOORT, P.; POGLIANO, K.; GROSSI, H.; RAAIJMAKERS, J. M.; MOORE, B. S.; LASKIN, J.; BANDEIRA, N.; DORRESTEIN, P. C. Mass spectral molecular networking of

living microbial colonies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, p. E1743-E1752, 2012.

Contatos: ana.salero@mackenzista.com.br (IC) e edgard.ferreira@mackenzie.br (orientador)