

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

CAUÊ ARANTES WAGNER ZUCCARINO

**SCREENING DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ORGANISMOS  
BENTÔNICOS MARINHOS**

SÃO CARLOS  
2024

CAUÊ ARANTES WAGNER ZUCCARINO

**SCREENING DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ORGANISMOS  
BENTÔNICOS MARINHOS**

Monografia apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a conclusão do curso de Bacharelado em Química com Ênfase Fundamental.

Orientador: Professor Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck

SÃO CARLOS

2024

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que me foi concebido nestes 5 anos de curso.

Agradeço à minha família, principalmente aos meus pais, Paula e Luis, pelo apoio e incentivo incondicionais durante os meus anos de graduação.

Ao Prof. Dr. Roberto Gomes de Souza Berlinck por todos os ensinamentos e oportunidades proporcionadas ao longo destes anos de iniciação científica no Grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos (QOSBio).

À técnica do laboratório, Drª. Karin F. B. de Camargo, pelo auxílio na realização das análises de espectrometria de massas de alta resolução e pela ajuda no laboratório.

A todos os meus colegas membros ou associados ao Grupo de Química Orgânica de Sistemas Biológicos (QOSBio), bem como ao Prof. Leandro Vieira e ao aluno de pós-doutorado Everthon A. Xavier pela coleta e identificação dos briozoários, realizada no CEBIMar - USP.

Aos meus amigos de vida (Ardito, Igor, Luz e Zeni) e da graduação, que me acompanharam e me incentivaram durante os últimos 5 anos.

Ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos pela realização das análises de ressonância magnética nuclear.

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho e ao Dr. Marcelo Rodrigues Amorim por aceitarem fazer parte da banca examinadora dessa monografia.

Ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC) e a Universidade de São Paulo (USP) pela minha formação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de iniciação científica concedidas e pelo projeto temático (2019/17721-9).

## RESUMO

Dentre os diversos grupos de animais bentônicos marinhos, os briozoários são extensivamente estudados pela sua produção de metabólitos secundários com atividade citotóxica, antiplasmodial, antibacteriana, antifungica e genotóxica. Este projeto objetivou a triagem, detecção e isolamento de metabólitos secundários produzidos pela espécie *Nellia* cf. *tenella* coletada em São Sebastião. Após a extração do extrato bruto dos quinze briozoários, foi realizada a separação das frações orgânicas em coluna pré-empacotada de extração em fase sólida (SPE-CN) obtendo-se, assim, as frações desejadas para estudo. Estas foram submetidas a análises cromatográficas e espectroscópicas, com o objetivo de selecionar as espécies com frações de perfil químico interessante. A espécie *Nellia* cf. *tenella* e as frações selecionadas, foram purificadas em um sistema cromatográfico acoplado a um detector espectrofotométrico de UV. A análise de RMN-<sup>1</sup>H do composto isolado demonstrou ao menos dois contaminantes além do metabólito de interesse. Esperasse que as análises de RMN-<sup>13</sup>C e bidimensionais auxiliem na possível elucidação estrutural do composto de interesse.

## ABSTRACT

Among the various groups of marine benthic animals, bryozoans are extensively studied for their production of secondary metabolites with cytotoxic, antiplasmodial, antibacterial, antifungal, and genotoxic activities. This project aimed to screen, detect, and isolate secondary metabolites produced by the species *Nellia* cf. *tenella* collected in São Sebastião. After extracting the crude extract from the fifteen bryozoans, we performed the separation of organic fractions using a pre-packed solid-phase extraction column (SPE-CN), thereby obtaining the desired fractions for study. These were subjected to chromatographic system coupled with a UV spectrophotometric detector. The <sup>1</sup>H-NMR analysis of the isolated compound reveals at least two contaminants along with the metabolite of interest. It is expected that the <sup>13</sup>C-NMR and two-dimensional analyses will assist in the possible structural elucidation of the compound of interest.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração esquemática do ciclo de vida da <i>Bugula neritina</i> . Após a fertilização, os embriões são incubados em ovicelos até serem liberados como larvas. A larva se fixa e se metamorfoseia no zooide fundador da colônia (ancestrula), que dá origem ao restante da colônia por brotamento assexuado.....	13
Figura 2 – Estruturas selecionadas de produtos naturais isolados de briozoários.....	18
Figura 3 – Estruturas selecionadas de produtos naturais isolados de briozoários.....	19
Figura 4 – Metodologia de extração e fracionamento dos espécimes.....	21
Figura 5 – Metodologia de fracionamento do extrato bruto AcOEt.....	22
Figura 6 – Metodologia de fracionamento do extrato bruto Aquoso.....	24
Figuras 7 – Cromatograma monitorado em 263 nm do extrato orgânico de SS23BRI08.....	28
Figuras 8 – Cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+) do extrato de SS23BRI08.....	28
Figura 9 – Espectro de massas do pico detectado em 9,738 minutos no cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+).....	29
Figura 10 – Espectro de massas do pico detectado em 10,748 minutos no cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+).....	29
Figuras 11 – Cromatograma monitorado em 263 nm da fração SS23BRI09-pCN4.....	30
Figuras 12 – Cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo (MS+) da fração SS23BRI09-pCN4.....	30
Figura 13 – Espectro de massas do pico detectado em 13,373 minutos no cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+).....	31
Figura 14 – Espectro de massas do pico detectado em 14,562 minutos no cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+).....	31
Figuras 15 – Cromatograma monitorado em 263 nm da fração SS23BRI09-pCN5.....	32
Figuras 16 – Cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+) da fração SS23BRI09-pCN5.....	32
Figura 17 – Espectro de massas do pico detectado em 12,120 minutos no cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+).....	33
Figura 18 e 19 – Espectro de massas dos picos detectados em 13,371 e 14,542 minutos no cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo (MS+).....	33
Figura 20 – Estrutura do composto 2,4,5-tribromo-1-metilgramina. ....	34

Figura 21 – Comparação dos cromatogramas no UV para a fração SS23BRI09-pCN5. (A) Azul: Cromatograma registrado em 230 nm; (B) Preto: Cromatograma registrado em 250 nm.....	35
Figura 22 – Método desenvolvido para a separação da fração SS23BRI09-pCN5 (230 e 250 nm).....	36
Figura 23 – Frações obtidas a partir do fracionamento por HPLC da fração SS23BRI09-pCN5.....	36
Figuras 24 – Cromatograma monitorado em 263 nm da fração SS23BRI09-pCN5-b2.....	37
Figuras 25 – Cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+) da fração SS23BRI09-pCN5-b2.....	37
Figura 26 – Espectro de massas do pico detectado em 12,476 minutos no cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+).....	38
Figura 27 e 28 – Espectro de massas dos picos detectados em 13,737 e 14,673 minutos no cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo (MS+).....	38
Figura 29 – Comparação dos cromatogramas no UV para a fração SS23BRI09-pCN5-b2. (A) Azul: Cromatograma registrado em 296 nm; (B) Preto: Cromatograma registrado em 236 nm.....	39
Figura 30 – Método desenvolvido para a separação da fração SS23BRI09-pCN5-b2 (296 e 236 nm).....	40
Figura 31 – Frações extraídas a partir da fração SS23BRI09-pCN5-b2.....	40
Figura 32 – Comparação dos cromatogramas de HPLC no UV para a fração SS23BRI09-pCN5-b2-3. (A) Azul: Cromatograma registrado em 230 nm; (B) Preto: Cromatograma registrado em 345 nm.....	41
Figura 33 – Método desenvolvido para a separação da fração SS23BRI09-pCN5-b2-3.....	42
Figura 34 – Frações extraídas a partir da fração SS23BRI09-pCN5-b2.....	42
Figuras 35 – Cromatograma monitorado em 263 nm da fração SS23BRI09-pCN5.....	43
Figuras 36 – Cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+) da fração SS23BRI09-pCN5.....	43
Figura 37 – Espectro de massas do pico detectado em 12,476 minutos no cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+).....	44
Figura 38 – Comparação dos cromatogramas de HPLC no UV para a fração SS23BRI09-pCN5-b3. (A) Azul: Cromatograma registrado em 229 nm; (B) Preto: Cromatograma registrado em 345nm.....	44
Figura 39 – Método desenvolvido para a separação da fração SS23BRI09-pCN5-b3.....	45
Figura 40 – Frações extraídas a partir da fração SS23BRI09-pCN5-b2.....	45

Figura 41 – Comparação dos cromatogramas de HPLC no UV para a fração SS23BRI09-pCN5-b3-II. (A) Azul: Cromatograma registrado em 230 nm; (B) Preto: Cromatograma registrado em 345 nm.....	46
Figura 42 – Método de separação por HPLC desenvolvido para a purificação da fração SS23BRI09-pCN5-b3-II.....	47
Figura 43 – Frações obtidas por separação por HPLC a partir da fração SS23BRI09-pCN5-b3-II. ....	47
Figura 44 – Espectro de RMN- <sup>1</sup> H da fração SS23BRI09-pCN5-b3-II-X (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ). ....	48
Figura 45 – Expansão 1 do espectro de RMN- <sup>1</sup> H da fração SS23BRI09-pCN5-b3-II-X (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ). ....	55
Figura 46 – Expansão 1 do espectro de RMN- <sup>1</sup> H da fração SS23BRI09-pCN5-b3-II-X (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ). ....	55
Figura 47 – Expansão 1 do espectro de RMN- <sup>1</sup> H da fração SS23BRI09-pCN5-b3-II-X (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ). ....	56
Figura 48 – Expansão 1 do espectro de RMN- <sup>1</sup> H da fração SS23BRI09-pCN5-b3-II-X (600 MHz, MeOH- <i>d</i> <sub>4</sub> ). ....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado obtido após o fracionamento inicial das espécies.....	21
Tabela 2 – Resultado obtido após o fracionamento inicial da espécie <i>Nellia cf. tenella</i> .....	27
Tabela 3 – Espectros de massas de picos selecionados do cromatograma HPLC-UV-MS do extrato orgânico de <i>Nellia cf. tenella</i> (SS23BRI08).....	29
Tabela 4 – Espectros de massas de picos selecionados do cromatograma HPLC-UV-MS do extrato orgânico de <i>Nellia cf. tenella</i> (SS23BRI09-pCN4).....	31
Tabela 5 – Espectros de massas de picos selecionados do cromatograma HPLC-UV-MS do extrato orgânico de <i>Nellia cf. tenella</i> (SS23BRI09-pCN5).....	33
Tabela 6 – Espectros de massas de picos selecionados do cromatograma HPLC-UV-MS do extrato orgânico de <i>Nellia cf. tenella</i> (SS23BRI09-pCN5-B2).....	38

## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

SS23 – Coleta realizada em São Sebastião em 2023

aka – *also known as*

MeOH – Metanol

DMSO – Dimetilsulfóxido

MeCN – Acetonitrila

$\text{H}_2\text{O}$  – Água

$\text{CH}_2\text{Cl}_2$  – Diclorometano

MeOH- $d_4$  – Metanol Deuterado

DMSO- $d_6$  – Dimetilsulfóxido Deuterado

AcOEt – Acetato de Etila

HPLC – *High-performance liquid chromatography*

UPLC – *Ultra-performance liquid chromatography*

UV – Detector Ultravioleta

ELSD – *Evaporative light scattering detector*

ESI – *Electrospray ionization*

QToF – *Quadrupole Time-of-Flight*

MS – Espectrometria de massas

$m/z$  – Relação massa-carga

RMN de  $^1\text{H}$  – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN de  $^{13}\text{C}$  – Ressonância magnética nuclear de carbono-13

$\delta$  – Deslocamento químico

COSY – *Homonuclear Correlation Spectroscopy*

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Correlation*

HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1    O Filo Bryozoa .....	12
1.2    Biossíntese de metabólitos secundários .....	14
1.3    Produtos naturais isolados de briozoários.....	15
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
3.1    Coleta .....	20
3.2    Extração e Fracionamento .....	20
3.3    Fracionamento do extrato orgânico por cromatografia em fase normal.....	22
3.4    Fracionamento do extrato aquoso por cromatografia em fase reversa.....	23
3.5    Análises por HPLC-UV-ELSD-MS.....	24
3.9    Purificação por HPLC-UV .....	25
3.10    Análises por UPLC-ESI-QToF-MS .....	26
3.11    Solventes .....	26
3.12    Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	26
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>27</b>
4.1    Análises por HPLC-UV-MS .....	27
4.2 <i>Nellia cf. tenella</i> .....	28
4.2.1    Fração orgânica SS23BRI08AcOEt.....	28
4.2.2 <i>Nellia cf. tenella</i> (amostra SS23BRI09) .....	30
4.2.2.1    Fração SS23BRI09-pCN4 .....	30
4.2.2.2    SS23BRI09-pCN5.....	32
4.3    Purificação de frações obtidas do extrato do briozoário <i>Nellia cf. tenella</i> (amostra SS23BRI09) .....	35
4.3.1    Separação e purificação da fração SS23BRI09-pCN5.....	35
4.3.2    Purificação cromatográfica da fração SS23BRI09-pCN5-b2 .....	37

4.3.3	Purificação da fração SS23BRI09-pCN5-b2-3 .....	41
4.3.4	Purificação cromatográfica da fração SS23BRI09-pCN5-b3.....	43
4.3.5	Purificação cromatográfica da fração SS23BRI09-pCN5-b3-II.....	46
4.4	Análise Espectroscópica do Composto Puro.....	48
4.4.1	Composto SS23BRI09-pCN5-b3-II-X.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>55</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 O Filo Bryozoa

O filo Bryozoa, também designado Ectoprocta (do grego *ektos*, externo + *proktos*, ânus), comprehende um dos grupos de invertebrados aquáticos marinhos mais abundantes, diversos, ubíquos ao mar, sendo importantes para comunidades bentônicas marinhas.<sup>1,2</sup>

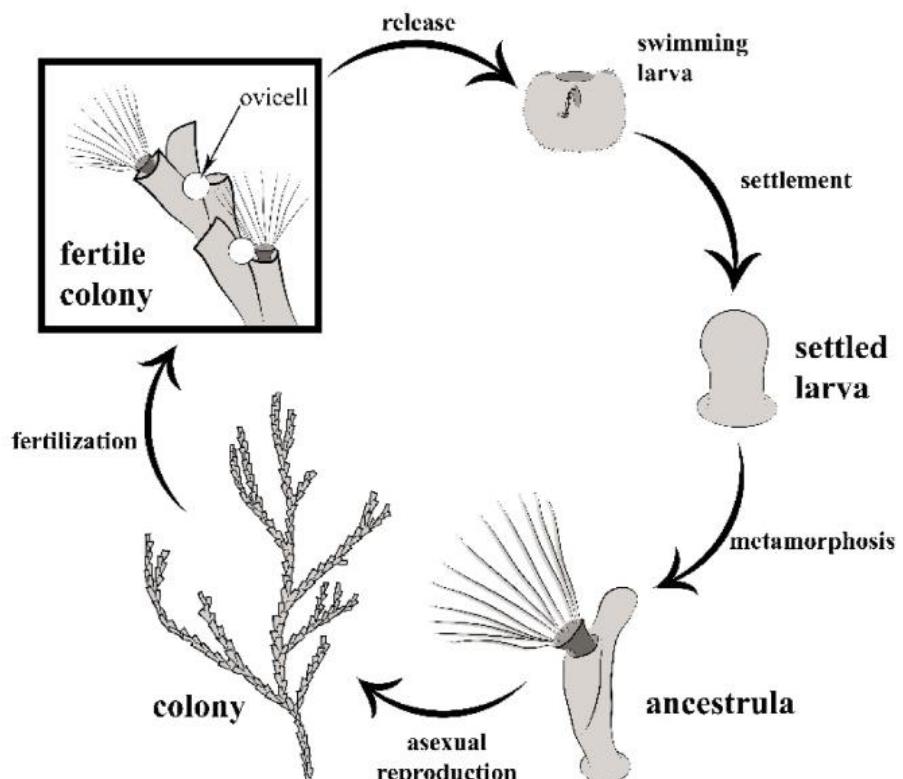
As espécies de briozoários são quase exclusivamente coloniais e sésseis, podendo desenvolver uma ampla gama de formas e tamanhos, desde estruturas incrustantes até rígidas, formando estruturas tridimensionais que proporcionam habitats seguros para pequenos organismos.<sup>1-4</sup> Devido à natureza séssil da colônia dos briozoários, sua distribuição em habitats marinhos é vasta, incluindo substratos naturais como rochas, recifes de corais e áreas de seixos à substratos artificiais como regiões portuárias, pilares de píeres e cascos de navios.<sup>5</sup> Somado à diversidade de substratos passíveis de colonização, estes animais são capazes de estabelecer colônias tanto em zonas entre marés quanto em zonas abissais, abrangendo todos os ecossistemas globais marinhos.<sup>1</sup> Esses invertebrados marinhos são considerados componentes-chave dos ambientes marinhos, abrigando comunidades inteiras de microrganismos e pequenos invertebrados dentro de suas colônias.<sup>5,6</sup>

A colônia de briozoários é composta de vários indivíduos interconectados, denominados zoóides.<sup>7</sup> Estes zoóides consistem, tipicamente, de uma cápsula corporal calcificada e uma região de tecidos moles chamada polipídio; o polipídio é formado por uma coroa de tentáculos ciliados (lofóforos), um intestino e alguns nervos associados à sua musculatura. Todos os briozoários são filtradores, o que significa que seus lofóforos capturam partículas orgânicas da coluna de água.<sup>8</sup>

Em termos de reprodução, a maioria dos briozoários é considerada hermafrodita. Suas colônias apresentam hermafroditismo zooidal ou gonocorismo zooidal (zoóides masculinos e femininos). O ciclo de vida geralmente inclui tanto reprodução sexuada quanto assexuada. Em suma, cada nova colônia é iniciada por uma larva planctônica produzida sexualmente, que se fixa e se metamorfoseia no zoóide fundador e este, por sua vez, gera outros zoóides por reprodução assexuada formando o arranjo da colônia.<sup>8</sup>

Historicamente, a taxonomia dos briozoários tem sido baseada em características morfológicas das colônias e dos zoóides.<sup>5</sup> Os briozoários são animais lofotrococozoários que se dividem, sistematicamente, em três classes: Phylactolaemata, Stenolaemata e Gymnolaemata, sendo esta última composta pelas ordens Ctenostomata e Cheilostomata.<sup>9,10</sup> A menos diversa é a Phylactolaemata, que compreende cerca de 86 espécies, todas sem calcificação e exclusivas de habitats de água doce<sup>11</sup>; Stenolaemata são em geral fósseis, exceto por alguns membros da ordem Cyclostomata, ambos possuem vida exclusiva em habitats marinhos; e Gymnolaemata, que são predominantemente marinhos.<sup>7,8</sup> Mais de 6000 espécies de briozoários são conhecidas, com novos táxons sendo continuamente descritos, especialmente em regiões que antes eram inacessíveis (e.g. profundezas do mar e a Antártica).<sup>1,5,12</sup>

Figura 1 - Ilustração esquemática do ciclo de vida da *Bugula neritina*. Após a fertilização, os embriões são incubados em ovicelos até serem liberados como larvas. A larva se fixa e se metamorfoseia no zoide fundador da colônia (ancestrula), que dá origem ao restante da colônia por brotamento assexuado.



Fonte: Adaptado da referência [8].

## 1.2 Biossíntese de metabólitos secundários

É do conhecimento da comunidade científica que a maioria dos invertebrados marinhos produzem compostos naturais ativos para uma variedade de funções ecológicas, por exemplo: defesa contra bioincrustação, predadores, parasitas, infecções, competição, dentre outras.<sup>1,3,13</sup> No caso de comunidades bentônicas, estudos apontam que a biossíntese de produtos naturais é mais influenciada por interações bióticas ao invés de fatores ambientais, favorecendo assim a evolução de uma ampla diversidade de mecanismos de defesa físicos e químicos para sua sobrevivência ao longo dos éons.<sup>3</sup>

Uma discussão feita por Williams *et al.* (1989)<sup>15</sup> e posteriormente por Carsten (1991)<sup>14</sup>, baseada em briozoários e nos seus metabólitos conhecidos até então, sugere que os metabólitos primários e secundários não são produzidos de forma estática, como argumenta Williams, mas de maneira dinâmica, segundo Carsten, na luta darwiniana pela sobrevivência de uma população ou indivíduo. Os metabólitos são expressos como resultado do conjunto imediato de estímulos externos que interagem com os receptores metabólicos específicos dos organismos vivos. Carsten argumenta que o padrão de metabólitos expressos pelo organismo depende, tanto qualitativa quanto quantitativamente, dos desafios enfrentados ao longo de seu ciclo de vida. Ou seja, a partir da informação genética armazenada no genoma, a produção de metabólitos busca maximizar o impacto em cada situação ecológica, visando, de forma darwiniana, a propagação da espécie. Mesmo que o custo energético da produção seja prejudicial a um indivíduo isolado.<sup>14,15</sup>

Do ponto de vista quimiotaxonômico, Carsten conclui que o potencial para a biossíntese de qualquer organismo nunca é totalmente expresso. Sob um conjunto definido de condições, apenas os produtos necessários para a sobrevivência imediata do organismo são sintetizados. Dessa forma, a existência de metabólitos secundários pode ser entendida como uma forma de seguro para a propagação da espécie. Além disso, o padrão de metabólitos expressos por diferentes populações pode resultar de estímulos relacionados com mudanças no ecossistema circundante. Assim, mudanças aparentemente infinitesimais podem alterar completamente, tanto quantitativa quanto qualitativamente, o padrão de metabólitos secundários produzidos.<sup>14</sup>

### 1.3 Produtos naturais isolados de briozoários

Uma revisão sistemática realizada por Tian *et al.* (2018)<sup>12</sup> evidencia a versatilidade biossintética desses animais. Nesta revisão, são reportados metabólitos secundários com arranjos estruturais que abrangem lactonas macrocíclicas, esteróides, alcalóides, esfingolipídios, terpenóides lactônicos tetracíclicos e compostos aromáticos contendo enxofre.

Em 1993, Beutler *et al.* isolaram, a partir do gênero *Catenicella*, o composto 1-vinil-8-hidroxi- $\beta$ -carbolina, que apresentou atividade citotóxica moderada contra astrocitoma glioblastoma humano.<sup>16</sup> Todavia, não se conhecem estudos da química da espécie *Catenicella uberrima*. Dentre as 8 espécies estudadas neste projeto, 5 delas (*Nellia* cf. *tenella*, *Schizoporella errata*, *Catenicella uberrima*, *Licornia* aff. *diadema* e *Tubulipora* sp.) possuem poucos artigos na literatura, apenas retratando suas características biológicas; não foram encontrados artigos que descrevam seu perfil químico. Das cinco espécies supracitadas, as quatro primeiras pertencem à classe Gymnolaemata e ordem Cheilostomata; a espécie *Tubulipora* sp. pertence à classe Stenolaemata e à ordem Cyclostomata.

As tambjaminas são alcalóides que possuem uma estrutura principal composta por um sistema 2-2'-bipirrólrico, podendo apresentar 3 anéis pirrólicos (prodigiosinas) ou um dímero com 4 anéis. Até o momento são conhecidos 23 derivados naturais das tambjaminas (A-O, prodigiosinas, YP1 e MYP1). Estes alcalóides já foram isolados de invertebrados marinhos incluindo ascídias, briozoários, nudibrânquios, bactérias terrestre (*Streptomices*-BA-1591) e marinhas (*Pseudoalteromonas* *cítreia* e *Paucibiter aquatile* DH-15).<sup>1,48</sup> As tambjaminas A-D foram inicialmente isoladas dos nudibrânquios *Tambja abdere*, *Tambja eliora*, *Roboastria tigris* e do briozoário *Sessibugula translucens* (coletados na Baía da Califórnia);<sup>5, 17, 19, 22, 48</sup> a tambjamina A, também foi encontrada na espécie *Bugula longissima* coletada na Antártica.<sup>20,48</sup> Subsequentemente, as tambjaminas E-F foram isoladas da ascídia *Atapazoa* sp. e do gênero de nudibrânquio *Nembrotha*.<sup>17-18, 48</sup> As tambjaminas G-J foram isoladas do briozoário *Virididentula dentata* (aka *Bugula dentata*), coletado na ilha da Tasmânia na Austrália.<sup>17,20, 48</sup>

Mais recentemente, a tambjamina J1 foi isolada do nudibrânquio do gênero *Tambja stegosauriformis*.<sup>17, 48</sup> A partir do estudo da espécie *Tambja ceutae*, coletada no arquipélago de Açores (Portugal), foi isolada a tambjamina K.<sup>21, 48</sup> A tambjamina L

foi isolada a partir do nudibrânquio *Tambja capensis* e de seu alimento *Viridentula dentata*. Uma amostra de planta coletada no Japão, levou ao isolamento de uma espécie de *Streptomyces* BA-18591 que culminou no isolamento da tambjamina BE-18591. Anos depois, pesquisadores isolaram, a partir de uma bactéria marinha (*Pseudoalteromonas tunicata*), um análogo estrutural da tambjamina BE-18591, denominada tambjamina YP1. Estudos utilizando métodos metabolômicos realizados pelo grupo do Prof. R. G. S. Berlinck, levaram ao isolamento das tambjaminas M-O.<sup>48</sup>

As tambjaminas, prodigiosinas e seus derivados sintéticos apresentam uma ampla gama de atividades biológicas. O espectro de atividade biológica engloba antibacteriana (Gram+ e -), anti-plasmodial, citotóxica, genotóxica e, devido a possibilidade de atuar como um ligante tri/tetra-dentado, são potentes transportadores transmembranas de ânions.<sup>5,18,48</sup> Os derivados da prodigiosina estão sendo testados em estudos clínicos porque são capazes de atuar como um antagonista de uma família de proteínas apoptóticas.<sup>48</sup>

Em geral, briozoários do gênero *Amathia* de diferentes regiões geográficas contém um vasto número de alcalóides bromados já caracterizados.

Através de estudos de briozoários do gênero *Amathia* realizados na Tasmânia, foram detectados alcalóides com esqueleto derivado de β-feniletilamina. As amathamidas A-F, relacionadas a β-feniletilamina e prolina bromadas, foram isoladas da espécie *A. wilsoni*, *A. tortuosa* e *A. convoluta*.<sup>12,23,24</sup> Outro estudo realizado com a espécie *A. convoluta* levou ao isolamento da amathamida G.<sup>5,25</sup> Interessantemente, alcalóides deste tipo isolados de *A. convoluta* demonstram uma diversidade geográfica de estruturas e diversidade de atividade biológica.

Uma série de seis alcalóides bromados, amathaspiramidas A-F, foi isolada de *A. wilsoni*, coletado na Nova Zelândia.<sup>1,26</sup> A amathaspiramida A, C e F apresentaram atividade citotóxica contra células tumorais.<sup>1,27</sup> Este estudo demonstrou que os fatores estruturais que afetam a atividade biológica destes compostos são a presença do grupo amina/imina no esqueleto da pirrolidina e a estereoquímica do carbono 8R.<sup>1</sup>

As convolutamidas A-F são alcalóides que possuem uma estrutura do tipo *N*-acil-γ-lactâmica com um grupo dibromofenol. Foram isoladas da *A. convoluta*, coletada na Flórida (USA), por Zhang e colaboradores. A mistura do derivado A e B apresentou atividade citotóxica contra células tumorais.<sup>1,28</sup> As convolutamidinas A-D, com um anel oxindol, foram detectadas por Kamano *et al.*<sup>29</sup> e posteriormente por

Zhang e colaboradores. A convolutamidina A apresentou potente atividade citotóxica com excelente índice de seletividade ( $IC_{50}$ ).<sup>1,28,29</sup>

As convolutaminas A-G, derivados bromados da  $\beta$ -feniletilamina, foram reportadas de um estudo com espécies de *A. convoluta* coletadas na Flórida (EUA). As convolutaminas A-D e F apresentaram atividade citotóxica contra células tumorais resistentes à adriamicina e vincristina, bem como atividade antiviral contra o vírus da Pólio Tipo 1.<sup>1,12,26,30-32</sup> A convolutamina F também apresentou atividade inibitória contra a divisão celular de ovos fertilizados de ouriços do mar.<sup>32</sup> Recentemente foram isoladas as convolutaminas I-J de uma espécie de *A. tortuosa* coletada no Oceano do Sul, sendo esta, ativa como um potencial inibidor competitivo do ATP.<sup>1,12</sup>

As alternamidas A-D, derivados indólicos, isoladas de *A. alternata*, apresentaram atividade antibacteriana contra diversas bactérias Gram-positivas incluindo *S. aureus*, *B. subtilis* e *E. faecium*.<sup>5,33</sup>

As briostatinas são a classe mais conhecida de compostos derivados de briozoários marinhos e são os candidatos mais promissores isolados de briozoários para serem utilizados como agentes anticancerígenos devido a sua potente atividade citotóxica contra células tumorais.<sup>1</sup> O interesse no estudo de briozoários marinhos iniciou em 1968, quando Pettit *et al.* descobriram a atividade citotóxica do extrato obtido de dois briozoários coletados na Califórnia, *Bugula neritina* e *Amathia convoluta*.<sup>35</sup>

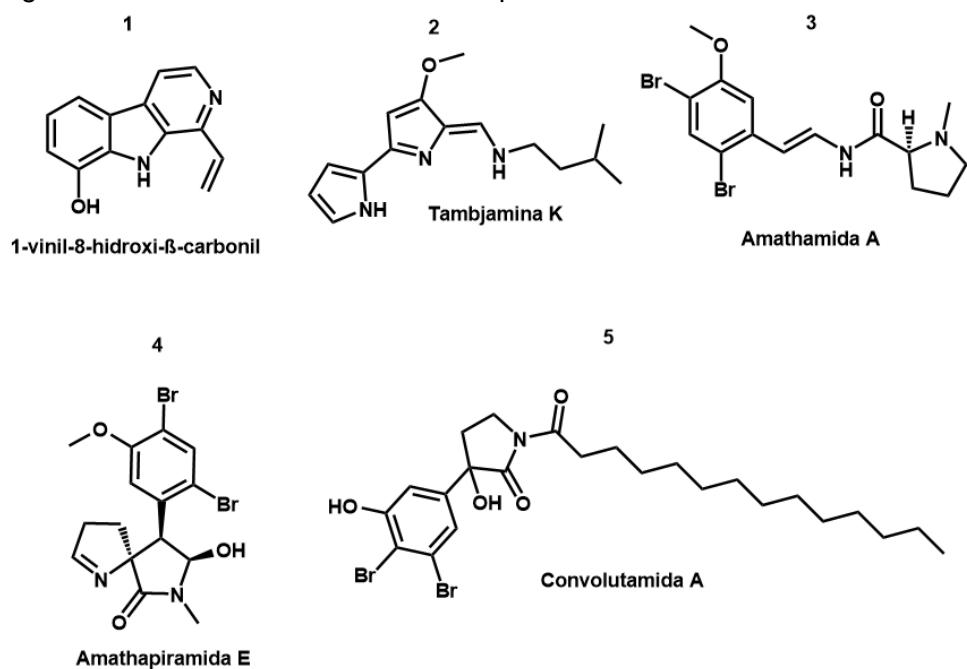
A primeira lactona macrocíclica isolada, briostatina 1, foi identificada da espécie *B. neritina* por Pettit *et al.* em 1982.<sup>35</sup> Após 14 anos estudando as lactonas macrocíclicas, Pettit *et al.* identificaram 18 análogos da estrutura (1-18) e avaliaram sua atividade citotóxica.<sup>[36]</sup> Durante a investigação de constituintes antineoplásicos de *B. neritina* do mar do Sul da China, Lin *et al.* isolaram a briostatina 19, um novo macrolídeo com alta atividade citotóxica contra células tumorais *in vivo*.<sup>37</sup> Um estudo realizado com as larvas da *B. neritina*, conduzido por Lopanik *et al.*, levou ao isolamento de um novo derivado - briostatina 20 - que é impalatável para peixes.<sup>38</sup> Recentemente, quatro novas lactonas macrocíclicas foram identificadas de *B. neritina* coletada do mar do Sul da China, são elas: briostatina 21, 9-O-metilbriostatina 4, 16 e 17.<sup>12</sup>

Esta classe de macrolídeos altamente oxigenados, são policetídeos complexos baseados em uma macrolactona de 20 carbonos.<sup>1,34</sup> As briostatinas apresentam três anéis pirano funcionalizados separadamente, sendo esses interconectados por um

alceno (*E*)-dissubstituído e por um metileno ligado em ponte. Todos os membros da família também contêm um par de metilas geminais nos carbonos C8 e C18.<sup>34</sup> O estudo da relação estrutura-atividade desses policetídeos é de grande importância para estas moléculas devido ao espectro de atividade destes compostos.<sup>1</sup> Desta forma, alguns estudos sugerem que o grupo  $\alpha$ -metil no carbono C28 e a  $\alpha$ -hidroxila no carbono C9 são cruciais para a citotoxicidade destes compostos. A grande diferença entre todos os derivados de briostatinas reside nos substituintes dos carbonos C7 e C20.<sup>34</sup>

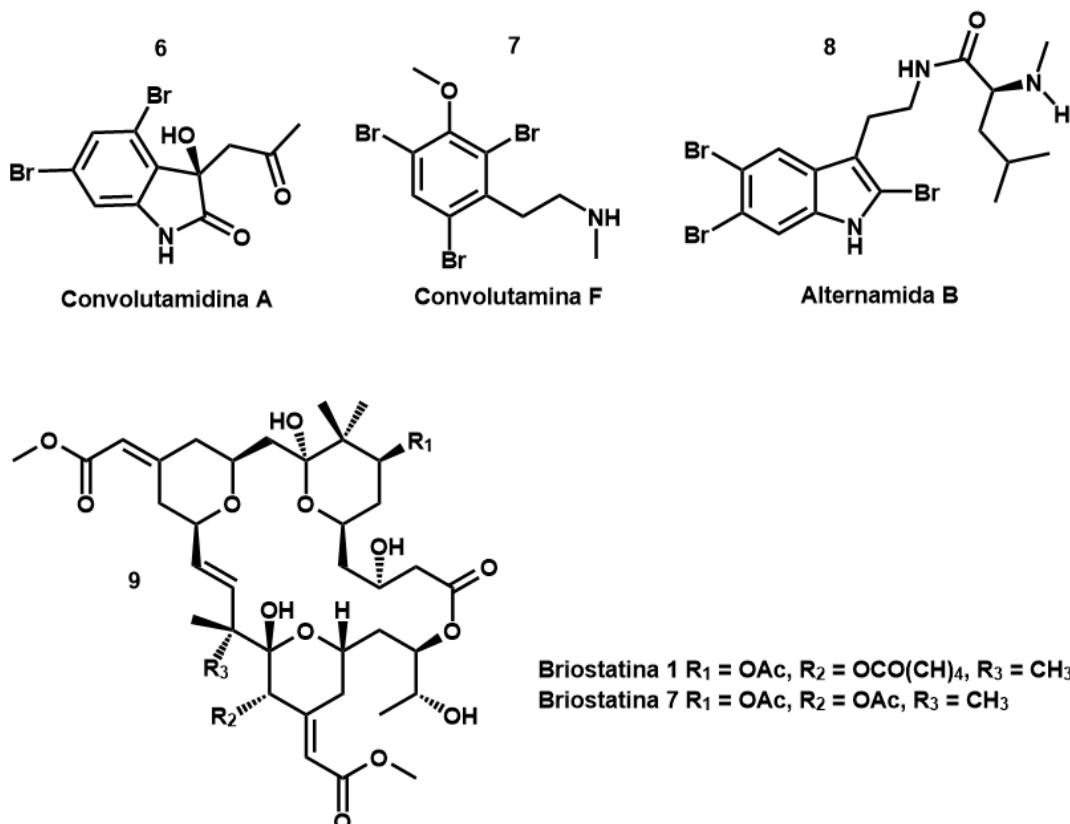
As briostatinas são capazes de modular, seletivamente, a função de várias isoenzimas do grupo das proteínas quinase C (PKC).<sup>1</sup> Estas enzimas possuem um papel importante na regulação de crescimento e morte celular. Em particular, a atividade antitumoral destes compostos é uma consequência da afinidade química com as enzimas PKC, de todos os derivados conhecidos, as briostatinas 1 e 7 são as estruturas com maior afinidade com este grupo de enzimas.<sup>1,12,34</sup> Recentemente, foi descoberto que anomalias no funcionamento e na expressão das isoenzimas PKC podem ser correlacionadas a diversas doenças como câncer, diabetes e doença de Alzheimer.<sup>34,39-41</sup> Além de sua afinidade com o grupo PKC, estes compostos são capazes de induzir a diferenciação celular e promover apoptose em diversas células tumorais humanas, apresentam propriedades imunomodulatórias e são interessantes em estudos de sinergia de fármacos oncológicos (vincristina, paclitaxel, gemcitabina) para o tratamento de diferentes tipos de câncer.<sup>1,42-45</sup>

Figura 2 – Estruturas selecionadas de produtos naturais isolados de briozoários.



Fonte:  
Autoria própria.

Figura 3 – Estruturas selecionadas de produtos naturais isolados de briozoários.



Fonte: Autoria própria.

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos do projeto desta monografia de fim de curso são aqui apresentados:

- Realizar a análise por HPLC-UV-MS das frações obtidas a partir do fracionamento inicial do extrato orgânico das espécies de briozoários;
- Seleção das espécies de interesse para o isolamento dos metabólitos secundários de interesse;
- Purificação das frações de interesse através de HPLC-UV;
- Análise espectroscópica completa dos compostos isolados para a completa elucidação estrutural;
- Análise dos espectros de MS/MS, de forma a estabelecer parâmetros e correlações, bem como propor mecanismos de fragmentação dos compostos isolados e identificados.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Coleta**

Espécimes de briozoários foram coletados por mergulho autônomo, entre 2 e 16 metros de profundidade, nas localidades de São Sebastião e Ilhabela. Foi realizada a busca ativa dos briozoários, retirando-os do substrato utilizando uma espátula, e armazenando todo material em sacos plásticos identificados. Todo material coletado foi levado *in vivo* ao laboratório (CEBIMar - USP), para triagem das colônias em bandejas plásticas e água do mar. Cada espécie teve a confirmação da identificação realizada sob estereomicroscópio, com cada espécie triada utilizando pinças e pincéis. Todo o material triado, representado por 1 voucher para dados morfológicos e moleculares (acondicionado em álcool), e 1 voucher (o máximo de volume possível) acondicionado em sacos plásticos e congelado para análises bioquímicas. Ao total, foram obtidas quinze amostras biológicas para estudos químicos. A coleta e identificação dos briozoários coletados foi realizada pelo Professor Leandro Vieira e seu aluno Everthon de Albuquerque Xavier (do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pernambuco).

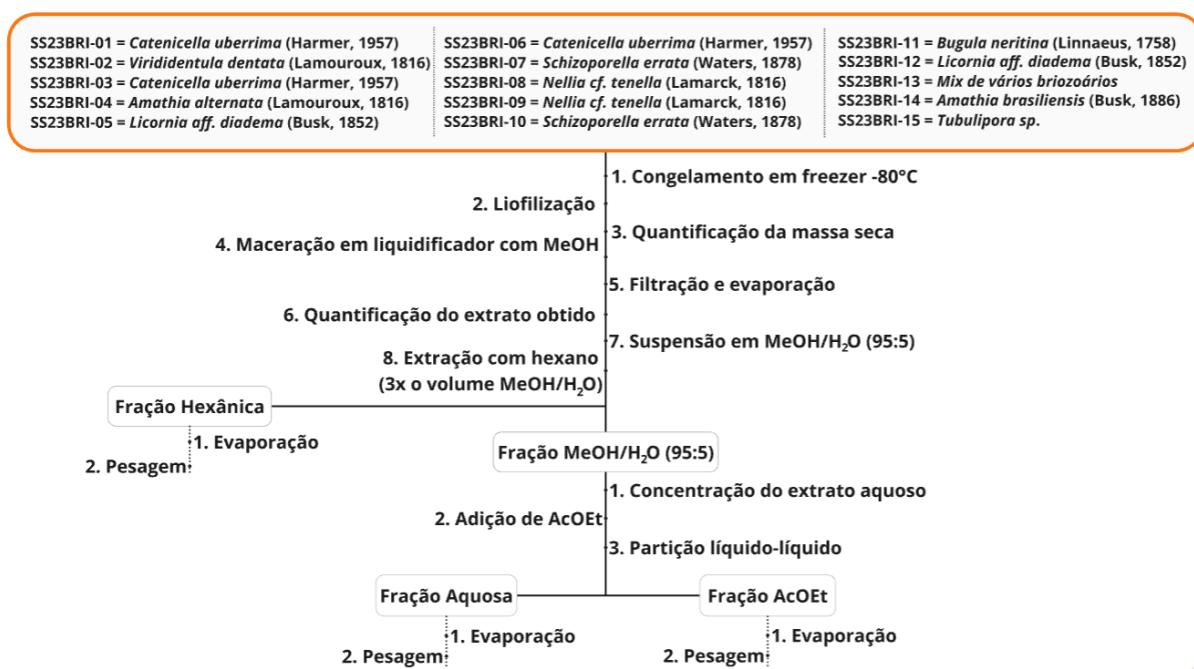
#### **3.2 Extração e Fracionamento**

Os briozoários *Catenicella uberrima*, *Virididentula dentata*, *Amathia alternata*, *Licornia aff. diadema*, *Schizoporella errata*, *Nellia cf. tenella*, *Bugula neritina*, *Amathia brasiliensis*, *Tubulipora* sp. e uma amostra complexa contendo várias espécies, foram transportados aos laboratórios do Centro de Biologia Marinha da USP (em São Sebastião), triados e congelados em freezer -80°C. Uma vez nos laboratórios do QOSBio, a amostra biológica foi liofilizada até sua secagem completa, com a subsequente quantificação de sua massa seca.

O material seco de cada espécie biológica foi submerso em MeOH e triturado em liquidificador de aço inoxidável. O material particulado foi extraído exaustivamente com MeOH em banho de ultrassom e filtrado a vácuo em funil de Büchner. O extrato obtido foi concentrado por rotoevaporação e submetido a uma partição líquido-líquido com hexano (3x, 1/3 do volume do extrato MeOH). A fração hexânica foi evaporada, quantificada e armazenada. A fração MeOH remanescente foi completamente

evaporada e quantificada. Por conseguinte, o extrato foi ressuspensido em MeOH/H<sub>2</sub>O (95:5, v/v) e submetido a uma partição líquido-líquido, realizada em triplicata, com AcOEt. Após esta etapa, ambos os extratos, AcOEt e aquoso, foram secos, quantificados e armazenados em geladeira a 4°C. Este procedimento está sumarizado na Figura 4 e a quantificação, ilustrada na Tabela 1.

Figura 4 - Metodologia de extração e fracionamento dos espécimes de briozoários coletados em São Sebastião.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 1 – Resultado obtido após o fracionamento inicial das espécies.

CLASSIFICAÇÃO	Massa seca (g)	Fração Hexânica (g)	Fração Aquosa (g)	Fração AcOEt (g)
SS23BRI-01 = <i>Catenicella uberrima</i> (Harmer, 1957)				
SS23BRI-02 = <i>Virididentula dentata</i> (Lamouroux, 1816)	10,0	0,1616	1,0518	0,0466
SS23BRI-03 = <i>Catenicella uberrima</i> (Harmer, 1957)	67,8	1,6271	21,6722	0,8360
SS23BRI-04 = <i>Amathia alternata</i> (Lamouroux, 1816)	2,4	0,0445	0,4769	0,0328
SS23BRI-05 = <i>Licornia aff. diadema</i> (Busk, 1852)	47,8	0,2597	4,6241	0,2798
SS23BRI-06 = <i>Catenicella uberrima</i> (Harmer, 1957)	45,0	0,4360	3,5522	0,1387
SS23BRI-07 = <i>Schizoporella errata</i> (Waters, 1878)	44,8	0,1736	1,3101	0,1449
SS23BRI-08 = <i>Nellia cf. tenella</i> (Lamarck, 1816)	2,1	0,0218	0,0671	0,0079
SS23BRI-09 = <i>Nellia cf. tenella</i> (Lamarck, 1816)	118,4	0,9168	11,7416	0,4519
SS23BRI-10 = <i>Schizoporella errata</i> (Waters, 1878)	140,8	0,2993	3,3939	0,1647
SS23BRI-11 = <i>Bugula neritina</i> (Linnaeus, 1758)	28,0	0,5463	2,9615	0,3153
SS23BRI-12 = <i>Licornia aff. diadema</i> (Busk, 1852)	52,4	0,3871	4,9428	0,1457
SS23BRI-13 = Mix de vários briozoários			-	
SS23BRI-14 = <i>Amathia brasiliensis</i> (Busk, 1886)	70,2	0,2780	5,9742	0,4041
SS23BRI-15 = <i>Tubulipora</i> sp.	22,4	0,4642	2,4452	0,2115

Fonte: Autoria própria.

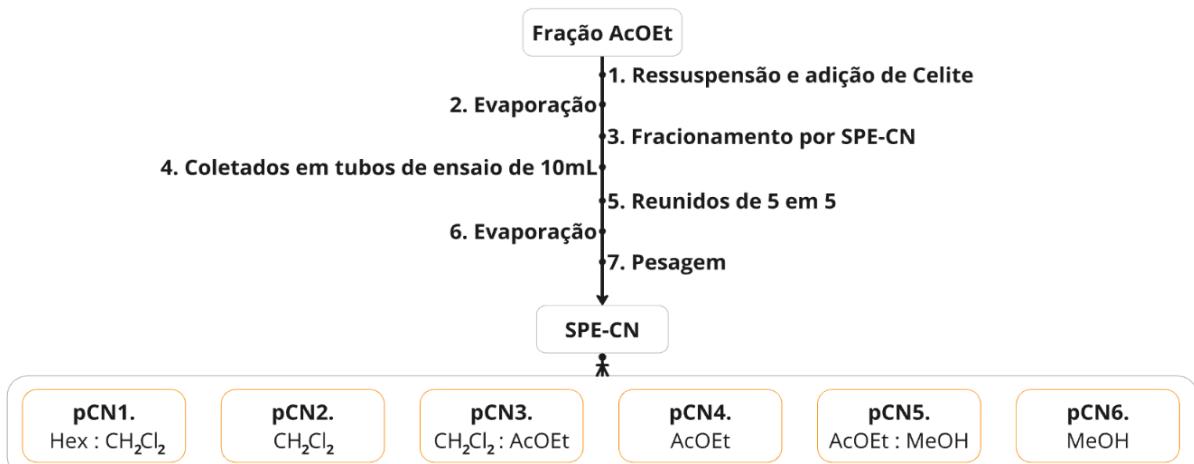
### 3.3 Fracionamento do extrato orgânico por cromatografia em fase normal

Após o processo de extração, evaporação e secagem dos extratos – Figura 4 e Tabela 1 - os extratos AcOEt das espécies de briozoários codificadas BRI-02, BRI-04 e BRI-08 apresentaram massa menor que 50 mg. Para as demais espécies, o extrato orgânico foi ressuspensionado em MeOH e, a este, foi adicionado Celite 545 (Synth®) equivalente ao dobro de massa do extrato. Em sequência, a amostra foi completamente seca em SpeedVac.

O extrato adsorvido em celite foi submetido a uma extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*), utilizando-se uma coluna com fase estacionária de sílica-gel derivatizada com grupos cianopropila (SPE-CN, Phenomenex®). A coluna foi condicionada utilizando-se 150 mL de MeOH e 150 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Hexano. O processo de fracionamento foi realizado utilizando um gradiente em fase normal de polaridade. Os eluentes utilizados nesta etapa foram: 1) Hexano/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 2) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; 3) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/AcOEt; 4) AcOEt; 5) AcOEt/MeOH; 6) MeOH.

Foram utilizados 50 mL de cada eluente. Cada uma das frações eluídas com cada um dos eluentes foram coletadas em tubos de ensaio de 10 mL. O processo de separação forneceu 5 tubos por eluente e totalizou 6 subfrações por espécie. Em sequência, todas as subfrações foram evaporadas, secas, quantificadas, suspensas em MeOH e uma alíquota de cada fração foi analisada por HPLC-UV-MS para obtenção do seu perfil químico. Frações de interesse foram selecionadas para isolamento e purificação de seus metabólitos. Este procedimento está summarizado na Figura 5.

Figura 5 - Metodologia de fracionamento do extrato bruto AcOEt.



Fonte: Autoria Própria.

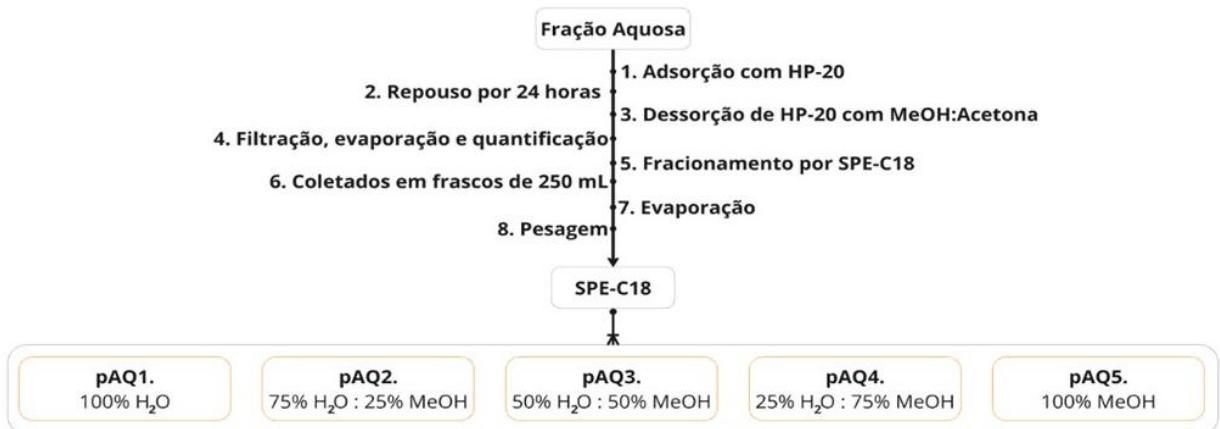
### 3.4 Fracionamento do extrato aquoso por cromatografia em fase reversa

A análise do perfil químico das sub-frações obtidas após o fracionamento por SPE-CN forneceu cromatogramas apresentando sinais cromatográficos, associados a seus respectivos espectros no UV e espectros de massas. Em função dos resultados obtidos a partir das análises realizadas por HPLC-UV-MS, foram selecionadas duas espécies de briozoários para investigação de seus respectivos extratos aquosos: as espécies *Nellia* cf. *tenella* e *Amathia brasiliensis*.

O extrato aquoso remanescente da extração do material biológico originalmente extraído foi ressuspensionado em H<sub>2</sub>O e, a este, foi adicionada a resina adsorptiva HP-20, na proporção 10-20% de massa/volume da fração aquosa. A resina foi mantida na suspensão aquosa durante 24 horas. Em seguida, a mistura resina + suspensão aquosa foi filtrada em funil de Büchner sobre papel filtro. A resina filtrada foi recuperada, transferida para um béquer e extraída com MeOH/acetona (1:1, v/v) em banho de ultrassom. O extrato obtido foi evaporado, seco e quantificado.

O extrato da resina HP-20 foi então submetido a uma extração em fase sólida (SPE, *solid phase extraction*) utilizando-se como fase estacionária sílica-gel derivatizada com grupos octadecilsilano (SPE-C18, Strata<sup>®</sup>). A coluna foi condicionada utilizando-se 150 mL de MeOH, 150 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) e 150 mL de H<sub>2</sub>O. O processo de fracionamento foi realizado utilizando-se um gradiente em fase reversa de polaridade. Os eluentes utilizados nesta etapa foram: 1) 100% H<sub>2</sub>O (esta fração foi descartada por conter apenas sais e metabólitos primários, como aminoácidos, açúcares, nucleosídeos e outros); 2) 75% H<sub>2</sub>O + 25% MeOH; 3) 50% H<sub>2</sub>O + 50% MeOH; 4) 25% H<sub>2</sub>O + 75% MeOH; 5) 100% MeOH. Foi utilizado volume de eluente proporcional à massa da fração após o procedimento de adsorção-dessorção. As subfrações obtidas foram coletadas em frascos Schott<sup>®</sup> de 250 mL, totalizando 5 frações por extrato da resina HP-20. Todas as subfrações foram evaporadas, secas e analisadas via HPLC-UV-MS para obtenção de seu perfil químico. Este procedimento está sumarizado na Figura 6.

Figura 6 - Metodologia de fracionamento do extrato bruto aquoso dos briozoários *Nellia cf. tenella* e *Amathia brasiliensis*.



Fonte: Autoria Própria.

### 3.5 Análises por HPLC-UV-ELSD-MS

As análises por HPLC-UV-MS foram realizadas utilizando-se um sistema cromatográfico da marca Waters® com sistema de controle Alliance, modelo Waters 2695, acoplado com detector espectrofotométrico UV-visível, modelo Waters 2996, com detector de arranjo de fotodiodos (varredura entre  $\lambda_{\text{max}}$  200 a 400 nm) acoplado em série com um detector de espalhamento de luz (ELSD), modelo Waters 2424, também acoplado em série com um detector de espectrometria de massas modelo Waters Micromass ZQ 2000, operado utilizando a plataforma Empower 2.0(Waters®).

O espectrômetro de massas (MS) foi ajustado para seguintes condições específicas: voltagem do capilar 3,00 kV; temperatura na fonte 100 °C; temperatura de dessolvatação 350 °C; ionização por eletrospray (ESI) operando nos modos positivo e negativo; detecção na faixa de 100-1000 Da e 400-1400 Da. A aquisição de dois cromatogramas de íons totais (TIC) é obtida via o modo de detecção positivo (ES+) e negativo (ES-) do espectrômetro de massas. O fluxo de gás no cone e na dessolvatação foi de 50 e 350 L/h. As análises foram realizadas utilizando-se uma coluna de fase reversa RP18 (Waters® X-terra, 250 x 4,6 mm, 5 µm) com fluxo móvel de 1 mL/min. A eluição foi realizada com fase móvel composta de (A) H<sub>2</sub>O e (B) MeOH/MeCN (1:1, v/v). O gradiente utilizado foi: 0 - 1,0 min com 90% de A, gradiente linear até 90% de B de 1,0 – 22,0 min, de 22,0 – 25,0 min manteve-se 100% de B e de 25,0 – 34,0 min manteve-se 10% de A para recondicionamento da coluna,

totalizando 40 minutos de análise. O volume de amostra injetado foi de 15  $\mu$ L de uma solução de concentração de 1,5 a 2,0 mg/mL.

### 3.9 Purificação por HPLC-UV

Para as purificações das frações desejadas, utilizou-se um sistema cromatográfico Waters® acoplado a um detector espectrofotométrico de UV (detecção em dois comprimentos de onda entre 200 e 400 nm). Os dados foram processados e adquiridos pelo software Millenium 1.0 (Waters®). Cada fração foi purificada com coluna e fase móvel distintas. Foram realizados os seguintes procedimentos para a purificação de cada uma das frações:

- Fração SS23BRI09-pCN5: Isocrático de 0 - 1,0 min com 90% de H<sub>2</sub>O e 10% MeOH/MeCN (1:1, v/v), de 1,0 a 22,0 min um gradiente linear de MeOH/MeCN (1:1, v/v) em H<sub>2</sub>O, até 100% MeOH/MeCN (1:1, v/v). De 22,0 a 25,0 min manteve-se em 100% de MeOH/MeCN (1:1, v/v). De 25,0 a 34,0 min voltou-se à condição inicial para recondicionamento da coluna. Cromatogramas no UV registrados em  $\lambda_{\text{max}}$  de 230 e em 250 nm. Coluna analítica XTerra® RP18 (5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  250 mm).
- Fração BRI09-pCN5-[b2 e b3]: Isocrático de 0 a 1,0 min com 90% de H<sub>2</sub>O e 10% MeOH/MeCN (1:1, v/v), de 1,0 a 35,0 min com H<sub>2</sub>O/MeOH/MeCN (58:29:13, v/v/v), de 35,0 a 40,0 min voltou-se à condição inicial. Cromatogramas no UV registrados em  $\lambda_{\text{max}}$  de 230 nm e em 345 nm. Coluna analítica XTerra® RP18 (5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  250 mm).
- Fração BRI09-pCN5-[b2-3 e b3-II]: Isocrático de 0 a 25,0 min com H<sub>2</sub>O/MeCN (68:32, v/v), de 25,0 a 64,0 min com H<sub>2</sub>O/MeCN (40:60, v/v). De 64,0 a 70,0 min manteve-se H<sub>2</sub>O/MeCN (68:32, v/v). Cromatogramas no UV registrados em  $\lambda_{\text{max}}$  de 230 e em 345 nm. Coluna analítica Inertsil® Ph-3 (5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  250 mm).

### 3.10 Análises por UPLC-ESI-QToF-MS

Para as análises por UPLC-ESI-QToF-MS (Waters<sup>®</sup>), as frações de interesse foram analisadas em um cromatógrafo líquido modelo *Acquity UPLC H-class*, acoplado a um espectrômetro de massas *Xevo<sup>®</sup> G2-XS Q-ToF* com uma fonte de ionização por *electrospray (ESI)* nos modos positivo e negativo.

Para o espectrômetro de massas, utilizou-se o modo *Data Dependent Acquisition (DDA)* e o modo *Data Independent Acquisition (MSe) MS/MS*, com as configurações: faixa de detecção de 500-2000 Da; voltagem de cone 30V e de capilar 1,2kV; temperatura da fonte de 100°C e de dessolvatação de 450°C; fluxo de gás do cone de 50L/h e de dessolvatação de 750 L/h.

Para as análises cromatográficas, foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 (UPLC BEH Waters<sup>®</sup>, 2,1 mm x 100 mm, 1,7  $\mu$ m) com fase móvel constituída de (A) H<sub>2</sub>O grau MS com 0,1% de ácido fórmico e (B) MeCN grau MS com 0,1% de ácido fórmico. O gradiente utilizado foi de 10 a 100% de B por 9 minutos, e 10% de B por 1 minuto, a fim de se recondicionar a coluna.

### 3.11 Solventes

Para o preparo e fracionamento do extrato bruto das espécies, utilizou-se os seguintes solventes de grau analítico: MeOH, n-hexano, AcOEt, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, acetona e EtOH (Êxodo<sup>®</sup> e/ou Synth<sup>®</sup>). Para detecção e separação dos metabólitos de interesse através do sistema cromatográfico HPLC-UV-ELSD, utilizou-se os solventes de grau HPLC: MeOH (J.T.Baker<sup>®</sup>), MeCN (J.T.Baker<sup>®</sup>), ácido fórmico (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) e água purificada em MilliQ (Millipore<sup>®</sup>). Para análise via UPLC-ESI-QToF-MS, utilizou-se os solventes de grau UPLC: MeOH (Merck<sup>®</sup>), MeCN (Merck<sup>®</sup>), ácido fórmico (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) e água purificada em MilliQ (Millipore<sup>®</sup>).

### 3.12 Análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de RMN-<sup>1</sup>H e RMN-<sup>13</sup>C foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (DQ/UFSCar), sob coordenação do prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira, num espectrômetro de 14,1 Tesla (600 MHz na frequência do <sup>1</sup>H, modelo AVANCE III, Bruker<sup>®</sup>). Os dados obtidos foram processados utilizando-se o software TopSpin 4.1.4. Para estas análises, as amostras foram secas em dessecador por 10 h e posteriormente solubilizadas em 200  $\mu$ L de DMSO-*d*<sub>6</sub> ou 200  $\mu$ L de MeOH-*d*<sub>4</sub>.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Análises por HPLC-UV-MS

O processo de fracionamento via SPE-CN (Figura 5) foi realizado para todas as espécies de estudo. Após a obtenção das subfrações, foram preparadas alíquotas das frações com massa suficiente para análises por HPLC-UV-MS. O perfil químico obtido destes cromatogramas possibilitou uma análise da literatura e em bancos de dados (CHEMnetBASE) utilizando o gênero e a espécie dos briozoários, padrões de fragmentação por espectrometria de massas e perfil de absorção no UV com o intuito de averiguar dados químicos pré-existentes na literatura destas espécies de briozoários. Após esta análise, selecionamos as subfrações mais interessantes do ponto de vista químico para dar prosseguimento ao trabalho.

Após uma busca exaustiva sobre artigos de metabólitos isolados de espécies de briozoários relacionados às espécies por nós coletadas, apenas as espécies *Virididentula dentata*<sup>17</sup> e *Catenicella cribaria*<sup>16</sup> apresentaram artigos de investigação química. As outras cinco espécies restantes (*Catenicella uberrima*, *Licornia* aff. *diadema*, *Schizoporella errata*, *Nellia* cf. *tenella*, *Tubulipora* sp.) apresentam, até a elaboração deste documento, apenas artigos retratando as características biológicas desses animais. Desta forma, após análise dos cromatogramas das análises HPLC-UV-MS obtidos para as espécies de briozoários, foi selecionada a espécie *Nellia* cf. *tenella* (SS23BRI08 e 09), Tabela 2, para um estudo mais aprofundado de seus metabólitos secundários.

Tabela 2 – Resultado obtido após o fracionamento inicial da espécie *Nellia* cf. *tenella*.

Espécies selecionadas	Massa inicial (mg)	SPE-CN	Massa das subfrações (mg)	Total (mg)
BRI09	0,4519	pCN1	167,2	336,1
		pCN2	18,4	
		pCN3	29,3	
		pCN4	6,5	
		pCN5	87,2	
		pCN6	27,5	
BRI08-AcOEt	0,0079		Insuficiente	7,9

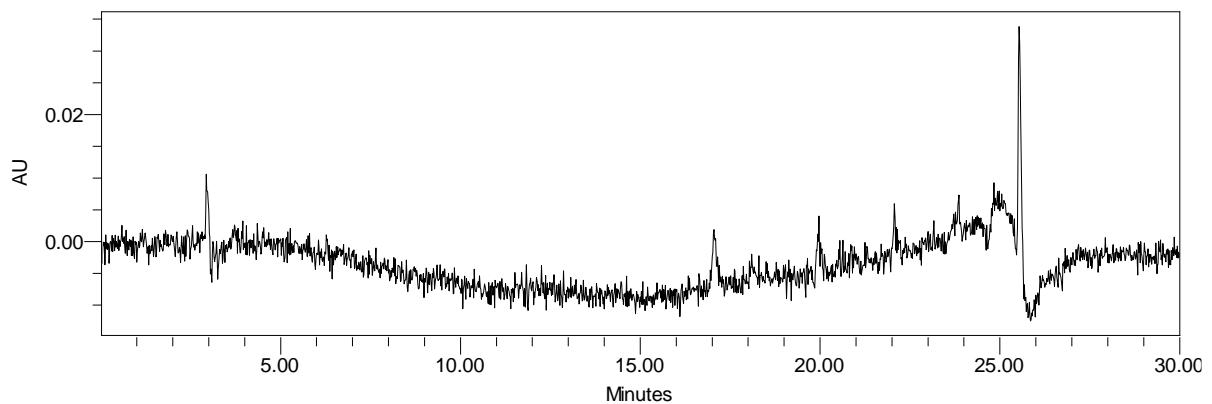
Fonte: Autoria Própria.

## 4.2 *Nellia* cf. *tenella*

### 4.2.1 Fração orgânica SS23BRI08AcOEt

A análise por HPLC-UV da amostra SS23BRI08AcOEt forneceu o seguinte cromatograma (Figura 7).

Figuras 7 – Cromatograma monitorado em 263 nm do extrato orgânico de SS23BRI08.



O cromatograma da amostra SS23BRI08AcOEt utilizando detecção por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+) é ilustrado na Figura 8. Espectros de massas de picos cromatográficos selecionados são apresentados na Tabela 3.

Figuras 8 – Cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo (MS+) do extrato do briozoário *Nellia* cf. *tenella* (SS23BRI08AcOEt).

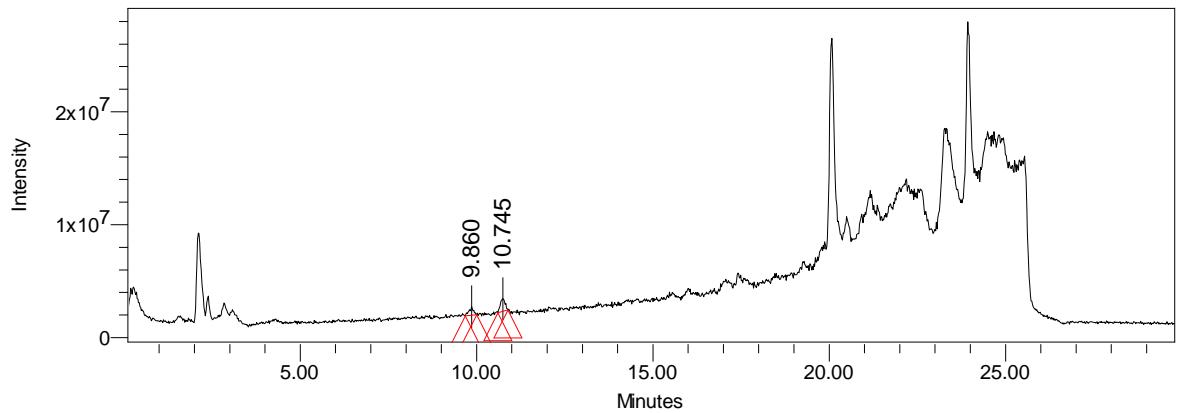
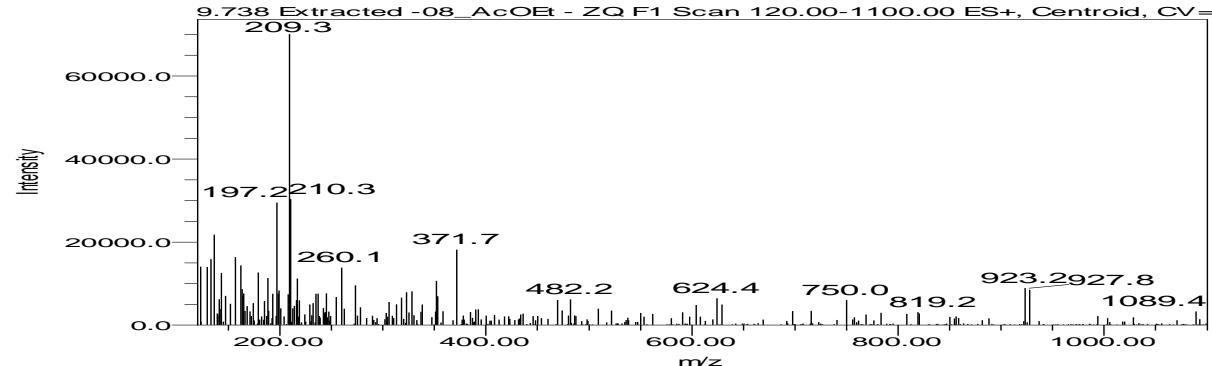
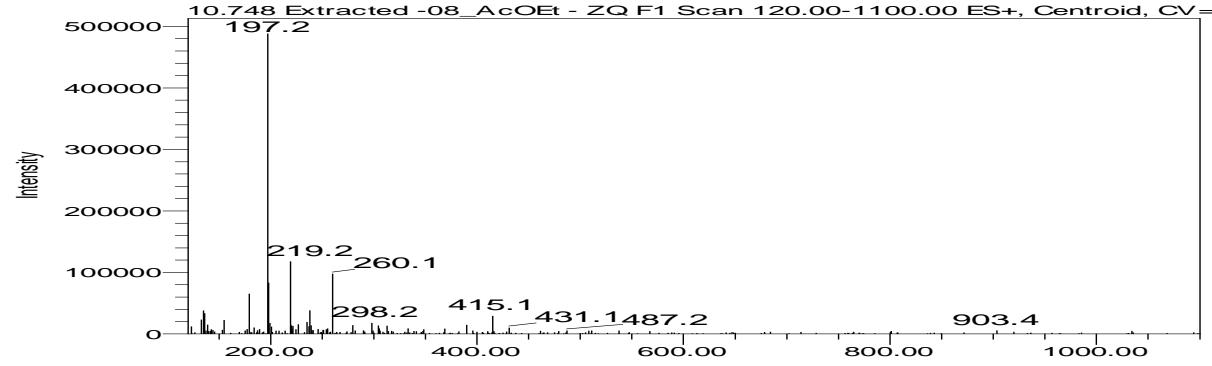


Tabela 3 - Espectros de massas de picos selecionados do cromatograma HPLC-UV-MS do extrato orgânico de *Nellia* cf. *tenella* (SS23BRI08).

Fração	Pico de referência	Tempo de retenção	Absorção no UV	Espectro de massas MS+
<b>BRI08</b>	1	9,738	-	 <p>9.738 Extracted -08_AcOEt - ZQ F1 Scan 120.00-1100.00 ES+, Centroid, CV=30</p> <p>209.3</p> <p>197.2 210.3</p> <p>260.1 371.7</p> <p>482.2 624.4</p> <p>750.0 819.2</p> <p>923.2 927.8</p> <p>1089.4</p> <p>m/z</p>
<b>BRI08</b>	2	10,748	-	 <p>10.748 Extracted -08_AcOEt - ZQ F1 Scan 120.00-1100.00 ES+, Centroid, CV=30</p> <p>197.2</p> <p>219.2 260.1</p> <p>298.2 415.1</p> <p>431.1 487.2</p> <p>903.4</p> <p>m/z</p>

**Figura 9.** Espectro de massas do pico detectado em 9,738 minutos no cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+).

**Figura 10.** Espectro de massas do pico detectado em 10,748 minutos no cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+).

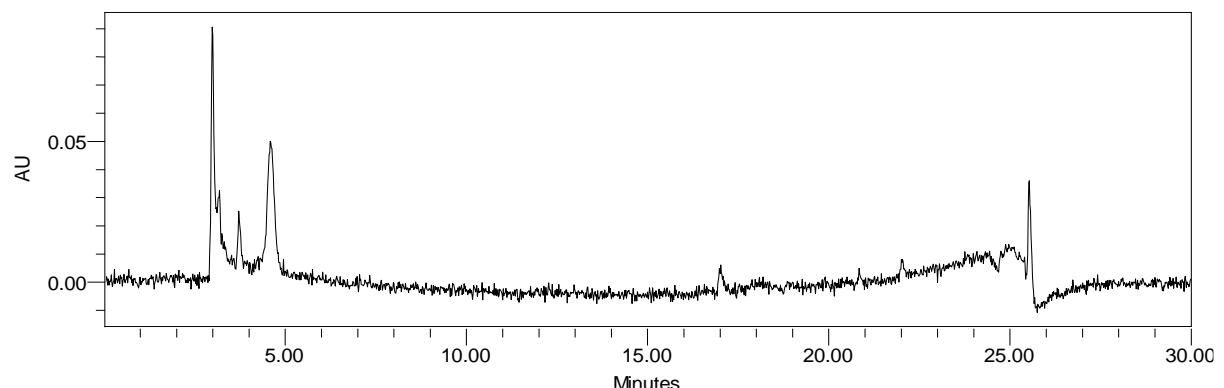
A análise por HPLC-UV-MS do extrato orgânico do briozoário *Nellia* cf. *tenella* (espécime SS23BRI08) apresentou pequena diversidade de metabólitos secundários. Os espectros de massas das figuras 9 e 10 exemplificam a presença de metabólitos pouco interessantes ( $m/z < 300$  Da) nesta fração.

#### 4.2.2 *Nellia* cf. *tenella* (amostra SS23BRI09)

##### 4.2.2.1 Fração SS23BRI09-pCN4

A análise por HPLC-UV da subfração pCN4 do extrato bruto do briozoário *Nellia* cf. *tenella* (amostra SS23BRI09) forneceu o seguinte cromatograma (Figura 11).

Figuras 11 – Cromatograma monitorado por UV ( $\lambda_{\text{max}}$  263 nm) da fração SS23BRI09-pCN4 do extrato do briozoário *Nellia* cf. *tenella* (amostra SS23BRI09).



O cromatograma da mesma fração utilizando detecção por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+) é ilustrado na Figura 12. Espectros de massas de picos cromatográficos selecionados são apresentados na Tabela 5.

Figuras 12 – Cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+) da fração SS23BRI09-pCN4.

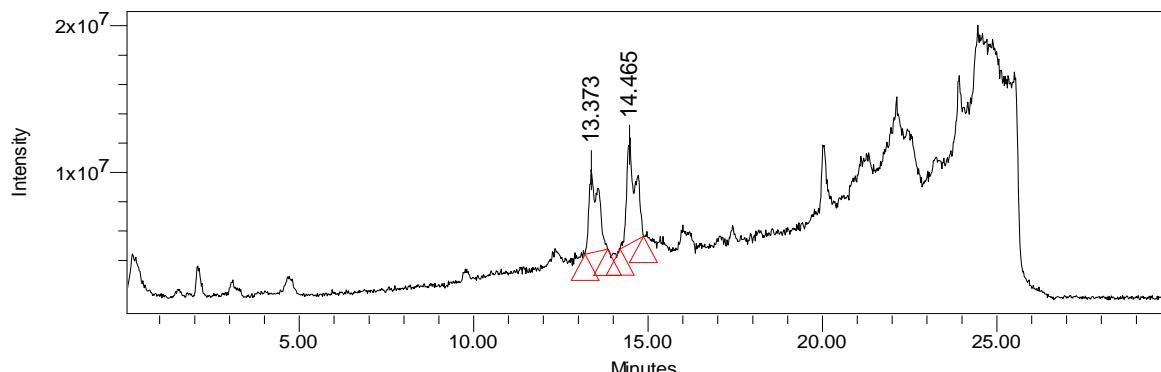
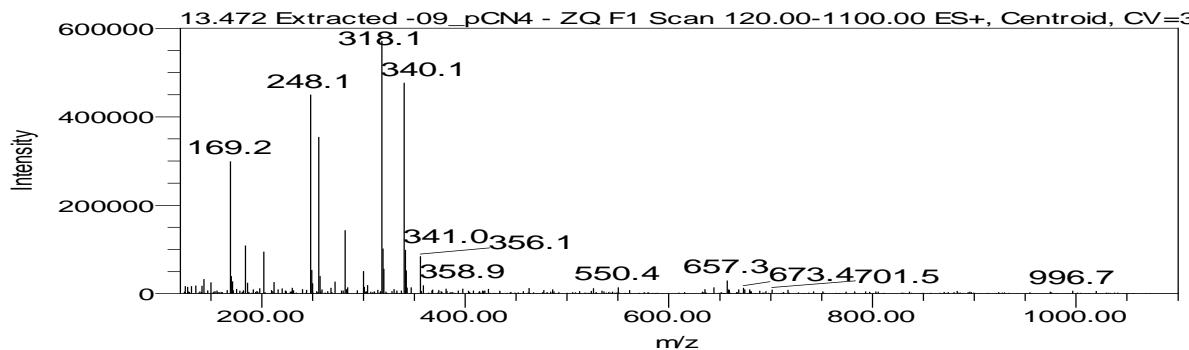
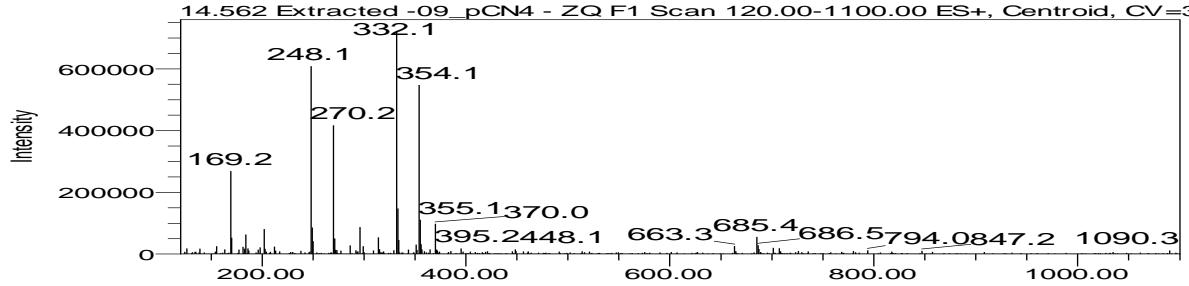


Tabela 4 - Espectros de massas de picos selecionados do cromatograma HPLC-UV-MS da fração SS23BRI09-pCN4 de *Nellia cf. tenella* (amostra SS23BRI09)

Fração	Pico de referência	Tempo de retenção	Absorção no UV	Espectro de massas MS+
BRI09pCN4	1	13,472	-	 <p>13.472 Extracted -09_pCN4 - ZQ F1 Scan 120.00-1100.00 ES+, Centroid, CV=30</p> <p>318.1 248.1 340.1 169.2 341.0 356.1 358.9 550.4 657.3 673.4 701.5 996.7</p>
BRI09pCN4	2	14,562	-	 <p>14.562 Extracted -09_pCN4 - ZQ F1 Scan 120.00-1100.00 ES+, Centroid, CV=30</p> <p>332.1 248.1 270.2 354.1 169.2 355.1 370.0 395.2 448.1 663.3 685.4 686.5 794.0 847.2 1090.3</p>

**Figura 13.** Espectro de massas do pico detectado em 13,373 minutos no cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+).

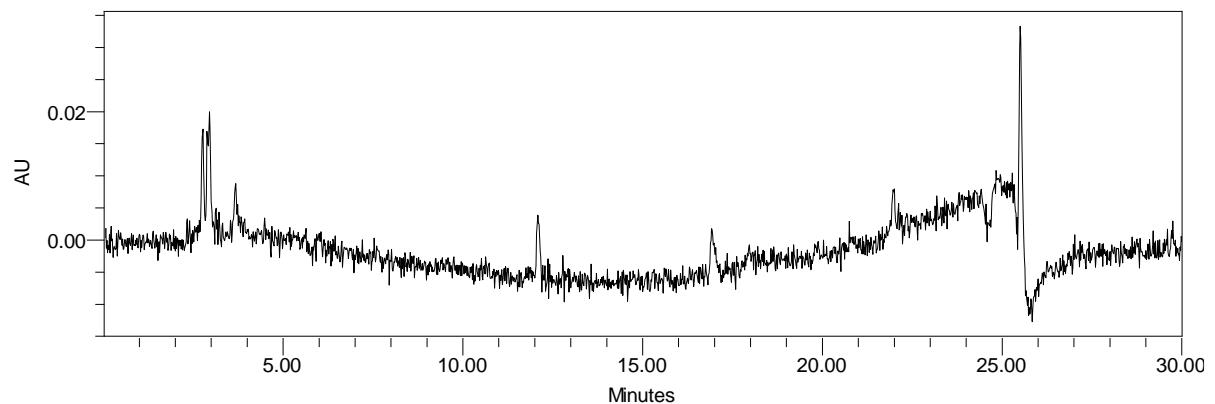
**Figura 14.** Espectro de massas do pico detectado em 14,562 minutos no cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+).

A análise por HPLC-UV-MS das subfrações [pCN1→pCN6] da espécie *Nellia* cf. *tenella* (amostra SS23BRI09) indicou que as subfrações pCN1, pCN2, pCN3 e pCN6 apresentavam baixa diversidade de metabólitos com razão massa carga de interesse. Por isso, foram selecionadas as subfrações pCN4 e pCN5 para purificação.

#### 4.2.2.2 SS23BRI09-pCN5

A análise por HPLC-UV da subfração SS23BRI09-pCN5 forneceu o seguinte cromatograma (Figura 15).

Figuras 15 – Cromatograma monitorado em 263 nm da fração SS23BRI09-pCN5.



O cromatograma da subfração SS23BRI09-pCN5 utilizando detecção por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+) é ilustrado na Figura 16. Espectros de massas de picos chromatográficos selecionados são apresentados na Tabela 6. Os picos referentes aos tempos de retenção de 13,504 e 14,424 são análogos aos demonstrados na subfração anterior.

Figuras 16 – Cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+) da fração do bivalve *Nellia* cf. *tenella* (SS23BRI09-pCN5).

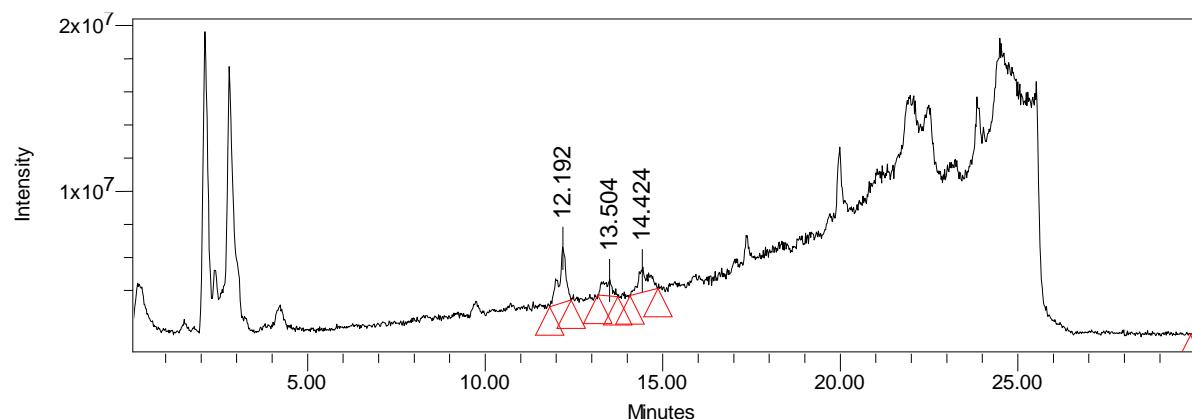
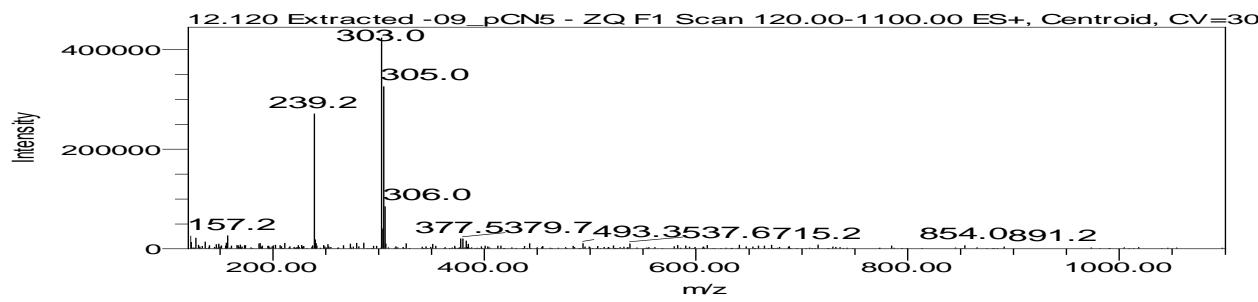
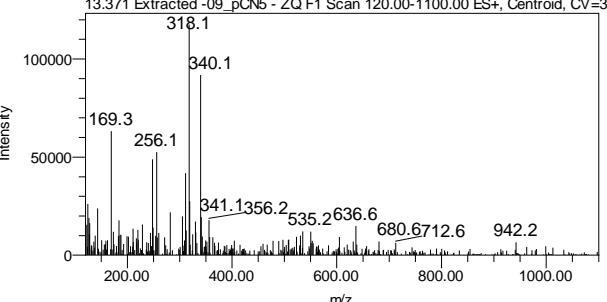
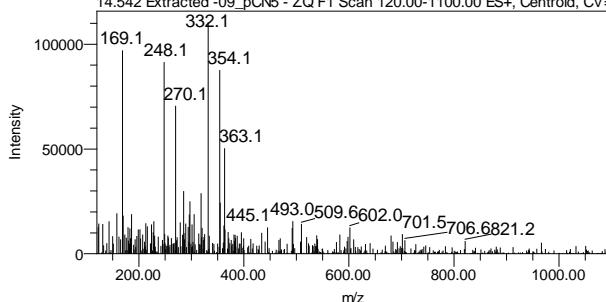


Tabela 5 – Espectros de massas de picos selecionados do cromatograma HPLC-UV-MS da fração SS23BRI09-pCN5

Fração	Pico de referência	Tempo de retenção	Absorção no UV	Espectro de massas MS+
BRI09pCN5	1	12,120	200-380	 <p>12.120 Extracted -09_pCN5 - ZQ F1 Scan 120.00-1100.00 ES+, Centroid, CV=30</p> <p>303.0 239.2 305.0 306.0 157.2 377.5 379.7 493.3 3537.6 6715.2 854.0 891.2</p>
BRI09pCN5	2 e	13,371 e	-	 <p>13.371 Extracted -09_pCN5 - ZQ F1 Scan 120.00-1100.00 ES+, Centroid, CV=30</p> <p>318.1 340.1 169.3 256.1 341.1 356.2 535.2 636.6 680.6 6712.6 942.2</p>  <p>14.542 Extracted -09_pCN5 - ZQ F1 Scan 120.00-1100.00 ES+, Centroid, CV=30</p> <p>332.1 354.1 169.1 248.1 270.1 363.1 445.1 493.0 509.6 602.0 701.5 706.6 6821.2</p>

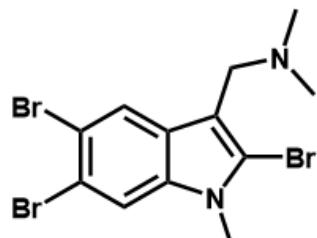
**Figura 17.** Espectro de massas do pico detectado em 12,120 minutos no cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+).

**Figura 18 e 19.** Espectro de massas dos picos detectados em 13,371 e 14,542 minutos no cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+).

A análise comparativa entre as subfrações indicou a presença do íon molecular “duplicado” de  $m/z$  303,05 e  $m/z$  305,05 nas subfrações SS23BRI09-pCN4 com menor e em SS23BRI09-pCN5 em maior intensidade. Este padrão isotópico é característico de íons moleculares com 1 átomo de bromo. Além disso, observa-se a presença de íons protonados em  $m/z$  318,1  $[M+H]^+$  e 340,1 referentes ao íon  $[M+ Na]^+$ ; em  $m/z$  636,6 referente ao dímero protonado do íon molecular protonado em  $m/z$  318,1, e em  $m/z$  680,6 referente ao dímero sodiado do íon molecular sodiado em  $m/z$  340,1 de um dos metabólitos de interesse. Observa-se também a presença de um análogo estrutural com um grupo  $-CH_2$  extra em  $m/z$  332,1, com o mesmo padrão de fragmentação dos demais. Os dois íons moleculares protonados em  $m/z$  318,1 e 332,1 não apresentam absorção no UV na faixa de comprimento de onda entre 200-400 nm. A presença de íons moleculares protonados  $[M+H]^+$  e/ou sodiado  $[M+Na]^+$  de massa par implica em uma massa molecular ímpar desses compostos, o que indica que estes são nitrogenados. Também é possível se observar um “agregado” de íons moleculares protonados de baixa intensidade com  $m/z$  377,5, 379,5, 381,5 e 383,5 respectivo ao sinal cromatográfico com tempo de retenção de 12,120 minutos. Este metabólito está presente nos espectros de massas de outros espécimes de estudo neste projeto. Considerando-se os resultados obtidos, foram selecionados estes 4 metabólitos para o possível isolamento e elucidação estrutural.

Duas teses de doutorado realizadas no grupo QOSBio reportaram o isolamento da 2,4,5-tribromo-1-metilgramina, que apresenta íon molecular protonado em  $m/z$  377,5, 379,5 381,5 e 383,5. Este composto foi isolado a partir do briozoário *Amathia verticillata* e do nudibrânquio *Okenia zoobroton*<sup>46,47</sup>. A análise comparativa dos espectros de massas por nós obtido e destes trabalhos anteriores sugere fortemente a presença da 2,4,5-tribromo-1-metilgramina nos extratos do briozoário *Nellia cf. tenella*.

Figura 20 – Estrutura do composto 2,4,5-tribromo-1-metilgramina.<sup>46,47</sup>



2,4,5-tribromo-1-metilgramina

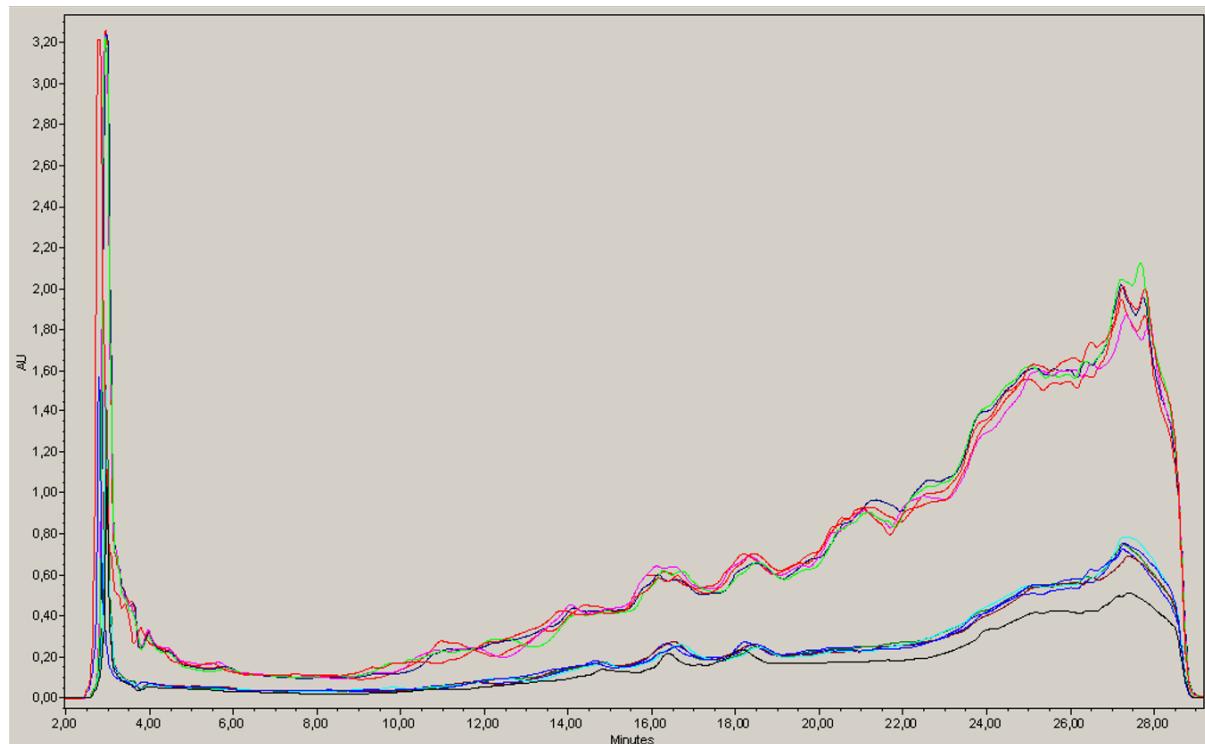
Fonte: Autoria Própria.

#### 4.3 Purificação de frações obtidas do extrato do briozoário *Nellia cf. tenella* (amostra SS23BRI09)

##### 4.3.1 Separação e purificação da fração SS23BRI09-pCN5

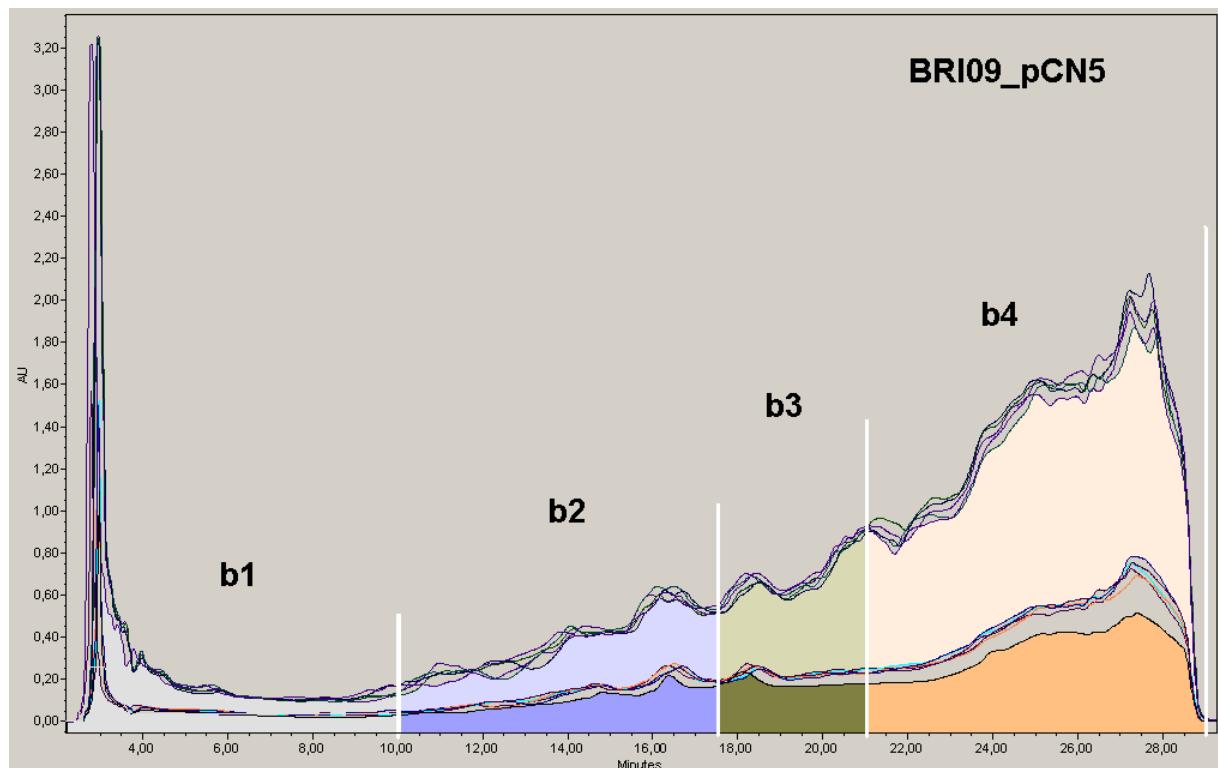
A fração SS23BRI09-pCN5 foi separada por HPLC utilizando-se coluna analítica XTerra® RP18 (5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  250 mm), com método de eluição gradiente de 0 - 1,0 min com 90% de H<sub>2</sub>O + 10% MeOH/MeCN (1:1, v/v), de 1,0 a 22,0 min um gradiente linear de MeOH/MeCN (1:1, v/v) em H<sub>2</sub>O, até 100% MeOH/MeCN (1:1, v/v). De 22,0 a 25,0 min manteve-se em 100% de MeOH/MeCN (1:1, v/v). De 25,0 a 34,0 min voltou-se à condição de 90% de H<sub>2</sub>O para recondicionamento da coluna. O fracionamento foi monitorado por detecção em  $\lambda_{\text{max}}$  de 230 nm e em 250 nm (Figura 21).

Figura 21 - Comparação dos cromatogramas monitorados no UV para a fração SS23BRI09-pCN5. (A) Azul: Cromatograma registrado em 230 nm; (B) Rosa: Cromatograma registrado em 250 nm.



A coleta das frações cromatográficas foi realizada em quatro faixas de tempo de retenção ( $t_R$ ), onde cada número representa uma faixa de  $t_R$  para a qual as frações correspondentes foram coletadas (Figura 22).

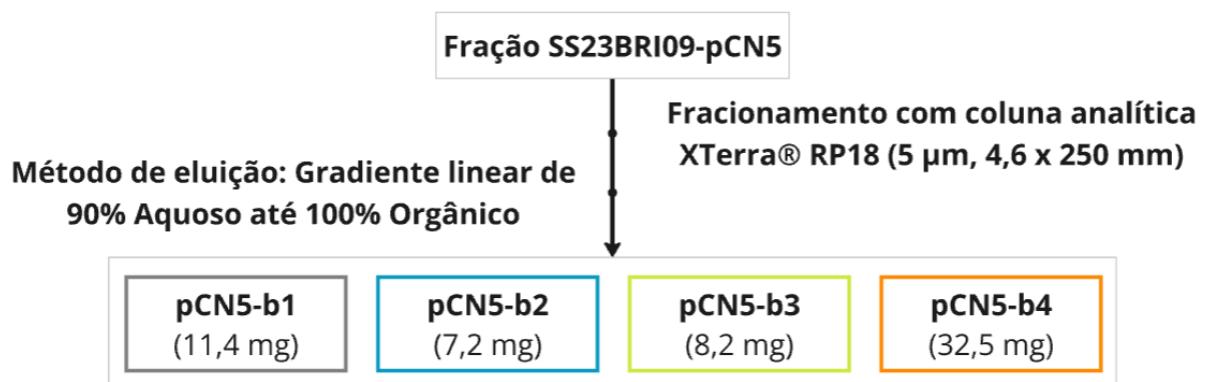
Figura 22 - Método desenvolvido para a separação da fração SS23BRI09-pCN5 ( $\lambda_{\text{max}}$  230 e 250 nm).



Fonte: Autoria Própria.

A partir deste fracionamento por HPLC, obteve-se as subfrações:

Figura 23 - Frações obtidas a partir do fracionamento por HPLC da fração SS23BRI09-pCN5.



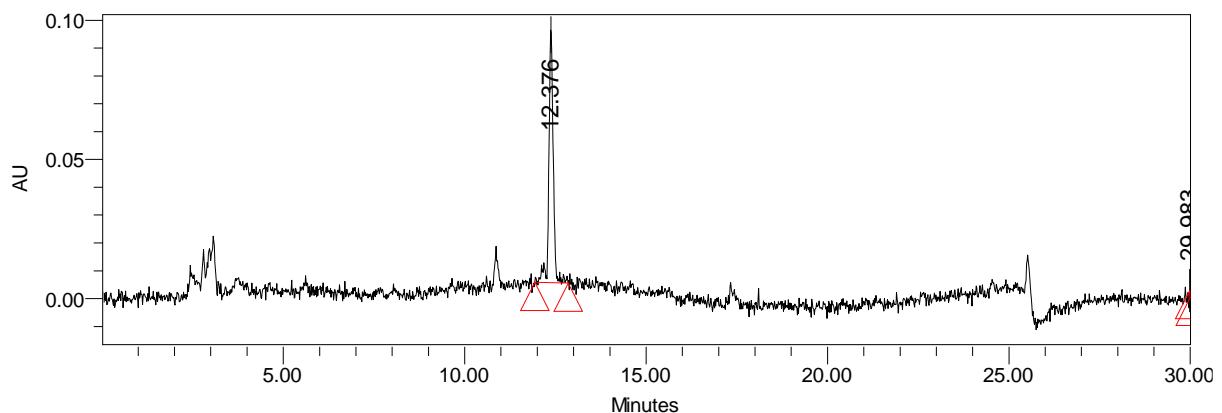
Fonte: Autoria Própria.

As subfrações BRI09-pCN5[b1→b4] foram reanalisadas por HPLC-UV-MS para compreensão do perfil químico resultante. Os resultados nos levaram à seleção e purificação das subfrações b2 e b3.

#### 4.3.2 Purificação cromatográfica da fração SS23BRI09-pCN5-b2

A análise por HPLC-UV da fração SS23BRI09-pCN5-b2 forneceu o seguinte cromatograma (Figura 24).

Figuras 24 – Cromatograma monitorado em 263 nm da fração SS23BRI09-pCN5-b2.



O cromatograma utilizando detecção por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+) é ilustrado na Figura 25. Espectros de massas dos picos de interesse são apresentados na Tabela 7.

Figuras 25 – Cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+) da fração SS23BRI09-pCN5-b2.

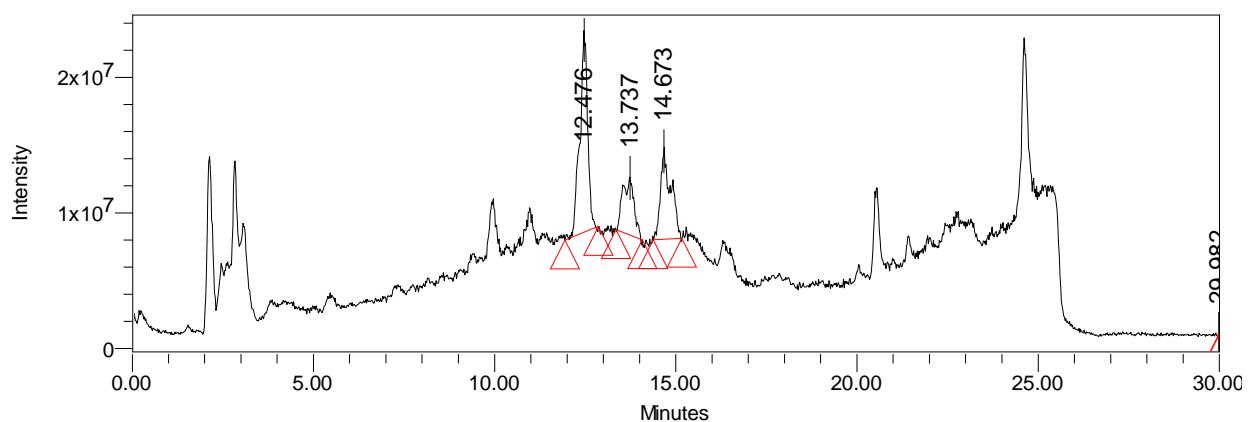
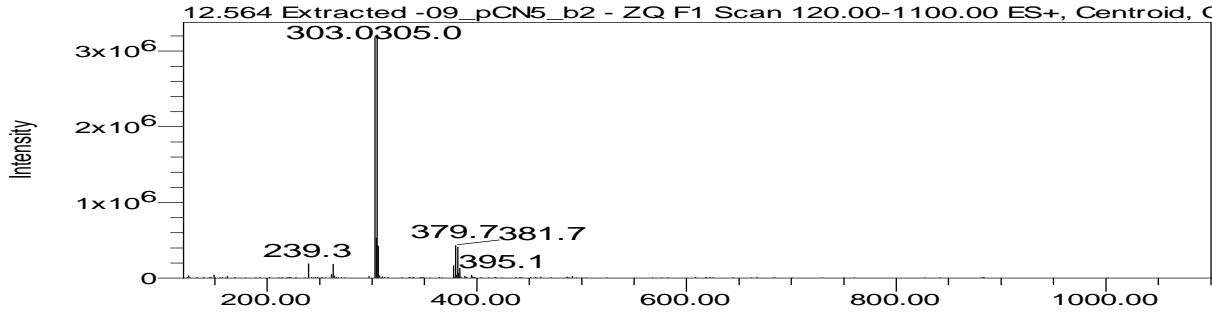
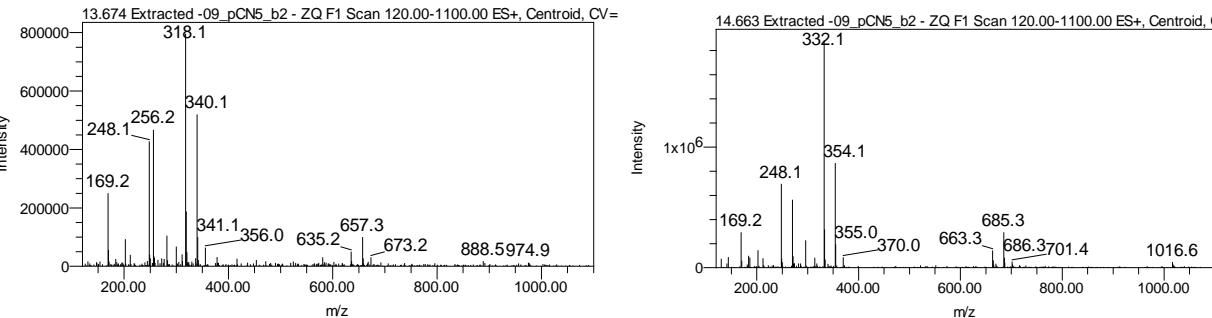


Tabela 6 - Cromatograma da fração SS23BRI09-pCN5-b2 pela análise por HPLC-UV-MS.

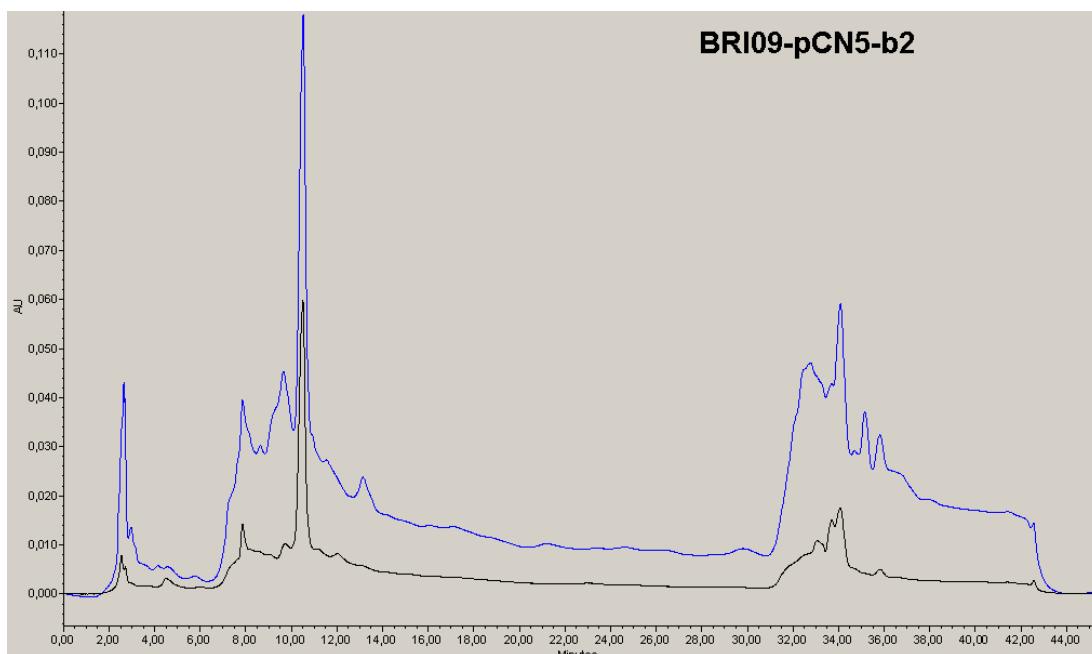
Fração	Pico de referência	Tempo de retenção	Absorção no UV	Espectro de massas MS+
<b>BRI09pCN5-b2</b>	1	12,476	200-380	 <p>12.564 Extracted -09_pCN5_b2 - ZQ F1 Scan 120.00-1100.00 ES+, Centroid, CV= 303.0305.0</p> <p>Intensity</p> <p>239.3 379.7 381.7 395.1</p> <p>m/z</p>
<b>BRI09pCN5-b2</b>	2 e 3	13,737 e 14,673	-	 <p>13.674 Extracted -09_pCN5_b2 - ZQ F1 Scan 120.00-1100.00 ES+, Centroid, CV= 318.1</p> <p>Intensity</p> <p>248.1 256.2 318.1 340.1 341.1 356.0 635.2 657.3 673.2 888.5 974.9</p> <p>m/z</p> <p>14.663 Extracted -09_pCN5_b2 - ZQ F1 Scan 120.00-1100.00 ES+, Centroid, CV= 332.1</p> <p>Intensity</p> <p>169.2 248.1 332.1 354.1 355.0 370.0 663.3 685.3 686.3 701.4 1016.6</p> <p>m/z</p>

**Figura 26.** Espectro de massas do pico detectado em 12,476 minutos no cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+).

**Figura 27 e 28.** Espectro de massas dos picos detectados em 13,737 e 14,673 minutos no cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+).

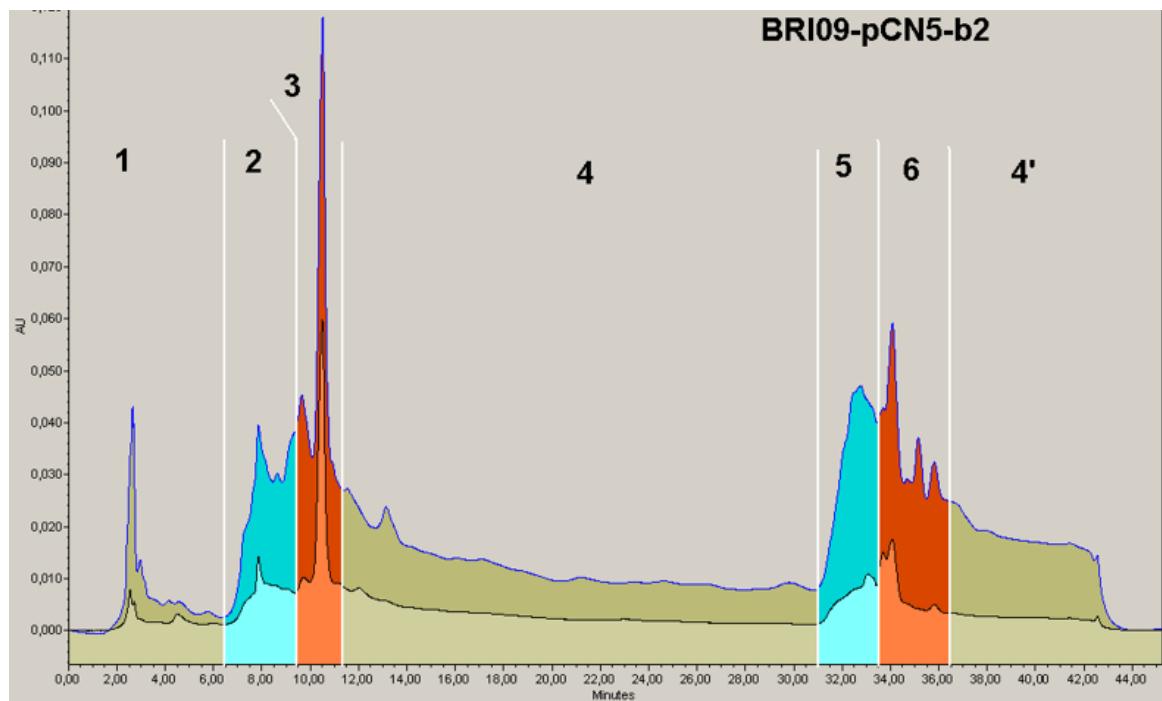
A fração BRI09-pCN5-b2 foi separada por HPLC, utilizando-se coluna analítica XTerra® RP18 (5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  250 mm), com método de eluição isocrático de 0 - 1,0 min com 90% de H<sub>2</sub>O e 10% MeOH/MeCN (1:1, v/v). De 1,0 – 35,0 min com H<sub>2</sub>O/MeOH/MeCN (58:29:13, v/v/v), e entre 35,0 e 40,0 min manteve-se a condição inicial. A separação cromatográfica foi monitorada em 236 nm e em 296 nm. As frações foram coletadas como indicado na figura 30.

Figura 29 - Comparação dos cromatogramas no UV para a fração SS23BRI09-pCN5-b2. (A) Azul: Cromatograma registrado em 296 nm; (B) Preto: Cromatograma registrado em 236 nm.



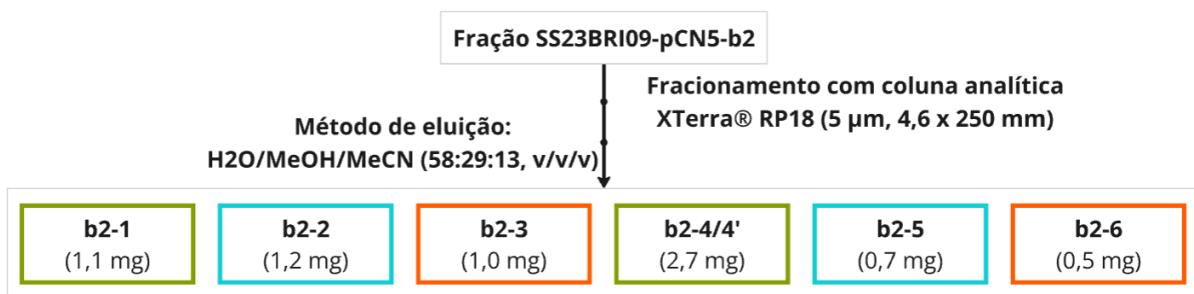
A coleta das frações cromatográficas foi realizada de acordo com o interesse em cada faixa de tempo de retenção, onde cada número representa uma faixa  $t_R$  para a qual as frações correspondentes foram coletadas (Figura 30).

Figura 30 - Método desenvolvido para a separação da fração SS23BRI09-pCN5-b2 (296 e 236 nm).



Foram obtidas as seguintes frações (Figura 31).

Figura 31 - Frações obtidas a partir do fracionamento por HPLC da fração SS23BRI09-pCN5-b2.

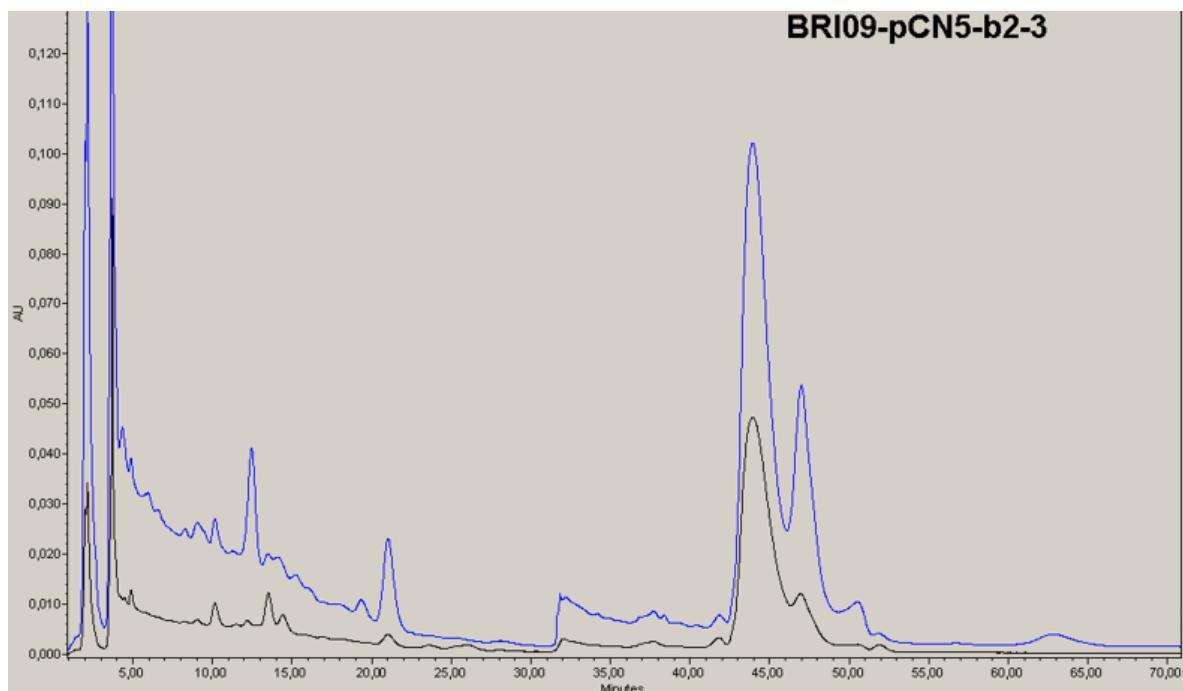


Fonte: Autoria Própria.

#### 4.3.3 Purificação da fração SS23BRI09-pCN5-b2-3

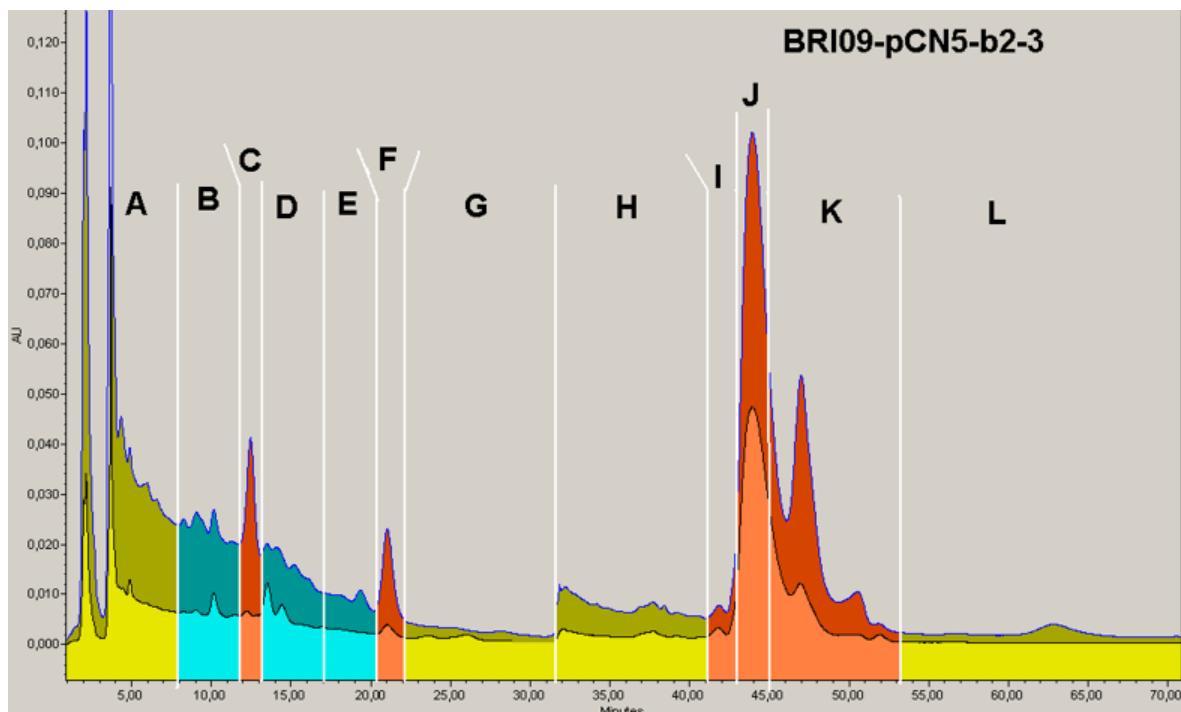
A fração SS23BRI09-pCN5-b2-3 foi separada por HPLC-UV, utilizando-se coluna analítica Inertsil® Ph-3 (5 µm, 4.6 × 250 mm), com método de eluição isocrático de 0 a 25,0 min com H<sub>2</sub>O/MeCN (68:32, v/v), e entre 25,0 a 64,0 min com H<sub>2</sub>O/MeCN (40:60, v/v), e entre 64,0 a 70,0 min manteve-se H<sub>2</sub>O/MeCN (68:32, v/v) para recondicionamento da coluna. A separação cromatográfica foi monitorada em 230 nm e em 345 nm.

Figura 32 - Comparação dos cromatogramas de HPLC no UV para a fração SS23BRI09-pCN5-b2-3. (A) Azul: Cromatograma registrado em 230 nm; (B) Preto: Cromatograma registrado em 345 nm.



A partir do cromatograma obtido, desenvolveu-se um método de purificação dessa amostra (Figura 33).

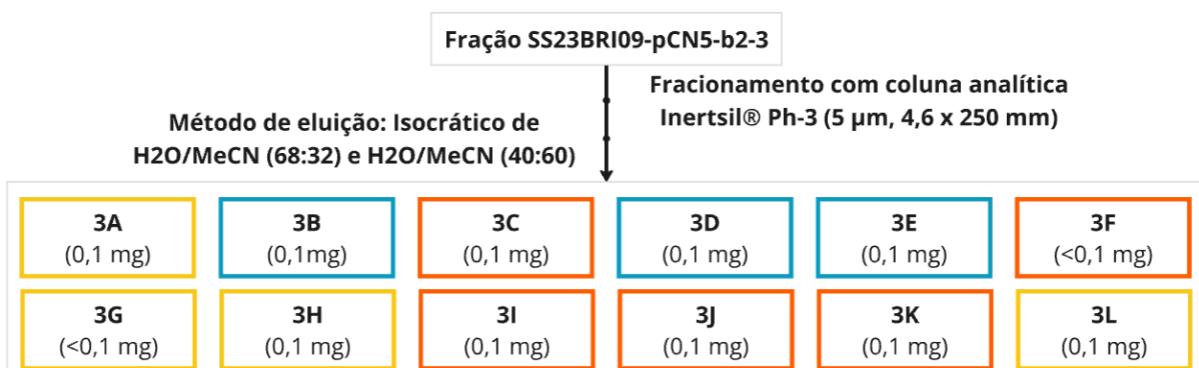
Figura 33 - Método desenvolvido para a separação da fração SS23BRI09-pCN5-b2-3.



Fonte: Autoria Própria.

A separação da fração SS23BRI09-pCN5-b2-3 utilizando-se as condições estabelecidas forneceu as seguintes frações correspondentes (Figura 34). Infelizmente, após a quantificação total dos componentes desta fração, não havia massa suficiente para a realização das análises espectroscópicas. Por isso, os esforços foram direcionados para a purificação da subfração b3.

Figura 34 - Frações extraídas a partir da fração SS23BRI09-pCN5-b2.

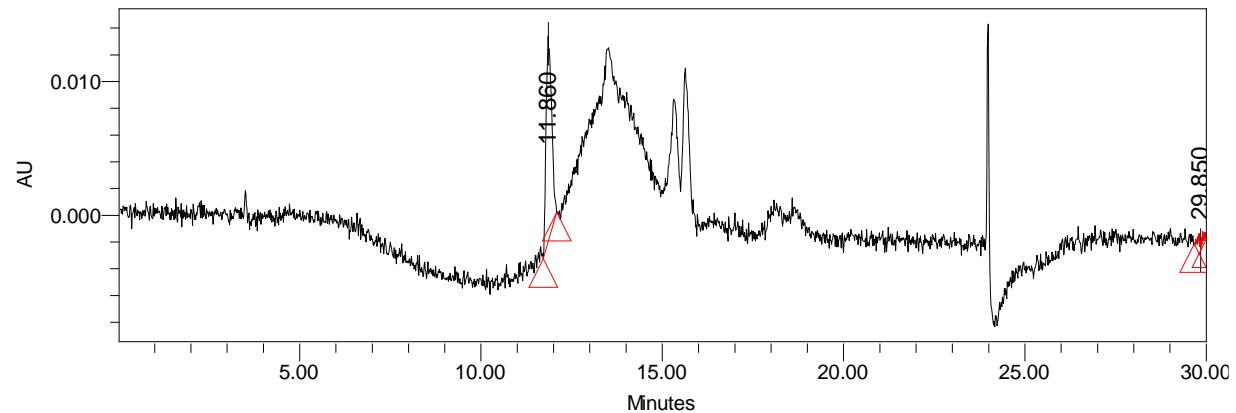


Fonte: Autoria Própria.

#### 4.3.4 Purificação cromatográfica da fração SS23BRI09-pCN5-b3

A análise por HPLC-UV-MS da fração SS23BRI09-pCN5-b3 forneceu o seguinte cromatograma (Figura 35).

Figuras 35 – Cromatograma monitorado em 263 nm da fração SS23BRI09-pCN5-b3.



O cromatograma utilizando detecção por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+) é ilustrado na Figura 36. O espectro de massa do pico cromatográfico selecionado é apresentado na Figura 37.

Figuras 36 – Cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização (MS+) da fração SS23BRI09-pCN5-b3.

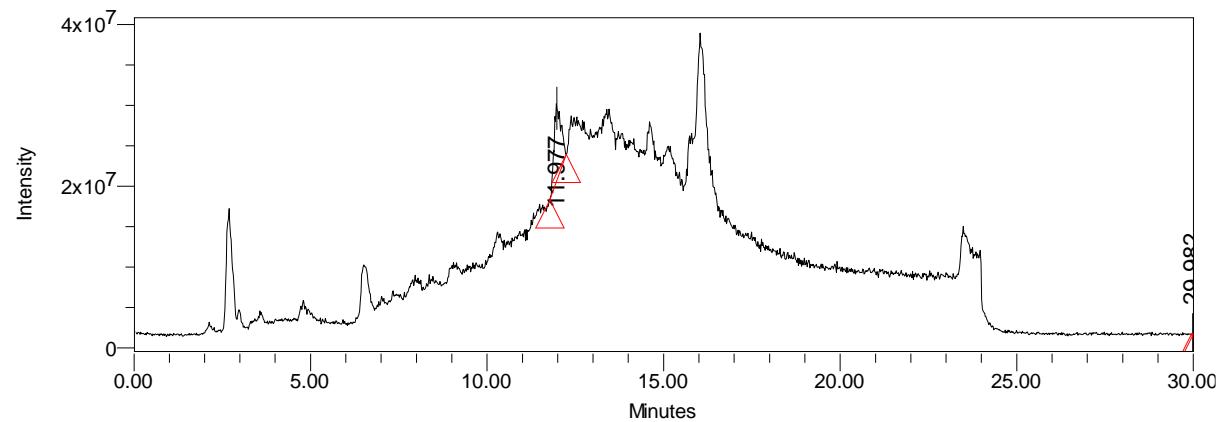
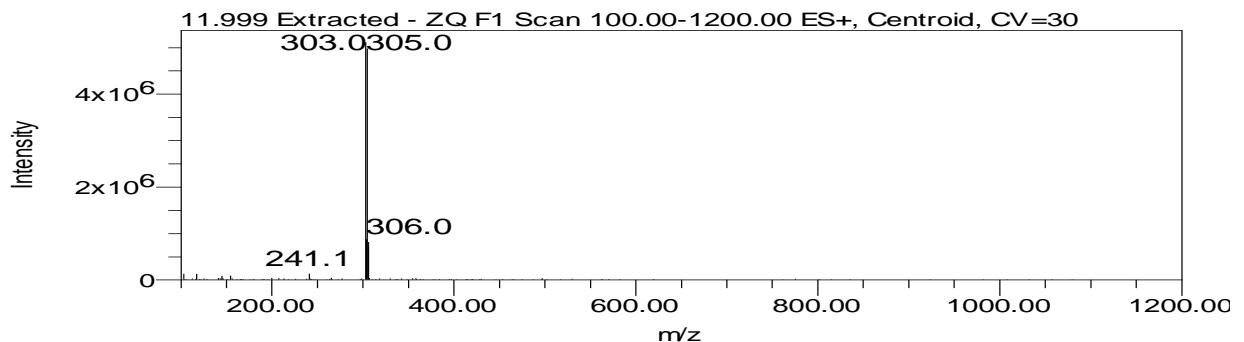
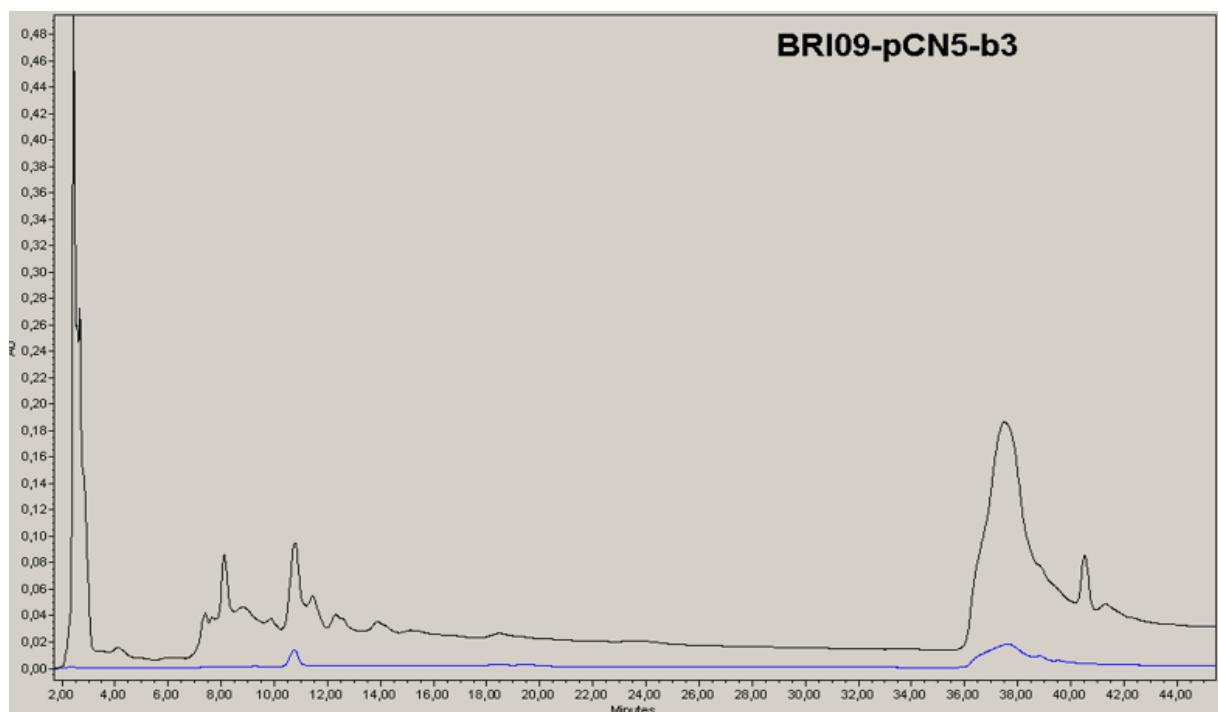


Figura 37. Espectro de massas do pico detectado em 12,476 minutos no cromatograma monitorado por espectrometria de massas em modo positivo de ionização( MS+).



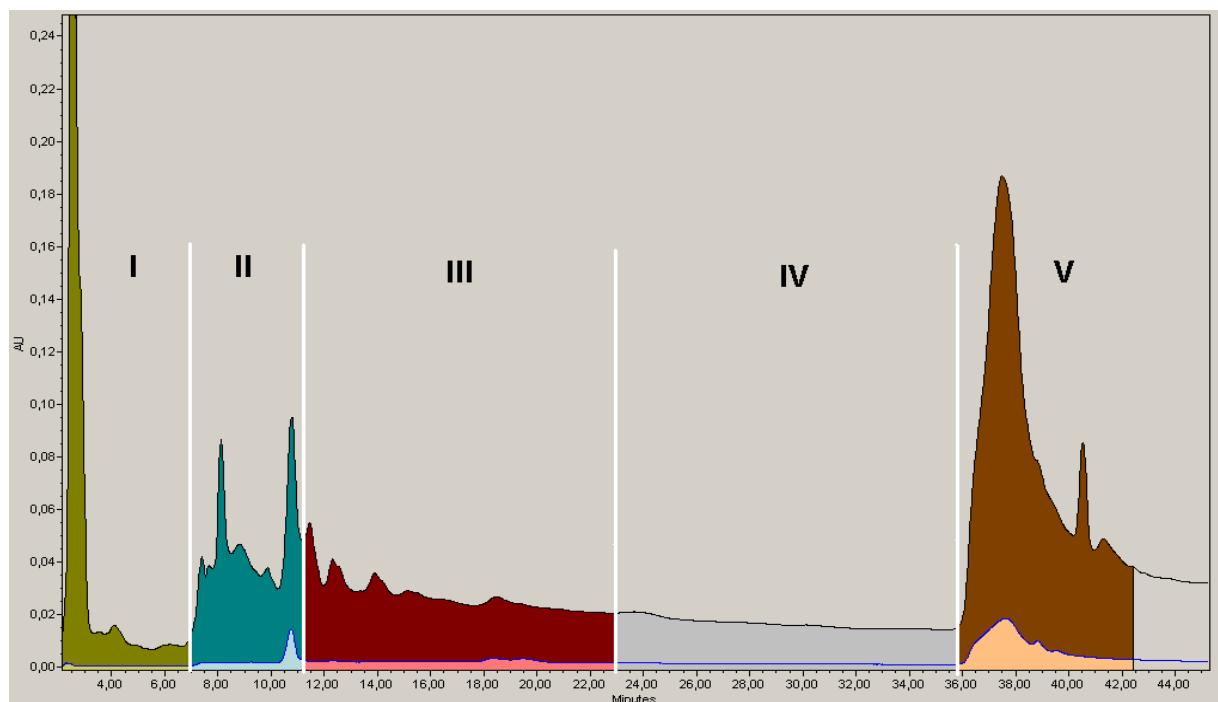
A fração SS23BRI09-pCN5-b3 apresentava um perfil cromatográfico similar ao obtido para a subfração vizinha (b2). Por isso, o método de fracionamento por HPLC-UV foi análogo ao utilizado para a subfração b2. A fração SS23BRI09-pCN5-b3 foi separada por HPLC, utilizando-se coluna analítica Xterra® RP18 (5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  250 mm), com método de eluição isocrático de 0 - 1,0 min com 90% de H<sub>2</sub>O e 10% MeOH/MeCN (1:1, v/v), de 1,0 a 35,0 min com H<sub>2</sub>O/MeOH/MeCN (58:29:13, v/v/v), e entre 35,0 a 40,0 min manteve-se 90% de H<sub>2</sub>O e 10% MeOH/MeCN (1:1, v/v) para recondicionamento da coluna. A separação cromatográfica foi monitorada em 229 nm e em 345 nm.

Figura 38 - Comparaçao dos cromatogramas de HPLC no UV para a fração SS23BRI09-pCN5-b3. (A) Azul: Cromatograma registrado em 229 nm; (B) Preto: Cromatograma registrado em 345 nm.



A partir do cromatograma obtido, desenvolveu-se um método de fracionamento dessa amostra (Figura 39).

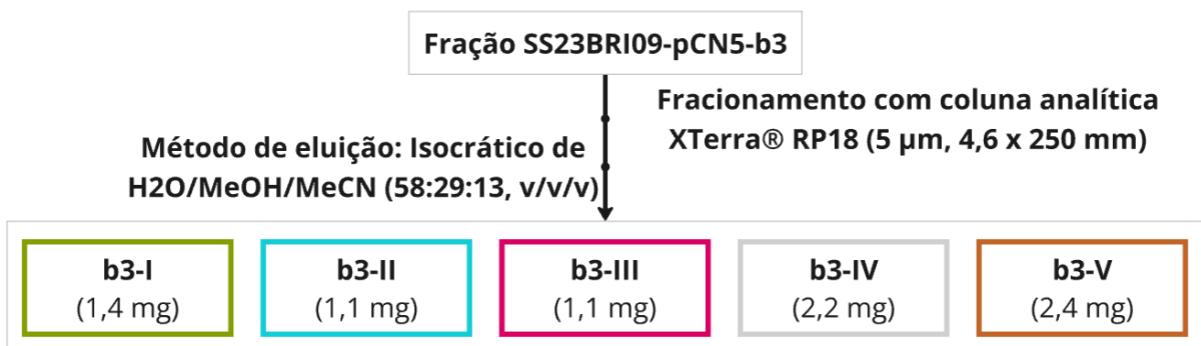
Figura 39 - Método desenvolvido para a separação da fração SS23BRI09-pCN5-b3.



Fonte: Autoria Própria.

A separação da fração SS23BRI09-pCN5-b3 utilizando-se as condições estabelecidas forneceu as seguintes frações correspondentes (Figura 40).

Figura 40 - Frações extraídas a partir da fração SS23BRI09-pCN5-b3.

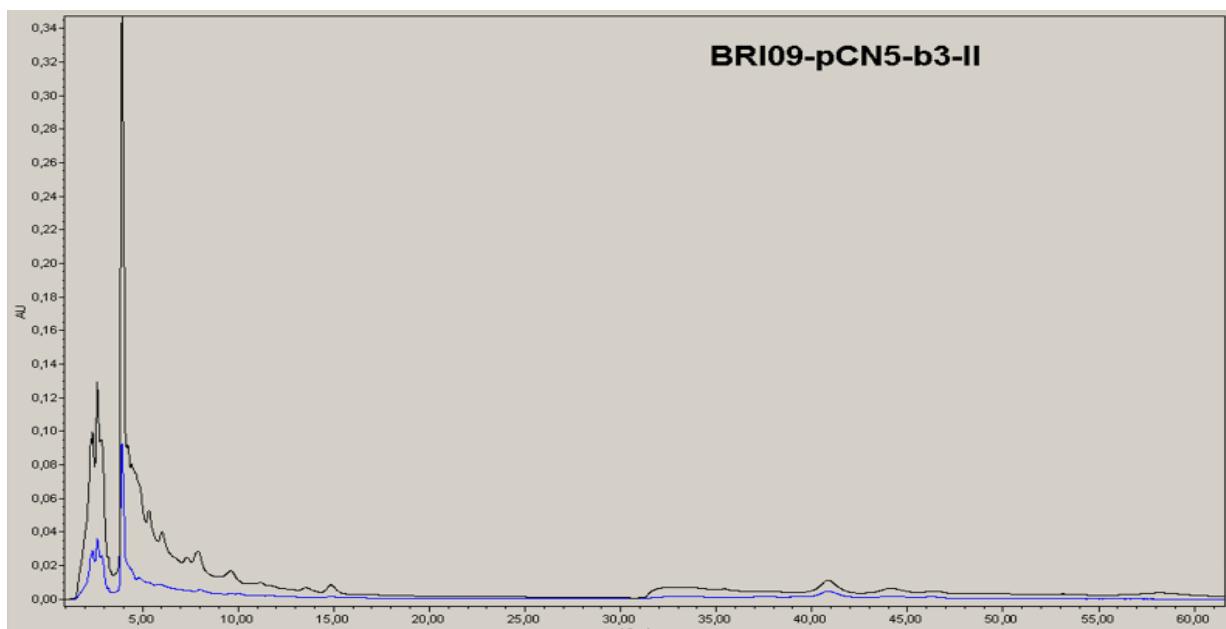


Fonte: Autoria Própria.

#### 4.3.5 Purificação cromatográfica da fração SS23BRI09-pCN5-b3-II

A fração SS23BRI09-pCN5-b3-II foi separada por HPLC-UV, utilizando-se coluna analítica Inertsil® Ph-3 (5 µm, 4.6 x 250 mm), com método de eluição isocrático de 0 a 25,0 min com H<sub>2</sub>O/MeCN (68:32, v/v). De 25,0 a 64,0 min com H<sub>2</sub>O/MeCN (40:60, v/v), de 64,0 a 70,0 min manteve-se com H<sub>2</sub>O/MeCN (68:32, v/v) para recondicionamento da coluna. A separação cromatográfica foi monitorada em 230 nm e em 345 nm.

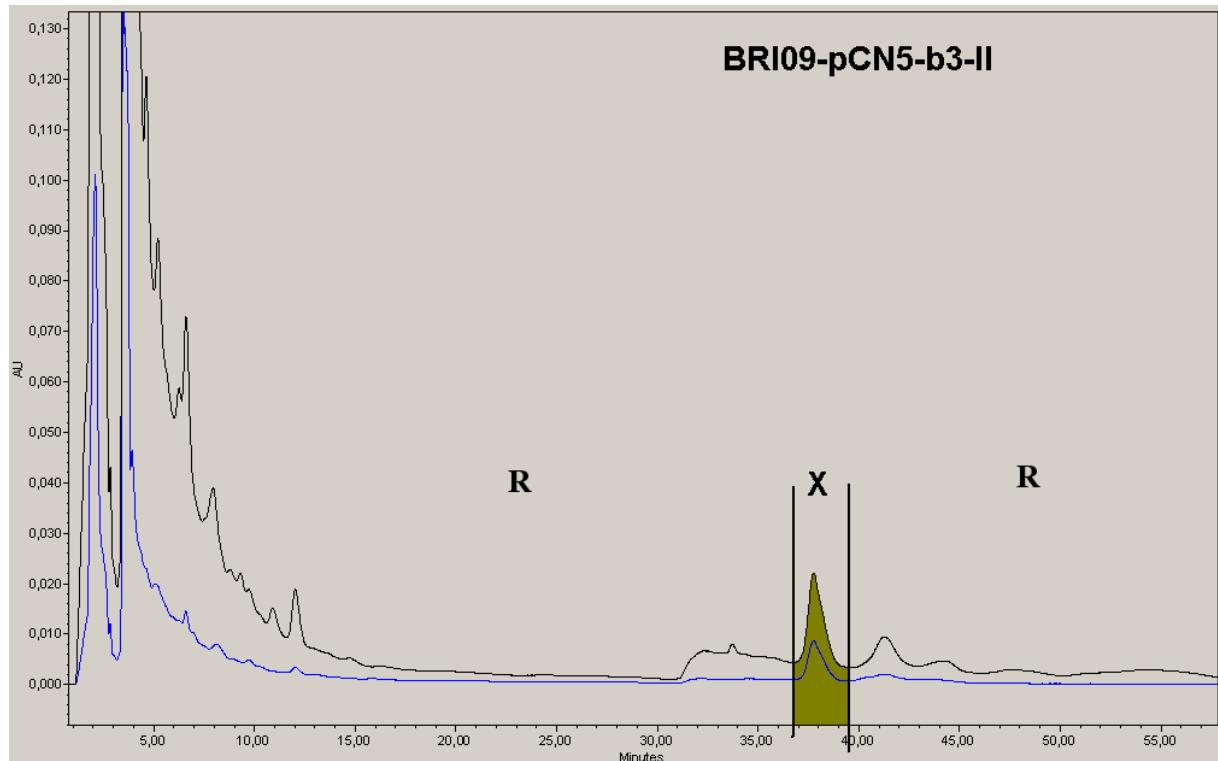
Figura 41 - Comparação dos cromatogramas de HPLC no UV para a fração BRI09-pCN5-b3-II. (A) Azul: Cromatograma registrado em 230 nm; (B) Preto: Cromatograma registrado em 345 nm.



Fonte: Autoria Própria.

Assim, desenvolveu-se um método de purificação por HPLC dessa amostra (Figura 42).

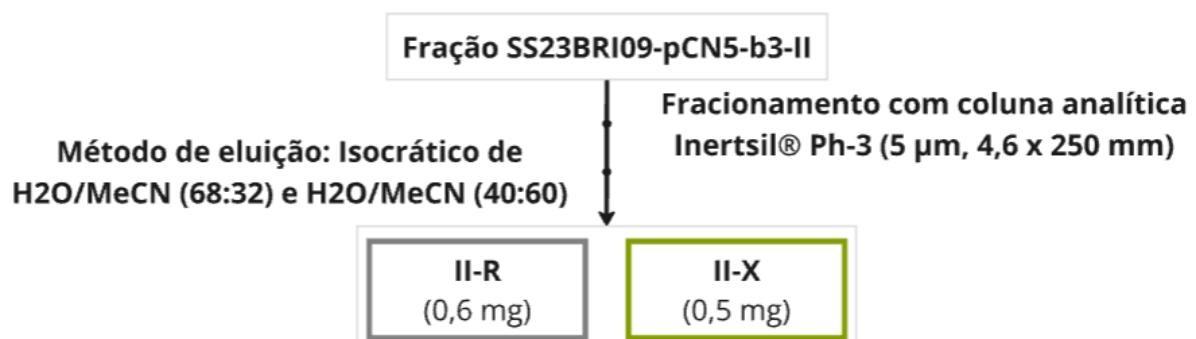
Figura 42 - Método de separação por HPLC desenvolvido para a purificação da fração SS23BRI09-pCN5-b3-II.



Fonte: Autoria Própria.

A separação da fração SS23BRI09-pCN5-b3-II forneceu as seguintes frações correspondentes (Figura 43).

Figura 43 - Frações obtidas por separação por HPLC a partir da fração SS23BRI09-pCN5-b3-II.



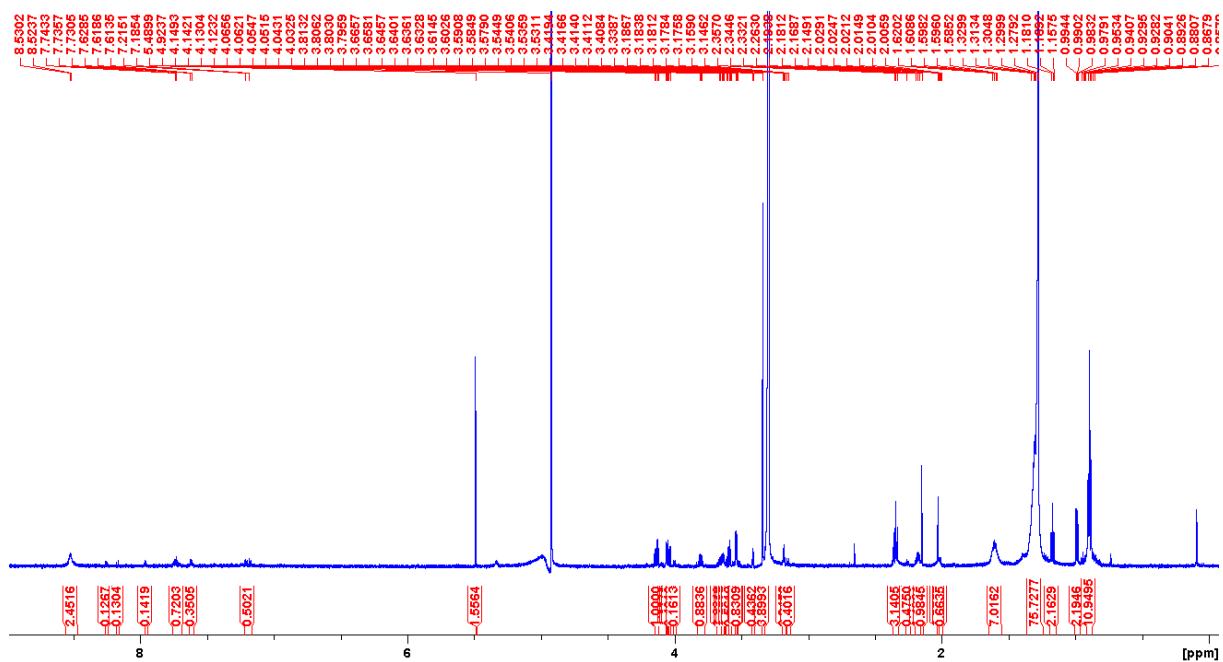
Fonte: Autoria Própria.

Assim, obteve-se amostra representada pelo código da fração BRI09-pCN5-b3-II-X.

#### 4.4 Análise Espectroscópica da Amostra BRI09-pCN5-b3-II-X

A fração SS23BRI09pCN5-b3-II-X foi submetida a análise por RMN-<sup>1</sup>H, em 600 MHz.

Figura 44 – Espectro de RMN-<sup>1</sup>H da fração SS23BRI09-pCN5-b3-II-X (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>).



A análise do espectro de RMN-<sup>1</sup>H do composto da fração SS23BRI09-pCN5-b3-II-X indicou a presença de impurezas na amostra.

A expansão 1 do espectro de RMN-<sup>1</sup>H da fração SS23BRI09-pCN5-b3-II-X (Figura 45) indicou sinais em  $\delta$  8,53 e 8,52 (2,45 H) que podem estar associados a um grupo amina do composto de interesse. Os demais sinais, doubleto com  $\delta$  8,26 (0,12 H), duplo doubleto com  $\delta$  8,17 e 8,16 (0,13 H), doubleto com  $\delta$  7,96 (0,14 H), multipleto com  $\delta$  7,75 a 7,70 (0,72 H), multipleto com  $\delta$  7,62 a 7,60 (0,35 H) e multipleto com  $\delta$  7,21 a 7,17 (0,50 H) possivelmente indicam um contaminante ou composto minoritário.

A expansão 2 do espectro de RMN-<sup>1</sup>H da fração SS23BRI09-pCN5-b3-II-X (Figura 46) indicou um singuleto com  $\delta$  5,48 (1,5 H) que pode pertencer ao composto de interesse ou ao contaminante minoritário. O pico em  $\delta$  4,92 indica o sinal de supressão da água.

A expansão 3 do espectro de RMN-<sup>1</sup>H da fração SS23BRI09-pCN5-b3-II-X (Figura 47) indicou dois duplos doubletos com  $\delta$  4,14 a 4,12 (1,0 H) e  $\delta$  4,06 a 4,03 (1,0 H) que suspeitamos fazerem parte da molécula de interesse. Os sinais com  $\delta$  4,06

(0,17 H) e 4,05 (0,18 H) pertencem a um dubbleto que não constitui parte da mesma molécula. O multipleto com  $\delta$  3,83 a 3,78 (0,88 H) pode ser respectivo a molécula de interesse. Os sinais com  $\delta$  3,68 a 3,57, apresentam integrais de menor valor e suspeitamos pertencer ao contaminante (ou composto) minoritário. Os dois dubbletos com  $\delta$  3,54 (0,90 H) e 3,53 (0,83 H) podem ser respectivos a molécula de interesse. O quinteto com  $\delta$  3,42 a 3,40 (0,43 H) está associado a um composto minoritário ou contaminante. O singlet com  $\delta$  3,33 (3,89 H) parece pertencer a um grupo metoxila (OMe) do composto de interesse. O quinteto com  $\delta$  3,18 a 3,17 (0,94 H) pode estar associado a um hidrogênio da molécula que nos interessa. O dubbleto com  $\delta$  3,16 e 3,14 (0,40 H) aparenta pertencer ao composto minoritário ou impureza.

A expansão 4 do espectro de RMN-<sup>1</sup>H da fração SS23BRI09-pCN5-b3-II-X (Figura 48) indicou um triplete com  $\delta$  2,35 a 2,33 (3,14 H) que pode ser um grupo metila (CH<sub>3</sub>) acoplado a um CH<sub>2</sub>. O dubbleto vizinho, com  $\delta$  2,27 a 2,24 (0,47 H) possivelmente está associado ao contaminante minoritário ou impureza. O multipleto de  $\delta$  2,19 a 2,17 (1,49 H) com singlet de  $\delta$  2,15 (0,98 H) e o singlet de  $\delta$  2,03 (0,97 H) com multipleto de  $\delta$  2,02 a 2,00 (0,66 H) aparentam pertencer a molécula de interesse. A região abaixo de 1,8 ppm evidencia a presença majoritária de um contaminante lipídico com multipleto em  $\delta$  1,62 a 1,58 (7,01 H), multipleto em  $\delta$  1,32 a 1,27 (75,72 H) e triplete em  $\delta$  0,90 a 0,84 (10,94 H). Porém, suspeitamos que o triplete com  $\delta$  1,18 a 1,15 (2,16 H) e o duplo dubbleto com  $\delta$  0,99 a 0,98 (2,19 H) não esteja associado ao ácido graxo e sim ao composto de interesse.

## 5 CONCLUSÃO

O projeto desta monografia incluiu todas as etapas de biodescoberta de metabólitos secundários. Foi realizada coleta em dezembro de 2023 na região de São Sebastião (SP). Foram coletadas as 15 amostras de briozoários, objeto de estudo neste trabalho. As amostras foram liofilizadas, maceradas e extraídas com MeOH para obtenção do extrato biológico inicial. Os extratos obtidos foram particionados com hexano e, em uma etapa posterior, com AcOEt. O extrato orgânico (AcOEt) foi fracionado por SPE-CN para obtenção de 6 subfrações de interesse e estas foram analisadas em HPLC-UV-MS.

A análise bibliográfica de dados espécies de briozoários relacionados às espécies por nós coletadas indicou que as espécies *Catenicella uberrima*, *Licornia aff. diadema*, *Schizoporella errata*, *Nellia cf. tenella*, *Tubulipora sp.* apresentavam apenas informações científicas retratando as características biológicas desses animais. Assim, a espécie *Nellia cf. tenella* (amostras SS23BRI-[08 e 09]) foi selecionada a partir do perfil químico apresentado na análise por HPLC-UV-MS.

As análises por HPLC-UV-MS das frações BRI09-pCN4 e BRI09-pCN5 apresentaram espectros de massas com sinais característicos de metabólitos secundários bromados e nitrogenados. O fracionamento cromatográfico do extrato do briozoário *Nellia cf. tenella* (amostra SS23BRI-09) e semi-purificação por HPLC-UV permitiu a obtenção de uma amostra ainda impura, SS23BRI09-pCN5-B3-II-X. A pequena massa obtida para esta amostra impossibilitou a repurificação do composto de interesse isolado. A análise do espectro de RMN-<sup>1</sup>H da amostra SS23BRI09-pCN5-B3-II-X demonstrou ainda não estar pura, impossibilitando a caracterização estrutural completa do composto. Verificou-se a presença de um contaminante lipídico e de um composto minoritário. Análises adicionais de RMN-<sup>13</sup>C, COSY, HMBC e HSQC da amostra SS23BRI09-pCN5-B3-II-X ainda impura deverão ser realizadas para a completa identificação de composto que acreditamos ser o principal metabólito secundário desta fração.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] FIGUEROLA, B.; AVILA, C. The phylum bryozoa as a promising source of anticancer drugs. **Marine Drugs**, Basel, v. 17, p. 477, 2019.
- [2] HAYWARD, P. J. Antarctic cheilostomatous bryozoa. Oxford, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oso/9780198548911.001.0001>. Acesso em: 5 nov. 2024.
- [3] FIGUEROLA, B. et al. Experimental evidence of Chemical Defence Mechanisms in Antarctic bryozoans. **Marine Environmental Research**, Amsterdã, v. 129, p. 68–75, 2017.
- [4] DE BROYER, C.; SCAILTEUR, Y.; CHAPELLE, G.; RAUSCHERT, M. Diversity of epibenthic habitats of gammaridean amphipods in the eastern Weddell Sea. **Polar Biology**, Berlim, v. 24, p. 744–753, 2001.
- [5] SHARP, J. H.; WINSON, M. K.; PORTER, J. S. Bryozoan metabolites: An ecological perspective. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 24, p. 659, 2007.
- [6] PETERS, L. et al. Secondary metabolites of *Flustra foliacea* and their influence on bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 3469–3475, 2003.
- [7] CHRISTOPHERSEN, C. et al. Secondary metabolites from marine bryozoans. A review. **Acta Chemica Scandinavica**, Hoboken, v. 39b, p. 517–529, 1985.
- [8] CIAVATTA, M. L. et al. The phylum bryozoa: From biology to biomedical potential. **Marine Drugs**, Basel, v. 18, p. 200, 2020.
- [9] SASLIS-LAGOUDAKIS, C. H. et al. Phylogenies reveal predictive power of traditional medicine in bioprospecting. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 109, p. 15835–15840, 2012.
- [10] RUGGIERO, M. A. et al. A higher-level classification of all living organisms. **PLOS ONE**, São Francisco, v. 10, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119248>. Acesso em: 5 nov. 2024.
- [11] BOCK, P. E.; GORDON, D. P. Phylum Bryozoa Ehrenberg, 1831. In: ZHANG, Z.-Q. (ed.). Animal Biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness (addenda 2013). **Zootaxa**, Auckland, v. 3703, p. 67, 2013.
- [12] TIAN, X. R. et al. Review of bioactive secondary metabolites from marine bryozoans in the progress of New Drugs Discovery. **Future Medicinal Chemistry**, Londres, v. 10, p. 1497–1514, 2018.
- [13] PAUL, V. J.; RITSON-WILLIAMS, R.; SHARP, K. Marine chemical ecology in benthic environments. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 28, p. 345–387, 2011.

- [14] CHRISTOPHERSEN, C. Evolution in molecular structure and adaptive variance in metabolism. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, Amsterdã, v. 98, p. 427–432, 1991.
- [15] WILLIAMS, D. H.; STONE, M. J.; HAUCK, P. R.; RAHMAN, S. K. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? **Journal of Natural Products**, Washington, v. 52, p. 1189–1208, 1989.
- [16] BEUTLER, J. A. et al. A cytotoxic  $\beta$ -carboline from the bryozoan Catenicella Cribaria. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 56, p. 1825–1826, 1993.
- [17] TAKAKI, M. et al. Metabolomics reveals minor tambjamines in a Marine Invertebrate Food Chain. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 84, p. 790–796, 2020.
- [18] PEREIRA, F. R. et al. Metabólitos Secundários dos Nudibrânquios Tambja stegosauriformis, Hypselodoris lajensis e Okenia zoobotryon e dos briozoários Zoobotryon verticillatum e Bugula Dentata da Costa do Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, p. 2194–2201, 2012.
- [19] CARTÉ, B.; FAULKNER, D. J. Role of secondary metabolites in feeding associations between a predatory nudibranch, two grazing nudibranchs, and a bryozoan. **Journal of Chemical Ecology**, Berlim, v. 12, p. 795–804, 1986.
- [20] LEBAR, M. D.; HEIMBEGNER, J. L.; BAKER, B. J. Cold-water marine natural products. **Natural Product Reports**, Cambridge, v. 24, p. 774, 2007.
- [21] CARBONE, M. et al. A new cytotoxic tambjamine alkaloid from the Azorean nudibranch Tambja Ceutae. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Amsterdã, v. 20, p. 2668–2670, 2010.
- [22] CARTÉ, B.; FAULKNER, D. J. Defensive metabolites from three nembrothid nudibranchs. **The Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 48, p. 2314–2318, 1983.
- [23] BLACKMAN, A. J.; MATTHEWS, D. J. Amathamide alkaloids from the marine bryozoan Amathia Wilsoni Kirkpatrick. **Heterocycles**, Tóquio, v. 23, p. 2829, 1985.
- [24] BLACKMAN, A.; GREEN, R. Further amathamide alkaloids from the bryozoan Amathia wilsoni. **Australian Journal of Chemistry**, Melbourne, v. 40, p. 1655, 1987.
- [25] BLACKMAN, A.; ELDERSHAW, T.; GARLAND, S. Alkaloids from two further Amathia bryozoan species. **Australian Journal of Chemistry**, Melbourne, v. 46, p. 401, 1993.
- [26] MORRIS, B. D.; PRINSEP, M. R. Amathaspiramides A–F, novel brominated alkaloids from the marine bryozoan Amathia wilsoni. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 62, p. 688–693, 1999.

- [27] SHIMOKAWA, J.; CHIYODA, K.; UMIHARA, H.; FUKUYAMA, T. Antiproliferative activity of amathaspiramide alkaloids and analogs. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tóquio, v. 64, p. 1239–1241, 2016.
- [28] ZHANG, H. et al. Convolutamides A–F, novel  $\gamma$ -lactam alkaloids from the marine bryozoan *Amathia convoluta*. **Tetrahedron**, Amsterdã, v. 50, p. 10201–10206, 1994.
- [29] KAMANO, Y. et al. Convolutamydine A, a novel bioactive hydroxyoxindole alkaloid from marine bryozoan *Amathia convoluta*. **Tetrahedron Letters**, Amsterdã, v. 36, p. 2783–2784, 1995.
- [30] HASHIMA, H.; HAYASHI, M.; KAMANO, Y.; SATO, N. Synthesis and biological activities of the marine bryozoan alkaloids convolutamines A, C and F, and Lutamides A and C. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Amsterdã, v. 8, p. 1757–1766, 2000.
- [31] ZHANG, H. et al. Convolutamines A–E, novel  $\beta$ -phenylethylamine alkaloids from marine bryozoan *Amathia convoluta*. **Chemistry Letters**, Tóquio, v. 23, p. 2271–2274, 1994.
- [32] KAMANO, Y. et al. Three new alkaloids, convolutamines F and G, and Convolutamydine E, from the Floridian marine bryozoan *Amathia convoluta*. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, Praga, v. 64, p. 1147–1153, 1999.
- [33] LEE, N. K.; FENICAL, W.; LINDQUIST, N. Alternatamides A–D: New bromotryptamine peptide antibiotics from the Atlantic marine bryozoan *Amathia alternata*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 60, p. 697–699, 1997.
- [34] RUAN, B. F.; ZHU, H. L. The chemistry and biology of the bryostatins: Potential PKC inhibitors in Clinical Development. **Current Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 19, p. 2652–2664, 2012.
- [35] PETTIT, G. R. et al. Isolation and structure of bryostatin 1. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, v. 104, p. 6846–6848, 1982.
- [36] MUTTER, R.; WILLS, M. Chemistry and clinical biology of the bryostatins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Amsterdã, v. 8, p. 1841–1860, 2000.
- [37] LIN, H. et al. Studies on antineoplastic constituents from marine bryozoan *Bugula neritina* inhabiting South China Sea: Isolation and structural elucidation of a novel macrolide. **Academy Journal of the Second Military Medical University**, Xangai, v. 25, n. 5, p. 473–478, 2004.
- [38] LOPANIK, N.; GUSTAFSON, K. R.; LINDQUIST, N. Structure of bryostatin 20: A symbiont-produced chemical defense for larvae of the host bryozoan *Bugula neritina*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 67, p. 1412–1414, 2004.
- [39] GRINER, E. M.; KAZANIETZ, M. G. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. **Nature Reviews Cancer**, Londres, v. 7, p. 281–294, 2007.

- [40] WAY, K. J.; KATAI, N.; KING, G. L. Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. **Diabetic Medicine**, Hoboken, v. 18, p. 945–959, 2001.
- [41] ALKON, D. L.; SUN, M.-K.; NELSON, T. J. PKC signaling deficits: A mechanistic hypothesis for the origins of Alzheimer's disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, Amsterdã, v. 28, p. 51–60, 2007.
- [42] KORTMANSKY, J.; SCHWARTZ, G. K. Bryostatin-1: A novel PKC inhibitor in clinical development. **Cancer Investigation**, Philadelphia, v. 21, p. 924–936, 2003.
- [43] HORNUNG, R. L. et al. Preclinical evaluation of bryostatin as an anticancer agent against several murine tumor cell lines: In vitro versus in vivo activity. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 52, n. 1, p. 101–107, 1992.
- [44] TRENN, G. et al. Immunomodulating properties of a novel series of protein kinase C activators. The bryostatins. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 140, n. 2, p. 433–439, 1988.
- [45] KRAFT, A. S.; SMITH, J. B.; BERKOW, R. L. Bryostatin, an activator of the calcium phospholipid-dependent protein kinase, blocks phorbol ester-induced differentiation of human promyelocytic leukemia cells HL-60. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 83, p. 1334–1338, 1986.
- [46] PEREIRA, Fábio Renato. Metabólitos secundários bioativos e mediadores de relação predador/presa de invertebrados marinhos. 2012. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012. doi:10.11606/T.75.2012.tde-24072012-103637. Acesso em: 2024-11-05.
- [47] PARRA, Lizbeth Lorena Lopez. Uso de desreplicação por HPLC-UV-MS para a descoberta de metabólitos bioativos de invertebrados marinhos. 2016. Tese (Doutorado em Química Orgânica e Biológica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016. doi:10.11606/T.75.2016.tde-23032016-093705. Acesso em: 2024-11-05.
- [48] YI, L.; BANWELL, M. G.; LAN, P.; PESSOA, C. The tambjamines: pyrrolylpyrromethene-containing alkaloids with diverse biological profiles. Disponível em: [https://www.soc.chim.it/sites/default/files/thes/27/chapter\\_19.pdf](https://www.soc.chim.it/sites/default/files/thes/27/chapter_19.pdf). Acesso em: 10 nov. 2024

## 7 ANEXOS

Figura 45 – Expansão 1 do espectro de RMN-<sup>1</sup>H da fração SS23BRI09-pCN5-b3-II-X (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>).

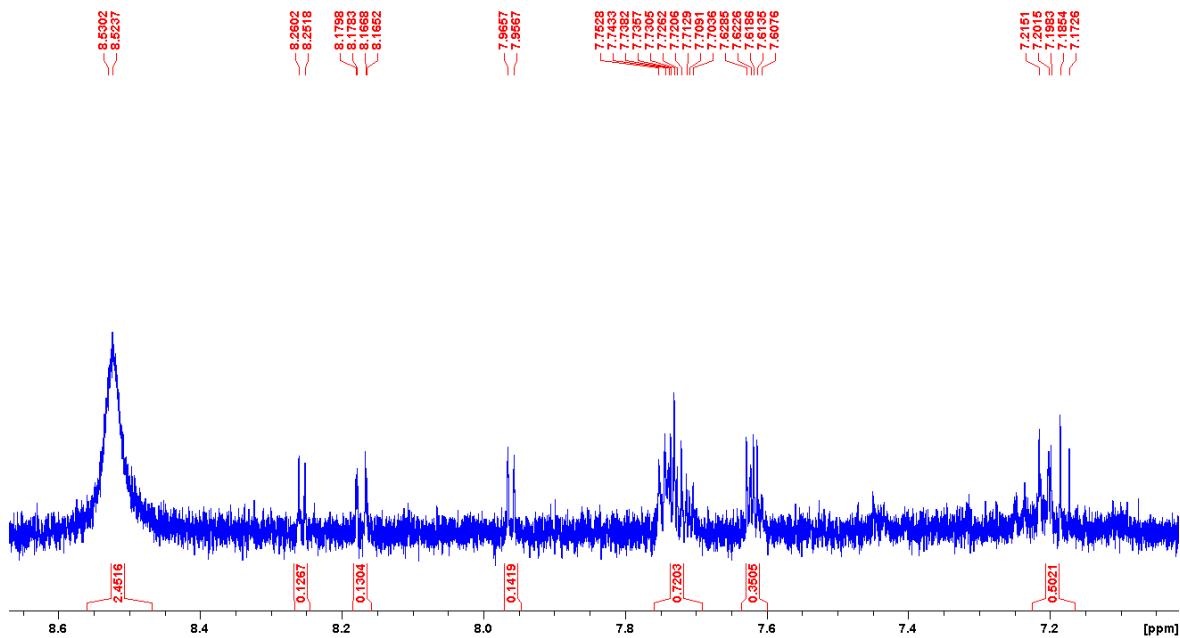


Figura 46 – Expansão 2 do espectro de RMN-<sup>1</sup>H da fração SS23BRI09-pCN5-b3-II-X (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>).

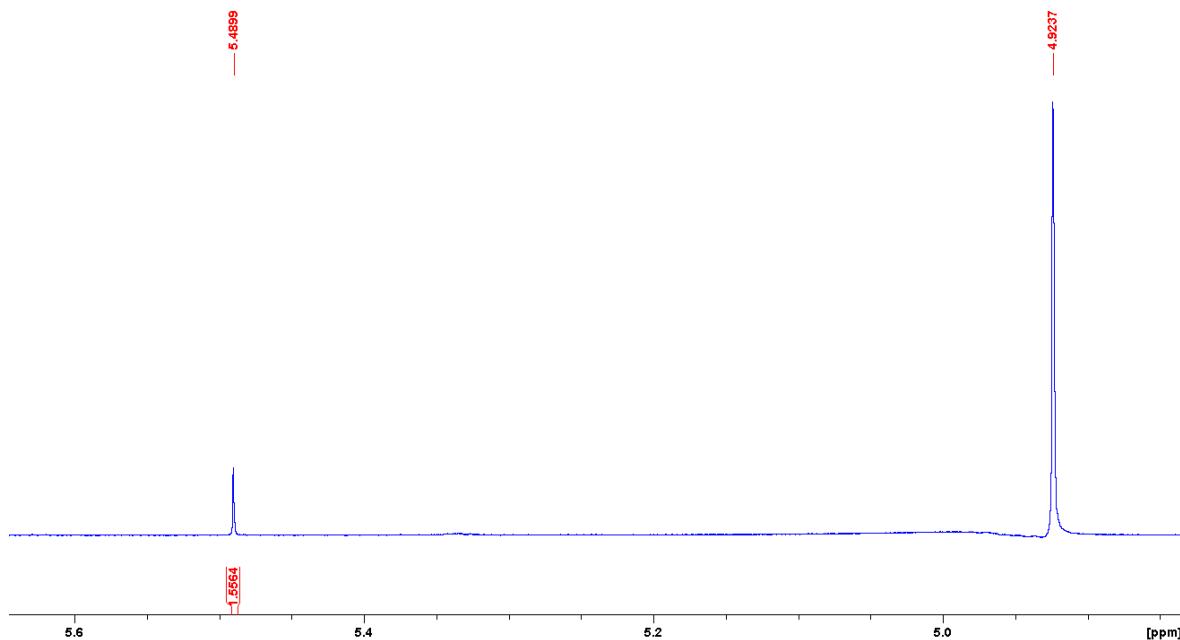


Figura 47 – Expansão 3 do espectro de RMN-<sup>1</sup>H da fração SS23BRI09-pCN5-b3-II-X (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>).

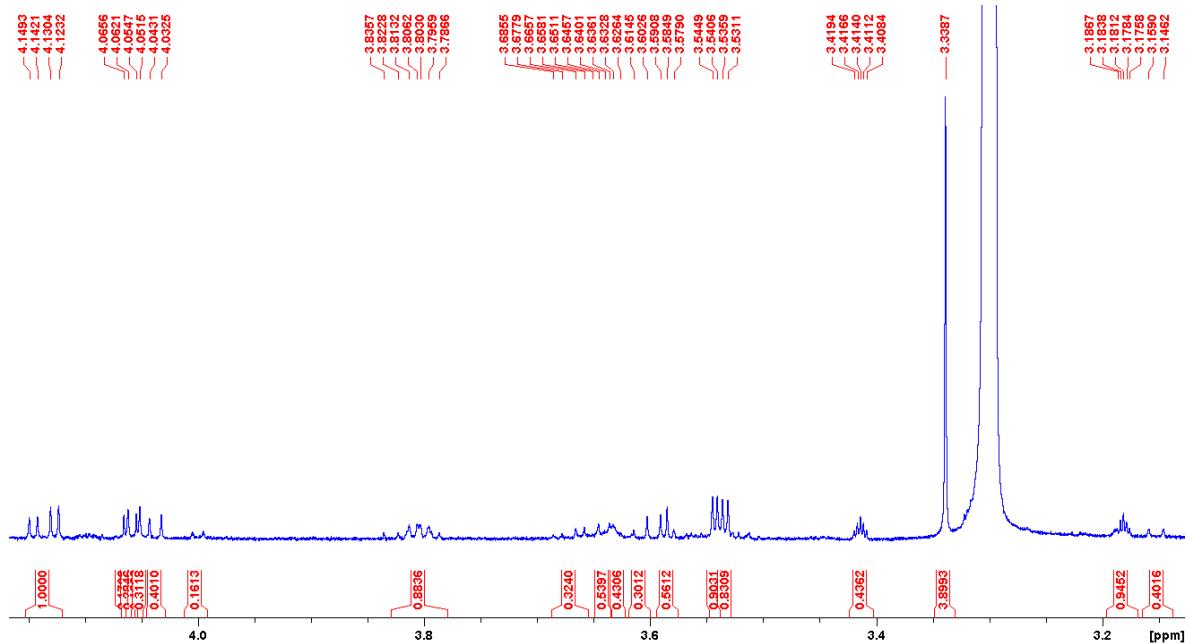
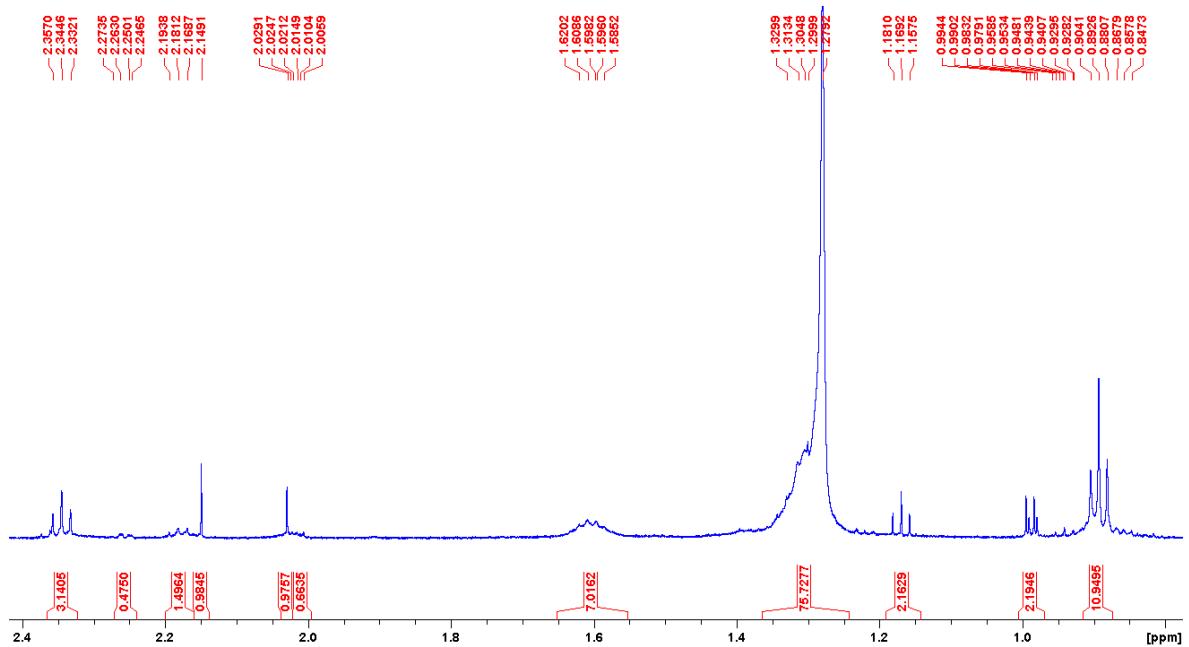
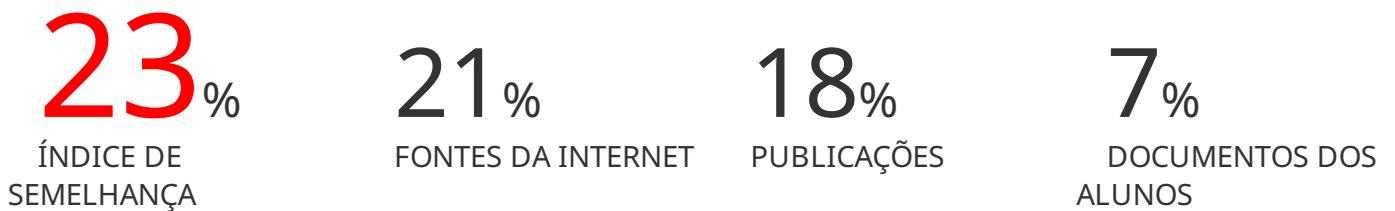


Figura 48 – Expansão 4 do espectro de RMN-<sup>1</sup>H da fração SS23BRI09-pCN5-b3-II-X (600 MHz, MeOH-*d*<sub>4</sub>).



# Monografia\_CAWZ\_2ºSemestre2024-v6.docx

## RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE



### FONTES PRIMÁRIAS

- |   |   |    |
|---|---|----|
| 1 | <a href="http://www.teses.usp.br">www.teses.usp.br</a>  | 4% |
| 2 | <a href="http://teses.usp.br">teses.usp.br</a>  | 4% |
| 3 | <a href="http://waikato.researchgateway.ac.nz">waikato.researchgateway.ac.nz</a>  | 1% |
| 4 | Silva, Everton Macêdo(Espindola, Laila Salmen). "Avaliação de compostos isolados da espécie do Cerrado Clusia pernambucensis G. Mariz em Leishmania (Leishmania) amazonensis", RIUnB, 2012.<br>Publicação | 1% |
| 5 | <a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a>  | 1% |
| 6 | <a href="http://experts.azregents.edu">experts.azregents.edu</a>  | 1% |
| 7 | <a href="http://repositorio.ufc.br">repositorio.ufc.br</a>  | 1% |

8	Mirelle Takaki. "Estudo metabolômico de fungos do gênero <i>&gt;i/i</i>	1 %
9	Reneid Emanuele Simplicio Dudu. "Isolamento e identificação de metabólitos bioativos de uma linhagem de fungo do ambiente marinho", Universidade de São Paulo. Agência de Bibliotecas e Coleções Digitais, 2024	1 %
10	repositorio.unesp.br Fonte da Internet	<1 %
11	Caroline Rodrigues de Oliveira. "Isolamento, identificação e derivatização de metabólitos secundários de fungos marinhos", Universidade de São Paulo. Agência de Bibliotecas e Coleções Digitais, 2023	<1 %
12	<a href="http://www.tcc.sc.usp.br">www.tcc.sc.usp.br</a> Fonte da Internet	<1 %
13	<a href="http://br.123dok.com">br.123dok.com</a> Fonte da Internet	<1 %
14	Submitted to Universidade de Sao Paulo Documento do Aluno	<1 %
15	<a href="http://repositorio.ufpb.br">repositorio.ufpb.br</a> Fonte da Internet	<1 %

16	<a href="#">epdf.pub</a> Fonte da Internet	<1 %
17	<a href="#">repositorio.usp.br</a> Fonte da Internet	<1 %
18	<a href="#">www.grafati.com</a> Fonte da Internet	<1 %
19	<a href="#">bioclass.ru</a> Fonte da Internet	<1 %
20	<a href="#">repositorio.ufsc.br</a> Fonte da Internet	<1 %
21	<a href="#">deposit.ub.edu</a> Fonte da Internet	<1 %
22	<a href="#">eprints.utas.edu.au</a> Fonte da Internet	<1 %
23	<a href="#">savoirs.usherbrooke.ca</a> Fonte da Internet	<1 %
24	<a href="#">cursos.ufrj.br</a> Fonte da Internet	<1 %
25	<a href="#">repositorio.unb.br</a> Fonte da Internet	<1 %
26	<a href="#">www.repositorio.ufal.br</a> Fonte da Internet	<1 %
27	"Estudo mecanístico da bioluminescência de fungos", 'Universidade de Sao Paulo, Agencia	<1 %

# USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA)'

Fonte da Internet

---

28	<a href="http://bdtd-dev.sc.usp.br">bdtd-dev.sc.usp.br</a>	<1 %
29	<a href="http://edoc.ub.uni-muenchen.de">edoc.ub.uni-muenchen.de</a>	<1 %
30	<a href="http://hal.archives-ouvertes.fr">hal.archives-ouvertes.fr</a>	<1 %
31	<a href="http://acervodigital.ufpr.br">acervodigital.ufpr.br</a>	<1 %
32	<a href="http://dspace.cuni.cz">dspace.cuni.cz</a>	<1 %
33	<a href="http://link.springer.com">link.springer.com</a>	<1 %
34	<a href="http://www.pgetno.ufrpe.br">www.pgetno.ufrpe.br</a>	<1 %
35	Luciana Mecatti Elias. "Bioprospecção de fungos endofíticos isolados de guaranazeiros da Amazônia", Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA), 2016 Publicação	<1 %
36	<a href="http://worldwidescience.org">worldwidescience.org</a>	<1 %

---

---

37	<a href="http://www.ufmt.edu.br">www.ufmt.edu.br</a>	<1 %
Fonte da Internet		
38	<a href="http://repositorio.ufscar.br">repositorio.ufscar.br</a>	<1 %
Fonte da Internet		
39	<a href="http://mts.intechopen.com">mts.intechopen.com</a>	<1 %
Fonte da Internet		
40	<a href="http://digitum.um.es">digitum.um.es</a>	<1 %
Fonte da Internet		
41	<a href="http://munin.uit.no">munin.uit.no</a>	<1 %
Fonte da Internet		
42	<a href="http://www.trabalhosfeitos.com">www.trabalhosfeitos.com</a>	<1 %
Fonte da Internet		
43	<a href="http://livros01.livrosgratis.com.br">livros01.livrosgratis.com.br</a>	<1 %
Fonte da Internet		
44	<a href="http://1library.org">1library.org</a>	<1 %
Fonte da Internet		
45	<a href="http://Submitted to University of Nottingham">Submitted to University of Nottingham</a>	<1 %
Documento do Aluno		
46	<a href="http://repositorio.bc.ufg.br">repositorio.bc.ufg.br</a>	<1 %
Fonte da Internet		
47	<a href="http://vdocuments.com.br">vdocuments.com.br</a>	<1 %
Fonte da Internet		
48	<a href="http://docshare.tips">docshare.tips</a>	<1 %
Fonte da Internet		

---

- 49 [www.dq.ufscar.br](http://www.dq.ufscar.br)                                                        

        <img alt="Red square icon" data

---

Excluir citações

Desligado

Excluir bibliografia

Desligado

Excluir

correspondências

< 10 words