UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA

ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS EM ESPONJAS DE ÁGUA DOCE DA AMAZÔNIA

GLAUCIA CRISTINA MANÇO DA COSTA BOLSON

MANAUS/AM
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA

GLAUCIA CRISTINA MANÇO DA COSTA BOLSON

ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS EM ESPONJAS DE ÁGUA DOCE DA AMAZÔNIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para como requisito para obtenção do título de Doutor em Inovação Farmacêutica

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior

MANAUS/AM
2020

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bolson, Glaucia Cristina da Costa
B693e Estudo químico e atividades farmacológicas em esponjas de água doce da Amazônia / Glaucia Cristina da Costa Bolson . 2020
99 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Valdir Florêncio da Veiga Junior
Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Esponja. 2. Biotividade. 3. Esteróis. 4. Metaboloma. 5. Amazônia. I. Veiga Junior, Valdir Florêncio da. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

"Estudo químico e atividades farmacológicas em esponjas de água doce da Amazônia".

DISCENTE: GLAUCIA CRISTINA MANÇO DA COSTA BOLSON

PARECER:

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de Doutora em Inovação Farmacêutica em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus - AM, 27/02/2020.

Profa. Dra. Tatiane Pereira de Souza
Coordenadora do PPGIF

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior
Orientador e presidente da banca

Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Membro interno (UFAM)

Prof. Dr. Anderson Cavalcante Guimarães
Membro interno (UFAM)

Profa. Dra. Rita de Cassia Saraiva Nunomura
Membro interno (UFAM)

Dra. Olinda Maria Figueira Canhoto
Membro externo (CBA)

Dedico esta importante conquista às pessoas que eu mais amo: Pai Antônio, Mãe Aparecida, Esposo Marcos e minha vozinha Teresinha. Pelas angústias e preocupações que passaram por minha causa, pela a dedicação a mim...Sem vocês, nada faz sentido... Com vocês, tudo é possível... Por vocês, tudo vale a pena ...AMO VOCÊS...

AGRADECIMENTOS

A **Deus** em primeiro lugar, pois sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais e esposo, **Aparecida, Antônio e Marcos**, que sempre estiveram ao meu lado, fortalecendo-me, tendo paciência nos momentos difíceis, entendendo as minhas ausências, muito obrigada pelo apoio e suporte de vocês, também nada seria possível sem o suporte de vocês.

In memoriam a minha vozinha **Terezinha**, que nesse período partiu deste mundo para os braços do Pai, obrigada vó por ter sido um exemplo de vida e força, a senhora foi o maior motivo desse doutorado, sentirei saudades eternamente e sempre estará em meu coração e na minha memória, meu amor pela senhora nunca se esgotará. Amo-te para sempre.

Ao meu orientador Professor **Valdir Veiga**, por todos os ensinamentos, paciência, suporte e puxões de orelha, muito obrigada por ter me aceitado como sua aluna para esse desafio.

Aos amigos e colegas que conquistei durante esses quatro anos de doutorado, obrigada pela ajuda que cada um pode me dar, sendo ela grande ou pequena, todos contribuíram de alguma forma para meu crescimento como pessoa e profissional nesse período (**Yasmin, Larissa, Emily, Milena, Simone, Leandro, Nathália, Ananda, Karens, Renata, Steve, Isabelly, Pricilas, Davi, Isadora, Maurício, Erick, Rodrigo, Vitória, Virlane, Alanne, Rafael, Bruno, Rose, Fred, Lamarão, Jésika, Orlando, Fábio**).

"Um dia, quando olhares para trás, verás que os dias mais belos foram aqueles em que lutaste"
Sigmaund Freud

RESUMO

As esponjas (filo Porífera), são animais aquáticos, com exemplares marinhos e de água doce. Embora encontradas em várias regiões, as esponjas de águas doce constituem uma das faunas menos conhecidas em todo o mundo. Sendo a maioria dos estudos relatados com esponjas marinhas. As esponjas possuem um enorme potencial biotecnológico na pesquisa de produtos naturais devido às diversas atividades biológicas. Assim como as esponjas marinhas, que apresentam vários compostos bioativos (por exemplo, alcalóides, macrólidos, peptídeos, policetídeos, quininas, esteróis e terpenóides), espécies de esponjas de água doce são relatadas como quimicamente constituídas por ácidos graxos e esteróis. No estudo químico de esponjas de água doce, os esteróis merecem atenção devido à grande diversidade que apresentam e o grande potencial biológico. Os compostos produzidos por esponjas são recursos naturais importantes, podendo levar à produção de medicamentos para auxiliar principalmente no tratamento de doenças neurodegenerativas e malária. Devido a ausência de estudos químicos e biológicos desses organismos na Amazônia, foi que motivou a realização de trabalhos na região devido a grande ocorrência destes. O presente trabalho teve como objetivo, caracterizar e identificar composto químicos a partir do metabolismo de esponjas por meio de análise metabolômica e avaliar a inibição da acetilcolinesterase e butirilcolinesterase (AChE e BuChE) e a inibição do *Plasmodium falciparum*, dos extratos em metanol de esponjas de água doce da Amazônia (*Drulia uruguayensis, Drulia cristata, Drulia browni e Metania reticulata*). Para verificar o perfil químico dos extratos, foram realizadas análises em espectrometria de massas por inserção direta e cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detector de espectrometria de massas de alta resolução. Para verificar à atividade inibitória da acetilcolinesterase foi utilizado o método de Ellman, modificado por Lima e a atividade inibitória do *P. falciparum* foi de acordo com a plataforma da FIOCRUZ-AM. Todos os extratos inibiram a AChE, porém, nenhuma atividade foi observada em relação à BChE. O extrato de *Drulia uruguayensis* apresentou maior inibição a AChE, com IC_{50} = 1,04 mg/mL. Para atividade antiplasmódica, todas as espécies apresentaram inibição a *P. falciparum*, mas a amostra de *Metania reticulata* foi a mais eficiente com IC_{50} = 2,7 μg/mL. A análise metabolômica realizada por espectrometria de massa evidenciou a presença de biomarcadores que auxiliaram na diferenciação das espécies, os biomarcadores encontrados nos extratos ativos foram identificados como ácidos graxos e esteróis. Os metabólitos das esponjas de água doce apresentam poucos estudos na literatura, no entanto com os resultados obtidos, auxiliou no enriquecimento e significância dos estudos com esponjas de água doce, que já comprovam que na região Amazônica as esponjas possuem metabólitos com atividades semelhantes às marinhas.

Palavras chaves: esponja, bioatividade, esteróis, metaboloma, Amazônia

ABSTRACT

Sponges (phylum Porifera), are aquatic animals, with marine and freshwater specimens. Although found in several regions, freshwater sponges are one of the least known faunas in the world. Most studies are reported with marine sponges. Sponges have an enormous biotechnological potential in the search for natural products due to the various biological activities. Just like marine sponges, which feature various bioactive compounds (eg, alkaloids, macrolides, peptides, polyketides, quinines, sterols and terpenoids), species of freshwater sponges are reported to be chemically made up of fatty acids and sterols. In the chemical study of freshwater sponges, sterols deserve attention due to the great diversity they present and the great biological potential. The compounds produced by sponges are important natural resources, which can lead to the production of drugs to help mainly in the treatment of neurodegenerative diseases and malaria. Due to the absence of chemical and biological studies of these organisms in the Amazon, it was the reason for carrying out work in the region due to their great occurrence. The present work aimed to characterize and identify chemical compounds from the metabolism of sponges by means of metabolomic analysis and to evaluate the inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase (AChE and BuChE) and the inhibition of *Plasmodium falciparum*, of methanol extracts from sponges of freshwater from the Amazon (*Drulia uruguayensis, Drulia cristata, Drulia browni and Metania reticulata*). To verify the chemical profile of the extracts, analyzes were performed in mass spectrometry by direct insertion and high-performance liquid chromatography coupled to a high-resolution mass spectrometry detector. To verify the inhibitory activity of acetylcholinesterase, the Ellman method was used, modified by Lima, and the inhibitory activity of P. falciparum was used according to the FIOCRUZ-AM platform. All extracts inhibited AChE, however, no activity was observed in relation to BChE. The extract of *Drulia uruguayensis* showed greater inhibition of AChE, with IC_{50} = 1.04 mg/mL. For antiplasmodial activity, all species showed inhibition of *P. falciparum*, but the sample of *Metania reticulata* was the most efficient with IC_{50} = 2.7 μg/mL. The metabolomic analysis carried out by mass spectrometry showed the presence of biomarkers that helped differentiate species, the biomarkers found in the active extracts were identified as fatty acids and sterols. The metabolites of freshwater sponges have few studies in the literature, however with the results obtained, it has helped in the enrichment and significance of studies with freshwater sponges, which already prove that in the Amazon region sponges have metabolites with similar activities to marine sponge.

Keyword: sponge, bioactivity, sterols, metabolomic, Amazonia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Perfil químico cromatográfico do extrato em acetato de etila de *Drulia uruguayensis*: (A) UV-254 nm, (B) UV-366 nm, (C) UV-visível e (D) vanilina sulfúrica. 21

Figura 2. Perfil químico cromatográfico do extrato em acetato de etila de *Drulia browni*: (A) UV-254 nm, (B) UV-366 nm, (C) UV-visível e (D) vanilina sulfúrica..... 22

Figura 3. Perfil químico cromatográfico do extrato em acetato de etila de *Drulia cristata*: (A) UV-254 nm, (B) UV-366 nm, (C) UV-visível e (D) vanilina sulfúrica..... 22

Figura 4. Perfil químico cromatográfico do extrato em acetato de etila de *Trochospngilla paulula*: (A) UV-254 nm, (B) UV-366 nm, (C) UV-visível e (D) vanilina sulfúrica. . 23

Figura 5. Perfil químico cromatográfico do extrato em acetato de etila de *Metania fitikaui*: (A) UV-254 nm, (B) UV-366 nm, (C) UV-visível e (D) vanilina sulfúrica. .. 23

Figura 6. Perfil químico cromatográfico do extrato em acetato de etila de *Metania reticulata*: (A) UV-254 nm, (B) UV-366 nm, (C) UV-visível e (D) vanilina sulfúrica. 24

Figura 7. Perfil químico cromatográfico do extrato em metanol de *Drulia uruguayensis*: (A) UV-254 nm, (B) UV-366 nm e (C) vanilina sulfúrica. 26

Figura 8. Perfil químico cromatográfico do extrato em metanol de *Drulia browni*: (A) UV-254 nm, (B) UV-366 nm e (C) vanilina sulfúrica. 27

Figura 9. Perfil químico cromatográfico do extrato em metanol de *Drulia cristata*: (A) UV-254 nm, (B) UV-366 nm e (C) vanilina sulfúrica. 28

Figura 10. Perfil químico cromatográfico do extrato em metanol de *Metania reticulata*: (A) UV-254 nm, (B) UV-366 nm e (C) vanilina sulfúrica. 30

Figura 11. Placa cromatográfica do agrupamento em acetato de etila com rfs das substâncias da espécie *Drulia uruguayensis*. 31

Figura 12. Placa cromatográfica do agrupamento em acetato de etila com rfs das substâncias da espécie *Drulia browni*. 31

Figura 13. Placa cromatográfica do agrupamento em acetato de etila com rfs das substâncias da espécie *Drulia cristata*..... 32

Figura 14. Placa cromatográfica do agrupamento em acetato de etila com rfs das substâncias da espécie *Trochospongilla paulula.* 32

Figura 15. Placa cromatográfica do agrupamento em acetato de etila com rfs das substâncias da espécie *Metania reticulata*..... 32

Figura 16. Placa cromatográfica do agrupamento em acetato de etila com Rfs das substâncias da espécie *Metania fitikaui*. 33

Figura 17. Placa cromatográfica do agrupamento em metanol com rfs das substâncias da espécie *Drulia uruguayensis.* 33

Figura 18. Placa cromatográfica do agrupamento em metanol com rfs das substâncias da espécie *Drulia browni.* 34

Figura 19. Placa cromatográfica do agrupamento em metanol com rfs das substâncias

da espécie *Drulia cristata.* 34

Figura 20. Placa cromatográfica do agrupamento em metanol com rfs das substâncias da espécie *Metania reticulata.* 35

Figura 21. Dendrograma de similaridade das espécies de esponjas em extrato em acetato de etila no revelador em ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm por meio da análise estatística de HCA. 38

Figura 22. Representação gráfica dos componentes principais das espécies de esponjas em extrato em acetato de etila no revelador em ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm. 39

Figura 23. Dendrograma de similaridade das espécies de esponjas em extrato em acetato de etila no revelador em ultravioleta no comprimento de onda de 366 nm por meio da análise estatística de HCA. 40

Figura 24. Representação gráfica dos componentes principais das espécies de esponjas em extrato em acetato de etila no revelador em ultravioleta no comprimento de onda de 366 nm. 42

Figura 25. Dendrograma de similaridade das espécies de esponjas em extrato em acetato de etila no revelador em ultravioleta no comprimento de onda do visível por meio da análise estatística de HCA. 43

Figura 26. Representação gráfica dos componentes principais das espécies de esponjas em extrato em acetato de etila no revelador em ultravioleta no comprimento do visível. 44

Figura 27. Dendrograma de similaridade das espécies de esponjas em extrato em acetato de etila no revelador químico vanilina por meio da análise estatística de HCA. 45

Figura 28. Representação gráfica dos componentes principais das espécies de esponjas em extrato em acetato de etila no revelador químico vanilina sulfúrica. 46

Figura 29. Dendrograma de similaridade das espécies de esponjas em extrato em metanol no revelador em ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm por meio da análise estatística de HCA. 47

Figura 30. Representação gráfica dos componentes principais das espécies de esponjas em extrato em metanol no revelador em ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm. 48

Figura 31. Dendrograma de similaridade das espécies de esponjas em extrato em metanol no revelador em ultravioleta no comprimento de onda de 366 nm por meio da análise estatística de HCA. 49

Figura 32. Representação gráfica dos componentes principais das espécies de esponjas em extrato em metanol no revelador em ultravioleta no comprimento de onda de 366 nm. 50

Figura 33. Dendrograma de similaridade das espécies de esponjas em extrato em metanol no revelador em ultravioleta visível por meio da análise estatística de HCA. 51

Figura 34. Representação gráfica dos componentes principais das espécies de esponjas em extrato em acetato de etila no revelador em ultravioleta no comprimento do visível. 52

Figura 35. Dendrograma de similaridade das espécies de esponjas em extrato em acetato de etila no revelador químico vanilina por meio da análise estatística de HCA. 53

Figura 36. Representação gráfica dos componentes principais das espécies de esponjas em extrato em metanol no revelador químico vanilina sulfúrica. 54

Figura 37. Cromatograma da coluna em CLMP da fração em clorofórmio. linha azul: sistema de eluentes; linha vermelha: 254 nm e linha preta: 366 nm. 57

Figura 38. Placa cromatográfica das frações 1 a 18 da coluna do MPLC com a fração clorofórmio. Eluente da placa: clorofórmio/acetato de etila 9: 1. Visualização luz UV 366 nm e 254 nm. 58

Figura 39. Cristais e CCD dos cristais formados das frações 3 e 4. 58

Figura 40. Cromatograma da coluna em CLMP da fração em diclorometano. linha azul: sistema de eluentes; linha vermelha: 254 nm e linha preta: 366 nm. 59

Figura 41. Placa cromatográfica das frações 1 a 11 da coluna do MPLC. Eluentes da placa: diclorometano (100%). Visualização luz UV 366 nm e 254 nm. 60

Figura 42. Placa preparativa na primeira (A), segunda (B) e terceira (C) eluição usando a fração 5 da coluna do MPLC. Eluentes da placa: diclorometano: clorofórmio (90:10) Visualização luz UV 366 nm. 60

Figura 43. CCD das frações 1 a 10 da placa preparativa eluentes da placa: diclorometano: clorofórmio (90:10) Visualização luz UV 366 nm, 254 nm e vanilina sulfúrica. 61

Figura 44. Curva de inibição de Ee-AChE pelo extrato metanólico de *D. uruguayensis*.Valores representam a média de dois ensaios independentes, cada um realizado em triplicata. *p<0,05. 63

Figura 45. Estrutura químicas dos compostos 1-12. 67

Figura 47. Cromatograma pico-base de cada espécie avaliada no modo de ionização positiva. 69

Figura 48. Moléculas identificadas - (A) ácido araquídico, (B) 22-desidrocolesterol, (C) 24-isopropilcolesta-5,22,25-trien-3β-ol, (D) penta-hidroxi-9,11-secosterol, (E) esteróis di-hidroxilados e (F) esterol tri-hidroxilado. 72

Figura 49. Análise quimiométrica do modo de ionização positiva por (A) HCA, (B) PCA com os principais componentes 1 e 2 e (C) PCA com os principais componentes 1 e 3. 73

Figura 50. Análise quimiométrica do modo de ionização negativa por (A) HCA, (B) PCA. 75

LISTA DE TABELA

Table1. Atividade de EeAChE na presença de extratos metanólicos de esponjas coletadas na Amazônia. 62

Tabela 2. Padrão de fragmentação dos sinais identificados no modo de ionização positiva. 70

Table 3. Sinais (*m/z*) mais significativos para o agrupamento de amostras durante a análise quimiométrica dos dados do modo de ionização positiva. 70

Tabela 4. Sinais (*m/z)* mais significativos para o agrupamento de amostras durante a análise quimiométrica dos dados do modo de ionização negativa. 76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11

2 OBJETIVOS 13

2.1 Geral 13

2.2 Específicos 13

3 MATERIAIS E MÉTODOS 14

3.1 Reagentes e Solventes 14

3.1.1 Amostras 14

3.1.2 Extração 14

3.2 Técnicas cromatográficas 14

3.2.1 Cromatografia em Camada Delgada 15

3.2.2 Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência 15

3.2.3 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa 15

3.2.4 Cromatografia líquida de média pressão (CLMP) 16

3.3 Técnicas espectrométricas 16

3.3.1 Espectrometria de massa 16

3.3.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 16

3.4 Ensaios Biológicos 17

3.4.1 Atividade Inibidora da Colinesterase 17

3.4.2 Atividade antiplasmodial 18

3.5 Análise Estatística 19

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 20

4.1 Caracterização do perfil químico por cromatografia em camada delgada 20

4.2 Cromatografia Líquida de Média Pressão 57

5 Ensaios Biológicos 62

5.1 Atividade inibidora da acetilcolinesterase 62

5.2 Atividade antiplasmodial 63

6 Espectrometria de Massas 64

6.1 Avaliação quimiossistemática do modo de ionização positiva 72

6.2 Avaliação quimiossistemática do modo de ionização negativa 75

7 CONCLUSÃO 78

8 REFERÊNCIAS 80

ANEXO 1 – Chemical Composition and Biological Activities of Metania and Drulia (Metaniidae) Freshwater Sponges from Amazonia 85

ANEXO 2 - Freshwater Sponge Sterols 89

ANEXO 3 - Chemosystematic evaluation of Amazonian Freshwater sponges 94

1 INTRODUÇÃO

Produtos derivados de fontes naturais como plantas, animais e micro-organismos são definidos como produtos naturais, e historicamente vem sendo investigados por indústrias farmacêuticas para produção de novos fármacos (BAKER, 2007). O interesse na busca por fontes alternativas de substâncias farmacologicamente ativas como as esponjas vem crescendo substancialmente.

Entre todos os organismos marinhos pesquisados, as esponjas marinhas (Porífera) são caracterizadas como as mais abundantes fontes de novos produtos naturais marinhos, com cerca de 4.851 compostos, contribuindo para cerca de 30% de todos os produtos naturais marinhos descobertos até agora. Deve-se observar que, destas, 1499 novos compostos foram isolados nos anos de 2008 a 2012 (BLUNT et al., 2010-2014). A descoberta anual desses produtos teve um aumento significativo devido ao desenvolvimento de instrumentos modernos da tecnologia analítica, especialmente o desenvolvimento do espectrômetro de alta resolução, da ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massa (EM) acoplado a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG) (MEHBUB et al., 2014).

Com esta profusão de novos produtos acessíveis, diversos estudos têm evidenciado um amplo espectro de atividades biológicas destes compostos, incluindo anticâncer, antiviral, antibacteriano, antifúngico, antiprotozoários, anti-helmínticos, anti-inflamatória, imunossupressiva, neurossupressiva, neuroprotetor, antibiofilme e uma gama de outros bioatividades (BLUNT et al., 2005).

A descoberta de produtos naturais marinhos a partir de esponjas, em particular, e outros, bem como os principais organismos marinhos trará terapias novas e eficazes

contra doenças humanas. O acervo de pesquisas relacionadas aos estudos da química de produtos naturais e atividades biológicas produzidos pelas esponjas marinhas são numerosos, a maioria desses estudos foram e são realizados geralmente em outros países, somente nas últimas três décadas que ocorreu o seu desenvolvimento no Brasil (GRANATO et al, 2005; KELECOM, 1998).

Junto aos micro-organismos, as esponjas são a principal fonte de novos fármacos nas últimas décadas. Entre potentes antitumorais e medicamentos para o sistema imunológico que têm permitido os transplantes e os tratamentos de diversas doenças, as substâncias químicas observadas nas esponjas de todo o mundo são importantes fontes na busca por novos tratamentos no novo milênio. Em comparação com as esponjas do ambiente marinho, pouco se sabe sobre as esponjas dulcícolas, em especial, que são importantes indicadores ambientais das águas dos rios que frequentam.

Na região Amazônica o estudo químico de esponjas já teve seu início, com o projeto de BARROS et.al, (2013), que obteve frações esteroídicas a partir dos extratos apolares das esponjas de água doce da Amazônia, que foi identificado esteróis majoritários (compostos apolares) como: o colesterol foi encontrado em maior concentração na família Spongillidae; o esterol 24-etil-colesta-5,22-dieno-3β-ol, mostrou-se majoritário nas amostras das famílias Metaniidae e Potamolepidae, diferenciando-as da Spongillidae. Também foram identificados outros três esteróis 24-metil-colesta-5,22-dieno-3β-ol, 24-metil-colesta-5-eno-3β-ol e 24-etil-colesta-5-eno-3β-ol. Apontando assim semelhanças com compostos também encontrados em esponjas marinhas.

Os novos compostos isolados durante a última década foram classificados em 18 classes químicas, incluindo ácidos, alcaloides, ésteres, ácidos graxos, glicosídeos, cetonas, lipídios, macrolídeos, álcoois, peptídeos, peróxidos, de policetídeos, quinonas,

esteróis e terpenos. Alcaloides, terpenos e peptídeos, são as quatro classes que constituem aproximadamente 50% dos compostos descobertos (BLUNT et al., 2003-2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Caracterizar e identificar compostos de extratos metanólicos obtidos de esponjas de água doce da Amazônia para verificação de atividades farmacológicas

2.2 Específicos

- Caracterizar e identificar as estruturas por técnicas cromatográficas e espectrométricas.
- Aplicar métodos estatísticos multivariados na identificação de compostos como biomarcadores das espécies de esponjas de água doce da Amazônia.
- Avaliar atividades de inibições da acetilcolinesterase e do *P. falciparum.*

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e Solventes

Todos os reagentes químicos utilizados foram adquiridos pelo grupo de Química de Biomoléculas da Amazônia – Q-BiomA. Todos os solventes utilizados para o desenvolvimento deste estudo apresentam grau de pureza para análise (P.A.) e foram previamente destilados no laboratório de Pós-Graduação de Produtos Naturais.

3.1.1 Amostras

Todas as amostras utilizadas nesta pesquisa foram obtidas durante a estação seca do estado do Amazonas (Brasil), em novembro de 2010. Amostras de *D. uruguayensis, D. browni* e *M. reticulata* foram coletadas no Rio Negro, enquanto amostras de *D. cristata* foram obtidas em Lago Juá (Pará, Brasil). O comprovante de cada amostra foi identificado pela especialista em taxonomista Cecilia Volkmer-Ribeiro em esponjas de água doce e depositado no Museu Zoobotânico da Fundação de Ciências Naturais sob os números FZB/MCN 8686, 8407, 8485 e 8010.

3.1.2 Extração

O procedimento de extração foi realizado por maceração com solventes de polaridade crescente (hexano, AcOEt e MeOH, 3 vezes cada). Após cada ciclo de extração, o solvente foi removido e concentrado no evaporador rotativo sob pressão reduzida.

3.2 Técnicas cromatográficas

A fim de verificar os constituintes presentes nos extratos em metanol e acetato de etila, técnicas cromatográficas foram empregadas, tais como: Cromatografia em Camada

Delgada (CCD) e Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE).

3.2.1 Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada foi utilizada para analisar o perfil químico dos extratos. Foram utilizadas placas flexíveis de alumínio cobertas com gel de sílica $60F_{256}$ fase normal, sílica gel RP-18 fase reversa e o revelador universal vanilina sulfúrica. Os sistemas de eluentes foram preparados conforme a natureza da amostra com intuito de obter a melhor separação cromatográfica, sendo utilizados os solventes água, metanol, acetato de etila, clorofórmio, diclorometano, acetonitrila, acetona, butanona e dietilamina. Como reveladores, utilizou-se luz ultravioleta e vanilina sulfúrica.

3.2.2 Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência

A técnica de cromatografia em camada delgada de alta eficiência foi utilizada para obter separações mais eficientes e por possuir uma melhor resolução em comparação à cromatografia em camada delgada, então foram utilizados os equipamentos da CAMAG TLC Visualizer e LINOMAT de aplicação automática, sendo utilizadas as mesmas condições de eluição e revelação das placas.

3.2.3 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

Cromatografia em camada delgada preparativa, foi utilizada com o objetivo de obter isolamento usando uma placa de vidro 10x10 com sílica gel normal. Foram utilizadas 10 mg de amostra e a mesma foi solubilizada em 1 mL acetato de etila . Para aplicação na placa foram utilizados 80 µL da amostra, o sistema de eluentes foi butanona/acetato de etila (2:8). Após a eluição da placa, foi realizada a raspagem dos constituintes visualizados em ultravioleta no comprimento de onda 366 nm. Em seguida, foi realizada a extração dos constituintes com acetato de etila por sonicação durante 30

minutos, posteriormente, as frações foram filtradas e evaporadas.

3.2.4 Cromatografia líquida de média pressão (CLMP)

Para realizar os fracionamentos dos extratos de média polaridade foi utilizado o equipamento Isolera One da Biotage com detector de arranjo de diodos (DAD) para auxiliar no isolamento dos constituintes, sendo utilizadas colunas de sílica de fase normal do tipo SNAP ultra de 10 g e 50 g. Os sistemas de eluentes utilizados foram no modo gradiente com os solventes, clorofórmio, butanona, acetato de etila e metanol.

3.3 Técnicas espectrométricas

3.3.1 Espectrometria de massa

Para verificar o perfil químico dos extratos, foi realizada espectrometria de massa, e as amostras foram analisadas no Laboratório de Espectrometria de Massa do Centro Analítico da UFAM. As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em metanol, foram retirados 20 µL de cada amostra e diluídos em 80 µL de metanol. Um TSQ Quantum Access triplo quadrupolo (Thermo, Waltham, MA, EUA) foi utilizado com a fonte de ionização ESI no modo de íon positivo e negativo. O intervalo de detecção foi de 100 a 1000 Da. As condições de trabalho da ionização foram: tensão capilar 4,5kV, temperatura da fonte 250 °C, vazão do cone de gás 70 L/ h; caudal do gás de dessolvatação 600 L/h e temperatura de dessolvatação 350 °C. Gases de nitrogênio (99% de pureza) e argônio (99% de pureza) foram utilizados como nebulização e colisão (varredura iônica do produto, MS/MS). A aquisição dos dados foi obtida e processada no software Xcalibur 2.0.7.

3.3.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de Ressonância Magnética Nuclear foram realizadas no Laboratório

de Ressonância Magnética nuclear na central analítica da UFAM. As substâncias isoladas foram solubilizadas em clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) e identificadas por RMN ^{1}H, ^{13}C.

3.4 Ensaios Biológicos

3.4.1 Atividade Inibidora da Colinesterase

Para determinar a atividade anticolinesterase, o método de Ellman foi modificado e a placa de 96 poços foi utilizada (Ellman et al., 1961; Lima et al., 2009). As velocidades de hidrólise do substrato por AChE e butirilcolinesterase (BChE) em função da concentração da amostra foram avaliadas para *Electrophorus electricus* AChE (EeAChE) e BChE do soro equino (EqBChE). Os reagentes AChE, BChE e Ellman (DTNB) foram preparados em tampão fosfato (100 mM, pH 7,4). Iodeto de acetiltiocololina (ATCI) e iodeto de butiriltiocolina (BTCI) foram preparados em água destilada. As amostras de estoque (50 mg/mL) foram preparadas em metanol (MeOH) e adequadamente diluídas em tampão fosfato para as concentrações desejadas imediatamente antes do uso. Todas as soluções foram mantidas em gelo durante o experimento. Todas as experiências foram realizadas a 37 ± 1 °C.

Todos os poços experimentais receberam EeAChE (0,01 U/mL) ou EqBChE (0,05 U/mL), DTNB (0,25 mM) e tampão fosfato (controle - atividade enzimática) ou soluções de amostra (1 mg/mL). A mistura foi incubada por 10 min. Em seguida, ATCI (0,5 mM) ou BTCI (1,0 mM) foi adicionado a todos os poços e a placa foi lida imediatamente por 5 min em um espectrofotômetro (Spectramax 340PC, Molecular Device®). A hidrólise espontânea do substrato foi avaliada através da substituição da enzima por tampão. O solvente (MeOH) foi avaliado na concentração mais alta (5%) usada no experimento. Todas as concentrações se referem aos valores finais. A amostra *Drulia uruguayensis* foi testada em pelo menos cinco concentrações diferentes. A atividade enzimática

(absorbância/min) em uma solução de amostra foi determinada por comparação com o controle (mistura sem amostra) e expressa como a alteração no desvio óptico a 412 nm. Os valores de absorbância/min foram calculados pelo software Softmax Pro 6.4®. Os valores de inibição foram calculados por regressão não linear com o software Graph Pad Prism 5 (GraphPad software®, San Diego, CA, EUA). Para cada amostra, os resultados correspondem à média ± desvio padrão de dois experimentos, sendo cada um deles realizado em triplicado. EeAChE, EqBChE, ATCI, BTCI e DTNB foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Brasil).

3.4.2 Atividade antiplasmodial

Para a avaliação da atividade antiplasmodial, foi utilizada a linhagem FCR3, uma cepa de P. falciparum resistente à cloroquina. O cultivo do parasita foi realizado de acordo com Trager e Jensen (Trager e Jensen, 1976), com 1% de parasitemia final e 2% de hematócrito. A avaliação da atividade antiplasmodial foi realizada de acordo com Rabelo e colaboradores (Rabelo et al., 2014) Os extratos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO; 0,5% no poço) e avaliados em placas de 96 poços em diferentes concentrações. Após 72 h de incubação, o brometo de etídio (substância fluorescente que se liga ao DNA da célula) foi adicionado aos poços e, posteriormente, foram lavados três vezes com 200 mL de tampão PBS 1X a 800 rpm por 5 min. No final, as amostras foram ressuspensas em 200 µL de tampão 1X PBS para análise no citômetro de fluxo BD FACSCanto II BD (BD Biosciences, San Jose, EUA) no canal FL-1 com o software Getting Started with BD FACSDiva ™ e FlowJo ™ versão 10. O crescimento parasitário em DMSO a 0,5% foi usado como controle positivo, e os eritrócitos não parasitados como controle negativo. Quinina foi usada como medicamento de referência. A porcentagem de inibição do crescimento do parasita foi determinada pela fórmula:% Inibição = 10 - (% amostra de

fluorescência -% fluorescência de eritrócitos saudáveis % controle de fluorescência-% de fluorescência eritrócitos sólidos) × 100). Os valores de IC50 das amostras foram calculados por regressão não linear usando o software GraphPad Prism® Versão 7.00.

3.5 Análise Estatística

A Análise Hierárquica de Clustering (HCA) e a Análise de Componentes Principais (PCA) foram realizadas no OriginPro 2017. O HCA usou os métodos de Ward e a distância euclidiana, enquanto o PCA aplicou níveis de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$). A análise multivariada dos dados espectrométricos considerou cada sinal *m/z* observado como uma variável discreta, usando sua intensidade relativa como resposta. A intensidade relativa foi obtida por normalização com norma suprema em função do pico *m/z* com maior intensidade, convertendo absoluto em abundância relativa de cada pico (de 0 a 100%).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do perfil químico por cromatografia em camada delgada

Para iniciar a caracterização do perfil químico cromatográfico, vários sistemas de eluição foram testados até que se obteve um sistema com a melhor separação das substâncias nas placas cromatográficas. Após inúmeras tentativas, os melhores sistemas foram: butanona/acetato (2:8), para os extratos em acetato de etila, dietilamina/metanol (6:4), para os extratos em metanol.

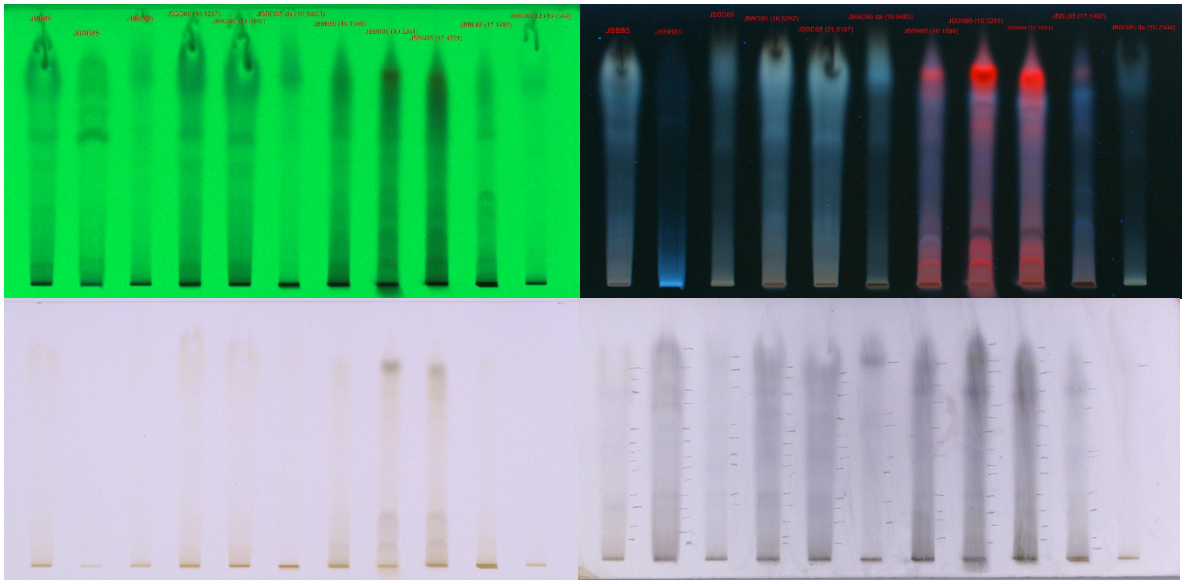
Com o sistema de eluição definido para os dois tipos de extratos, deu-se o início da caracterização do perfil cromatográfico das espécies *Drulia uruguyanesis*, *Drulia browni*, *Drulia cristata*, *Metania reticulta*, *Metania fitikaui* e *Trochospongilla paulula*, avaliado por meio da revelação nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, UV-vis e no revelador químico vanilina sulfúrica.

As amostras foram coletadas em diferentes locais da região Amazônica, um dos pontos avaliados foi a interferência do local de coleta na composição química dos extratos.

Foi possível verificar que o local de coleta pode influenciar sobre a amostra, no entanto, esponjas que foram coletadas em uma mesma área apresentaram perfis químicos distintos, sugerindo que o sítio de coleta pode ou não definir a composição química das amostras. Isso pode ser observado nas amostras de *Drulia uruguayensis* JBBD85, que foram coletadas no Porto de Manaus – AM, contudo mostraram características químicas diferentes (Figura 1). Também foram observadas substâncias de colorações distintas, como as reveladas nas amostras JBBD85, JBBN85, JBBB e JBBL (Figura 1B), coletadas

no Porto de Manaus – AM, arquipélago de Anavilhanas – AM, Igarapé do Encanto, Belterra – PA e Rio Maués Açú, Maués – AM, respectivamente.

A B

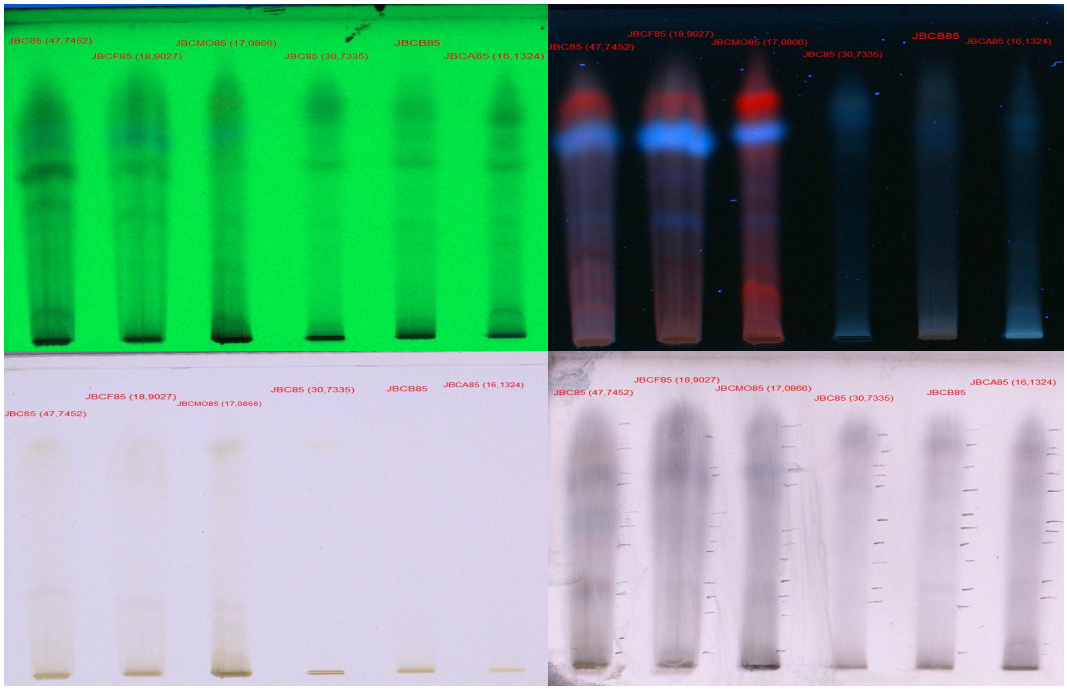


C D

Figura 1. Perfil químico cromatográfico do extrato em acetato de etila de *Drulia uruguayensis*: (A) UV-254 nm, (B) UV-366 nm, (C) UV-visível e (D) vanilina sulfúrica.

As amostras de *Drulia browni* (Figura 2) apresentaram dois perfis diferentes, as amostras JBC, JBCF e JBCMO que foram coletadas no Rio Negro, Iranduba – AM e arquipélago de Anavilhanas – AM, nesta ordem, apresentaram uma semelhança. O mesmo fato ocorreu com as amostras JBCB, JBCA e JBC que foram coletadas na Praia da Lua, Manaus – AM e Lago Janauari, Iranduba – AM. Neste caso o local de coleta não influenciou na composição química, pois todas foram coletadas em sítios distintos. Foram notadas nas amostras JBC, JBCF e JBCMO manchas com a colorações vermelha e azul predominantes (Figura 2B), já nas amostras JBCB, JBCA e JBC as manchas apresentaram colorações azul e amarela (Figura 2B).

A B



C D

Figura 2. Perfil químico cromatográfico do extrato em acetato de etila de *Drulia browni*: (A) UV-254 nm, (B) UV-366 nm, (C) UV-visível e (D) vanilina sulfúrica.

Nos extratos de *Drulia cristata* (Figura 3) não foram identificadas diferenças no perfil químico das amostras, sendo a mancha de cor azul prevalente (Figura 3B).

A C

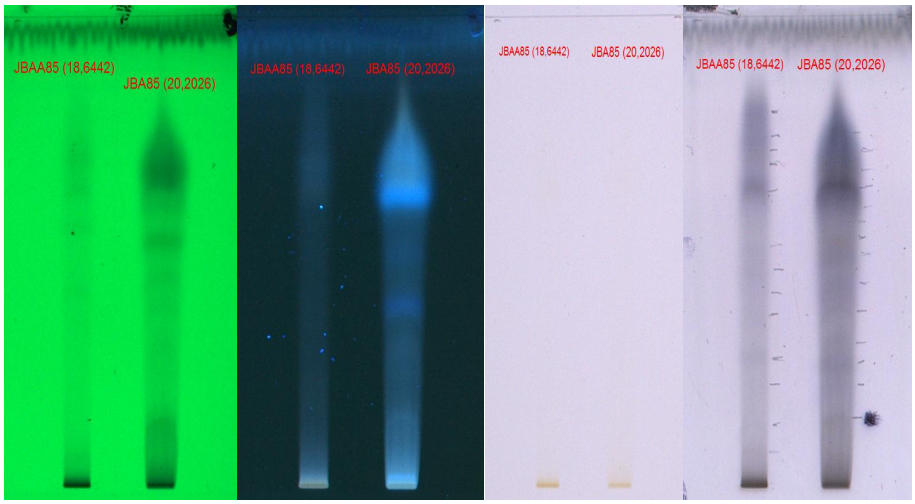


Figura 3. Perfil químico cromatográfico do extrato em acetato de etila de *Drulia cristata*: (A) UV-254 nm, (B) UV-366 nm, (C) UV-visível e (D) vanilina sulfúrica.

No perfil químico da espécie *Trochospongilla paulula* foi possível observar no comprimento de onda 254 nm duas manchas intensas (Figura 4A), sendo essas manchas menos intensa no comprimento de onda 366 nm, as manchas mais evidentes em 366 nm são as cores azul e vermelha (Figura 4B).

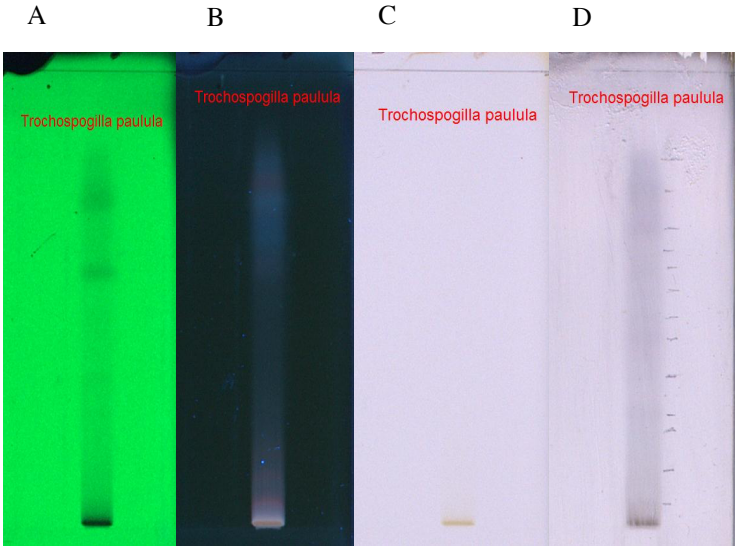


Figura 4. Perfil químico cromatográfico do extrato em acetato de etila de *Trochospngilla paulula*: (A) UV-254 nm, (B) UV-366 nm, (C) UV-visível e (D) vanilina sulfúrica.

Na amostra de *Metania fitikaui* foi possível perceber duas manchas bem intensas no comprimento de onda de 254 nm (Figura 5A), já no comprimento de onda de 366 nm apenas uma mancha com maior intensidade de cor azul foi notada (Figura 5B).

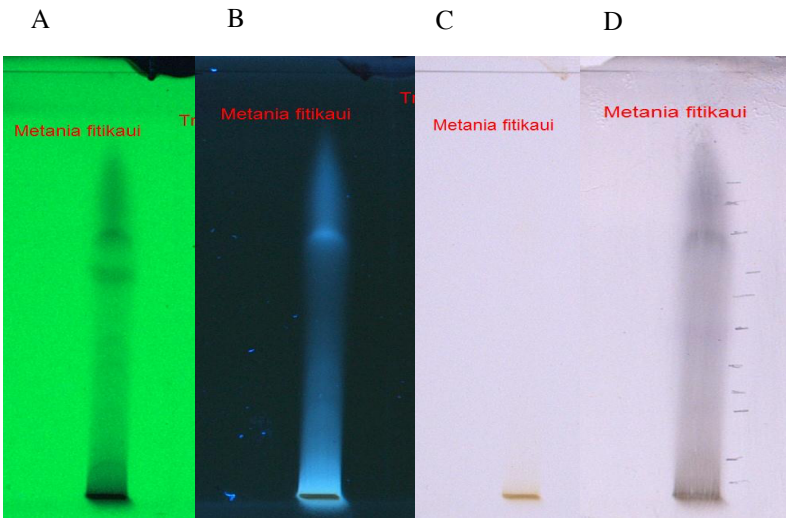
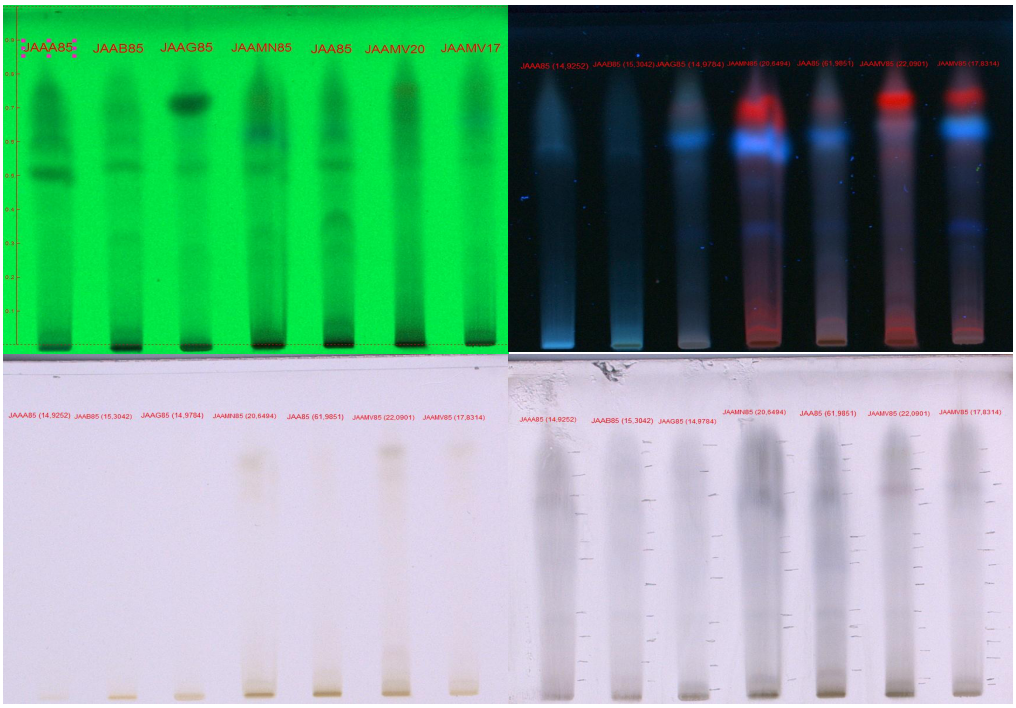


Figura 5. Perfil químico cromatográfico do extrato em acetato de etila de *Metania fitikaui*: (A) UV-254 nm, (B) UV-366 nm, (C) UV-visível e (D) vanilina sulfúrica.

A composição química da espécie *Metania reticulata* mostrou três perfis diferentes, o primeiro pode ser observado nas amostras JAAA e JAAB (Figura 6 A e B) que são semelhantes e apresentam manchas mais acentuadas em 254 nm, em 366 nm as manchas foram menos intensas e com a coloração azul. O segundo é representado pela amostra JAAG (Figura 6 A e B), que em 254 nm exibi uma mancha bem evidente e outras com menos intensidade, já em 366 nm notam-se duas manchas mais evidenciadas de cores azul e vermelha, é possível observar outras manchas menos intensas de colorações não muito definidas. O terceiro perfil é evidenciado pelas amostras JAAMN, JAA, JAAMV(20) e JAAMV(17) (Figura 6), todas coletadas no arquipélago de Anavilhanas – AM, apresentando uma composição química análoga, com manchas de cores azul e vermelha predominantes que podem ser examinadas facilmente no comprimento de onda 366 nm (Figura 6B).

A B



C D

Figura 6. Perfil químico cromatográfico do extrato em acetato de etila de *Metania reticulata*: (A) UV-254 nm, (B) UV-366 nm, (C) UV-visível e (D) vanilina sulfúrica.

O perfil cromatográfico das amostras em extrato metanólico foi analisado do mesmo modo que os extratos em acetato de etila, verificando se o local de coleta tem influência sobre o perfil químico das amostras e as semelhanças e diferenças entre as amostras.

Nas amostras de *Drulia uruguayensis* verificou-se que as amostras JBBN(23) e JBBN(21), coletadas no arquipélago de Anavilhanas – AM, apresentaram perfis químicos diferentes, essa diferença pode ser verificada melhor no comprimento de onda de 366 nm (Figura 7B), na qual a amostra JBBN(23) revela manchas de colorações intensas como azul e vermelho, também é possível ver outras cores mais tênues como o amarelo e verde. Já na amostra JBBN(21) (Figura 7B) não é possível observar a cor vermelha de forma mais intensa, apenas é possível notar uma mancha azul fina que também é perceptível na amostra JBBN(23) e uma mancha amarela mais evidente que na amostra JBBN(23), essas mesmas manchas amarela e azul são visíveis em outras duas amostras, a JBBD(20) e a JBBD(15), sendo essas últimas amostras coletadas no Porto de Manaus, indicando que o sítio de coleta não influenciou na composição química das amostras JBBN(21), JBBD(20) e JBBD(15) (Figura 7B). As amostras JBBL e JBBL(17) (Figura 7) , foram coletadas no Rio Maués localizado no município de Maués – AM, e apresentaram o mesmo perfil químico, porém diferente das demais amostras. O extrato de JBBB (Figura 7) também mostrou uma composição química diferente das outras amostras, assim como o extrato de JBB (Figura 7).

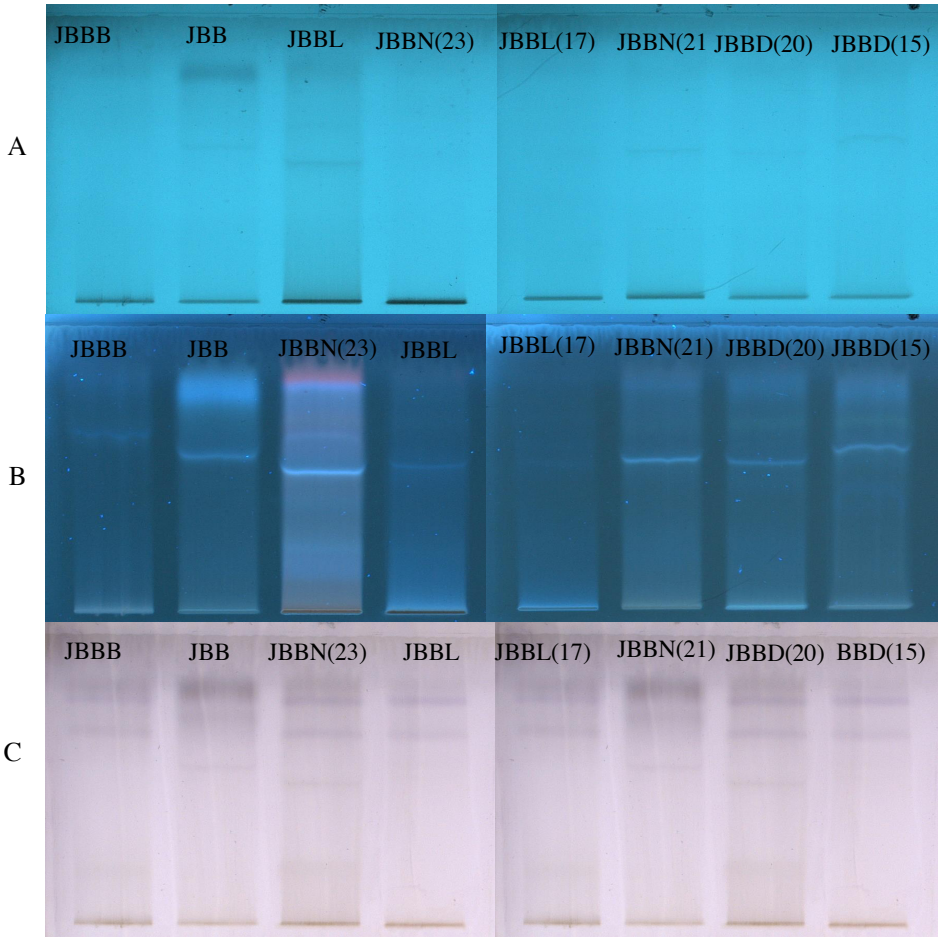


Figura 7. Perfil químico cromatográfico do extrato em metanol de *Drulia uruguayensis*: (A) UV-254 nm, (B) UV-366 nm e (C) vanilina sulfúrica.

As amostras de *Drulia browni* JBCMO, JBCF e JBC(29) (Figura 8), foram coletadas no arquipélago de Anavilhanas – AM e no Rio Negro, Iranduba – AM, essas três amostras apresentaram um perfil químico cromatográfico semelhante, com manchas fortes, de colorações azul e vermelha visíveis em 366 nm (Figura 8B), no revelador químico de vanilina sulfúrica foi possível observar manchas que não parecem no comprimentos revelados, o sítio de coleta não influenciou na composição química. As amostras JBCA, JBCB e JBC (58) (Figura 8), coletadas no Lago Janauari, Iranduba – AM e Praia da Lua, Manaus – AM, tiveram um perfil semelhante entre si, com a presença de machas intensas de cor azul e manchas mais leves de cor amarela que foram visíveis em 366 nm (Figura 8B), também foi observados manchas similares em nas amostras em

vanilina sulfúrica, neste caso o lugar da coleta também não interviu no perfil químico. Sendo assim, as amostras JBCMO, JBCF e JBC(29) foram distintas das amostras JBCA, JBCB e JBC (58).

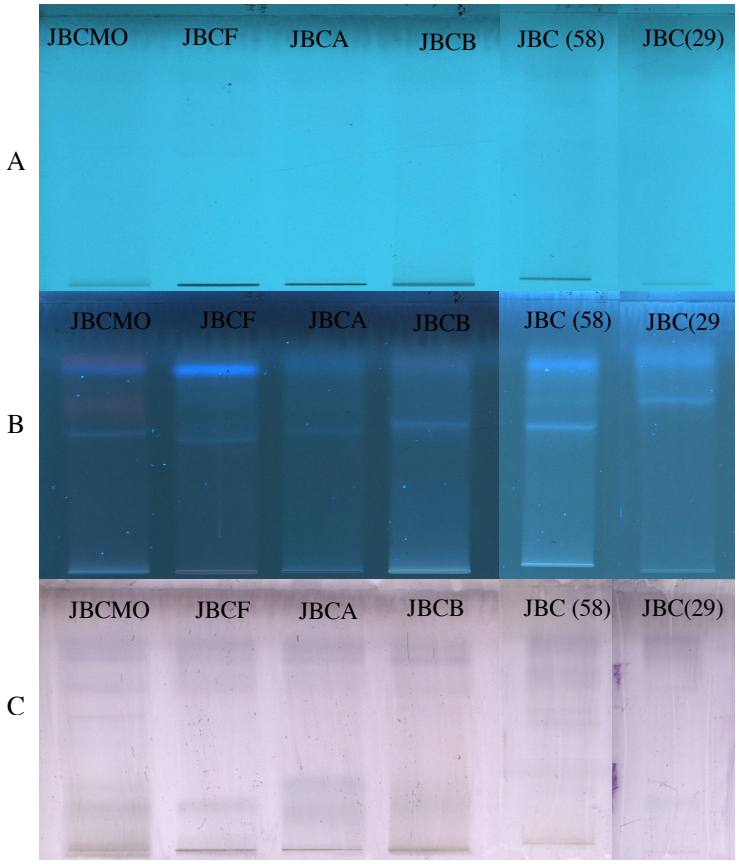


Figura 8. Perfil químico cromatográfico do extrato em metanol de *Drulia browni*: (A) UV-254 nm, (B) UV-366 nm e (C) vanilina sulfúrica.

Na espécie de *Drulia browni*, todas amostras são oriundas do estado do Pará, a amostra JBAA (Figura 9) foi coletada no Igarapé Encanto, Belterra – PA, já as amostras de JBAB (Figura 9) foram coletadas no Lago do Juá – PA. A JBAA apresentou um perfil diferente das demais amostras, é possível visualizar três machas bem intensas no comprimento de onda 254 nm, em 366 nm foi possível perceber somente uma mancha fina de cor azul, não sendo possível ter uma visualização de outras manchas definidas, já com revelador químico vanilina sulfúrica observou-se manchas que não foram perceptíveis nos comprimentos de onda 254 e 366 nm. Apesar de terem sidos coletadas

em uma mesma área as amostras de JBAB mostram um perfil diferente entre si. Na amostra JBAB(10) verificou-se uma mancha bem acentuada e duas bem tênues em 254 nm, em 366 nm notou-se uma mancha fina azul bem marcante e uma outra não tão bem definida, já em vanilina sulfúrica foi possível observar quatro manchas intensas bem mais definidas do que em 254 e 366 nm. Nas demais amostras, JBAB(16) e JBAB(18), o perfil químico foi similar, com manchas perceptíveis em 254 nm, em 366 nm verificou-se machas de colorações azul e amarela bem notórias e manchas mais bem definidas em vanilina sulfúrica, porém as mesmas já observadas nos comprimentos de onda 254 e 366 nm.

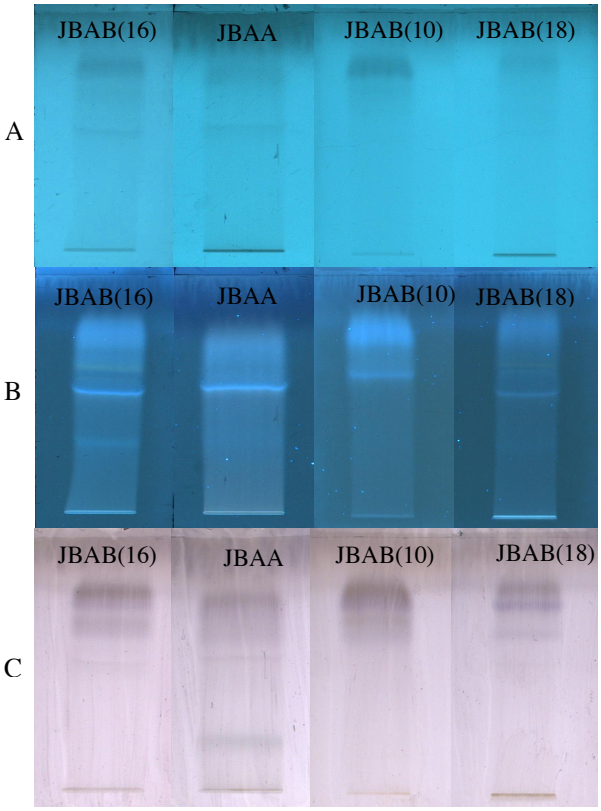


Figura 9. Perfil químico cromatográfico do extrato em metanol de *Drulia cristata*: (A) UV-254 nm, (B) UV-366 nm e (C) vanilina sulfúrica.

Na espécie *Metania reticulata* (Figura 10), a amostra JAAG apresentou um perfil diferenciado das outras com a presença das mesmas manchas nos comprimentos

de onda 254 e 366 mn, com a cor azul, em vanilina sulfúrica além das manchas presentes em 254 e 366 nm, foi possível visualizar novas manchas. Na amostra JAAB(20) percebeu-se uma mancha de cor azul intensa em 366 nm, que também é possível ver em 254 nm, já em vanilina sulfúrica notou-se a presença de outras manchas não percebidas anteriormente. A amostra JAAMV(16), apresentou várias manchas azuis e uma mancha vermelha bem suave em 366 nm, em 254 nm é possível visualizar as mesmas manchas de 336 mn, em vanilina sulfúrica pode-se observar as manchas anteriores e novas manchas. Em JAAMV(21), foi possível visualizar em 254 nm apenas duas manchas, em 366 nm três manchas são mais evidentes, sendo duas de cor azul e uma vermelha, no revelador químico vanilina seis manchas foram bem notórias. As amostras JAA, JAAMN e JAAMN(20) apresentaram perfis químicos semelhantes, no comprimento de onda em 254 nm três manchas foram bem evidentes, em 366 nm foram visualizadas manchas de cores azuis e vermelhas intensas. Já em vanilina sulfúrica as amostras apresentaram várias manchas de colorações azul, roxa e marrom. Nas amostras JAAA e JAAB, foram perceptíveis apenas duas manchas tanto em 254 nm como em 366 mn, todavia, no revelador químico de vanilina sulfúrica foram identificadas outras manchas que não haviam sido observadas nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, essas manchas apresentaram colorações azul, roxo e marrom.

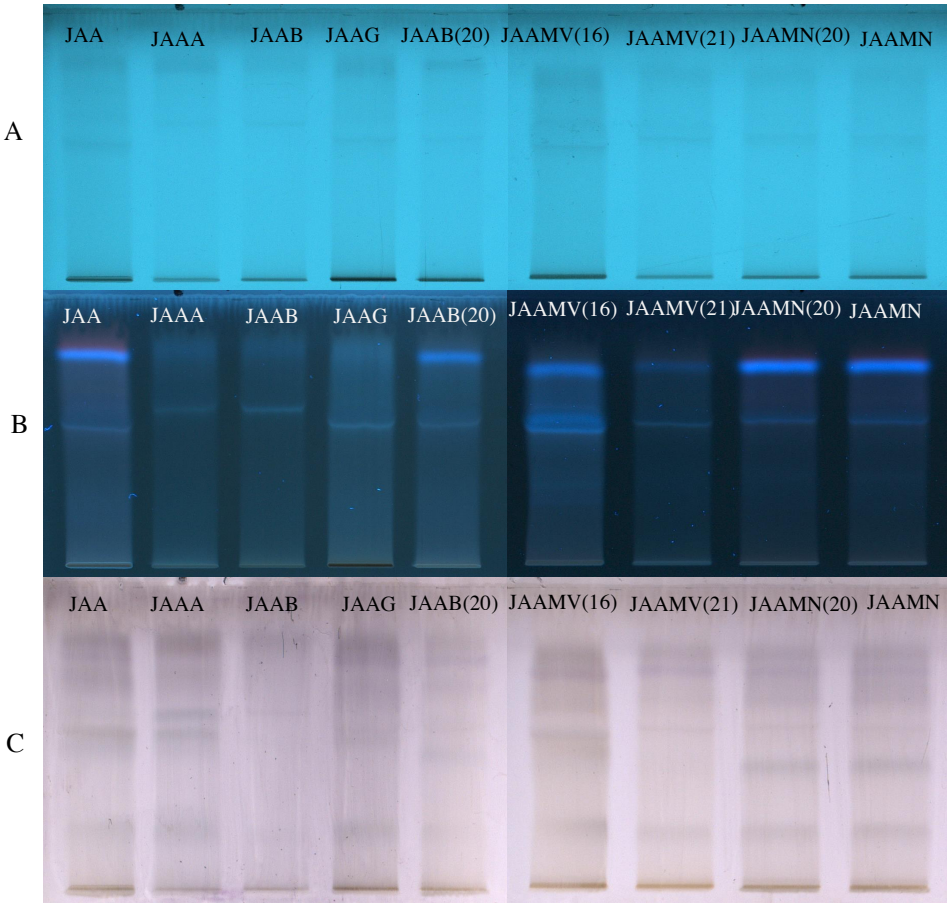


Figura 10. Perfil químico cromatográfico do extrato em metanol de *Metania reticulata*: (A) UV-254 nm, (B) UV-366 nm e (C) vanilina sulfúrica.

Após a análise do perfil cromatográfico dos extratos em acetato de etila e metanol, as amostras que apresentaram semelhanças foram agrupadas de acordo com as espécies para obtenção de uma quantidade maior de massa do material. Com isso, um novo perfil cromatográfico foi realizado por meio da cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE) para melhor separação e visualização dos constituintes químicos presentes nas amostras.

As placas foram realizadas nas mesmas condições das placas iniciais, foram inseridos os rfs das manchas observadas (Figuras 11-20) com auxílio do programa WinCats. Esses rfs foram organizados em tabelas de acordo com extratos e espécies, que estão em anexo, para melhor compreensão.

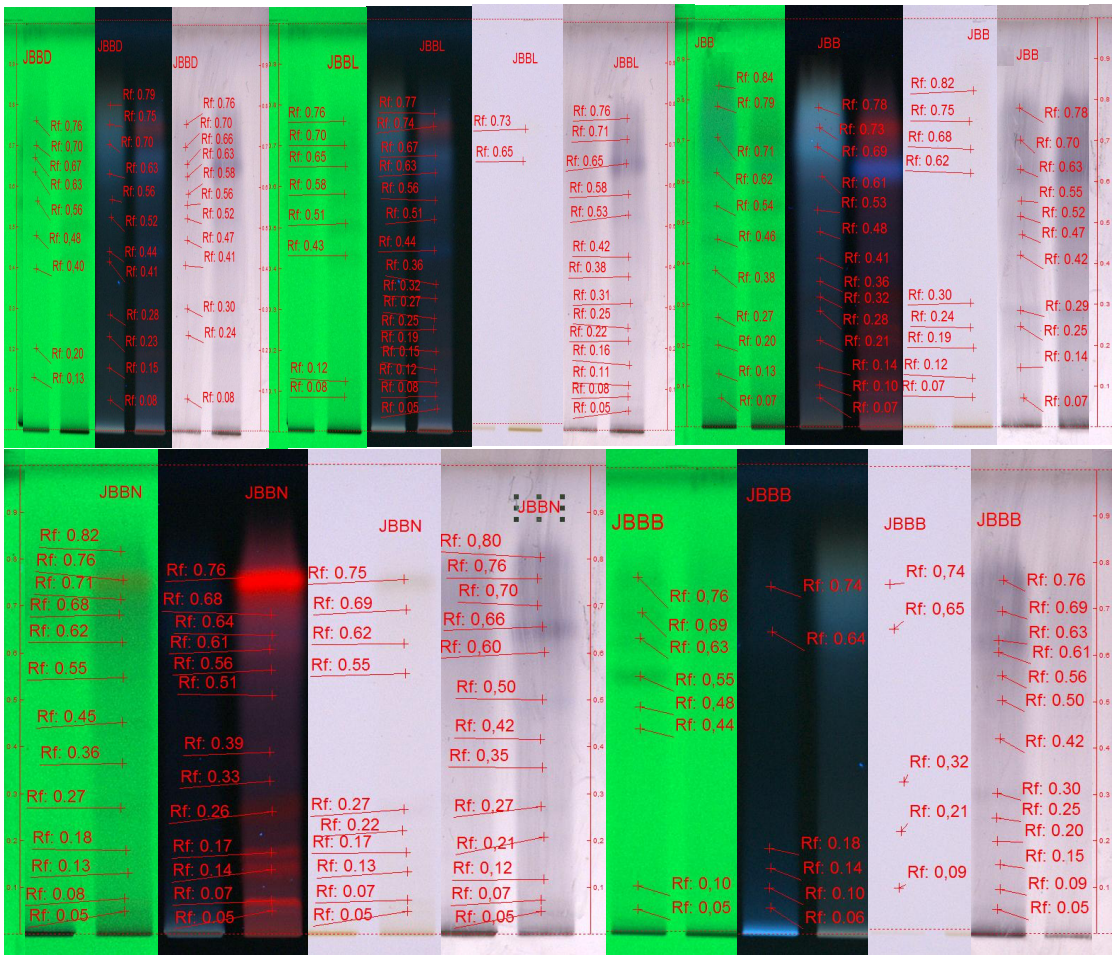


Figura 11. Placa cromatográfica do agrupamento em acetato de etila com rfs das substâncias da espécie *Drulia uruguayensis*.

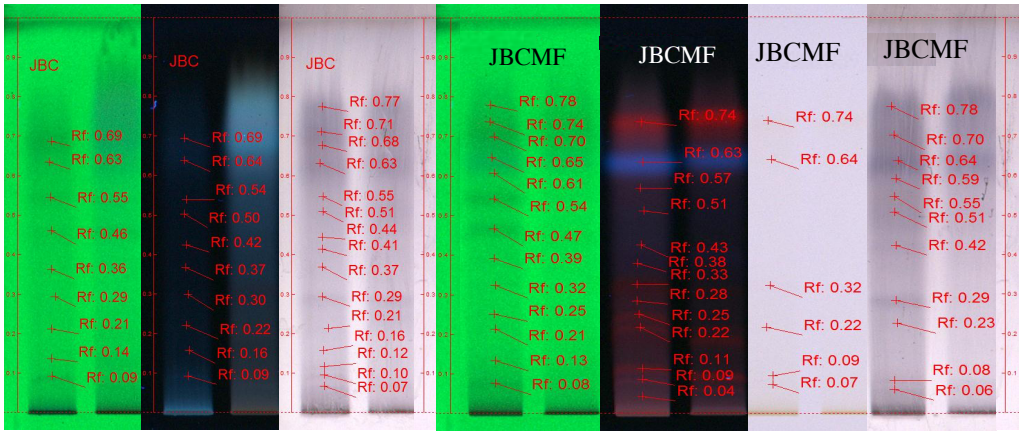


Figura 12. Placa cromatográfica do agrupamento em acetato de etila com rfs das substâncias da espécie *Drulia browni*.

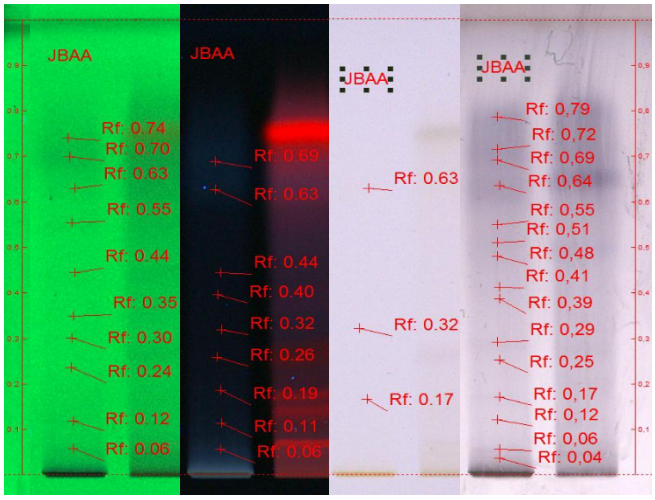


Figura 13. Placa cromatográfica do agrupamento em acetato de etila com rfs das substâncias da espécie *Drulia cristata*.

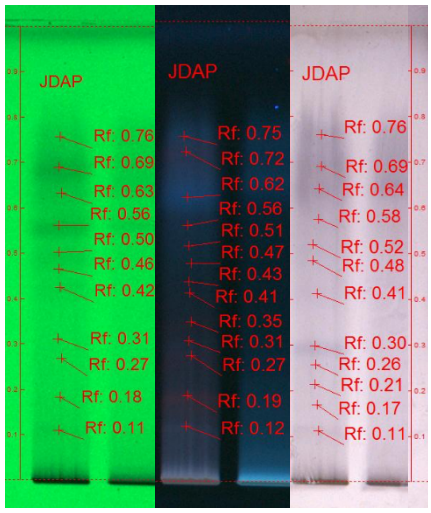


Figura 14. Placa cromatográfica do agrupamento em acetato de etila com rfs das substâncias da espécie *Trochospongilla paulula.*

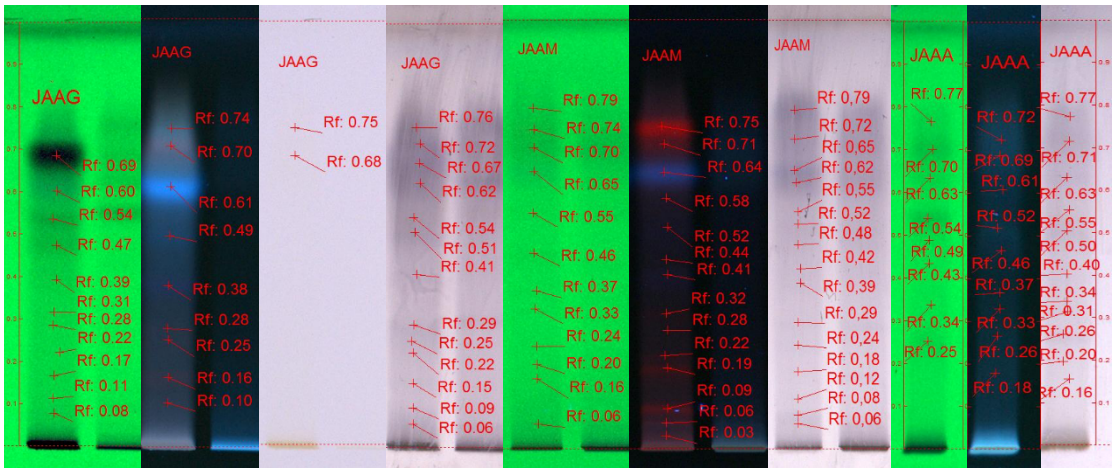


Figura 15. Placa cromatográfica do agrupamento em acetato de etila com rfs das substâncias da espécie *Metania reticulata*.

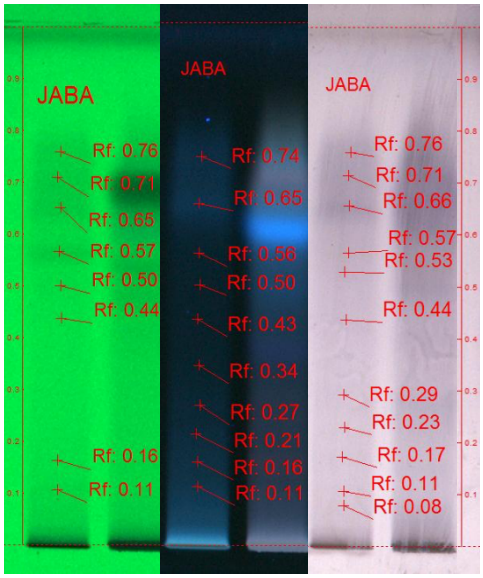


Figura 16. Placa cromatográfica do agrupamento em acetato de etila com Rfs das substâncias da espécie *Metania fitikaui*.

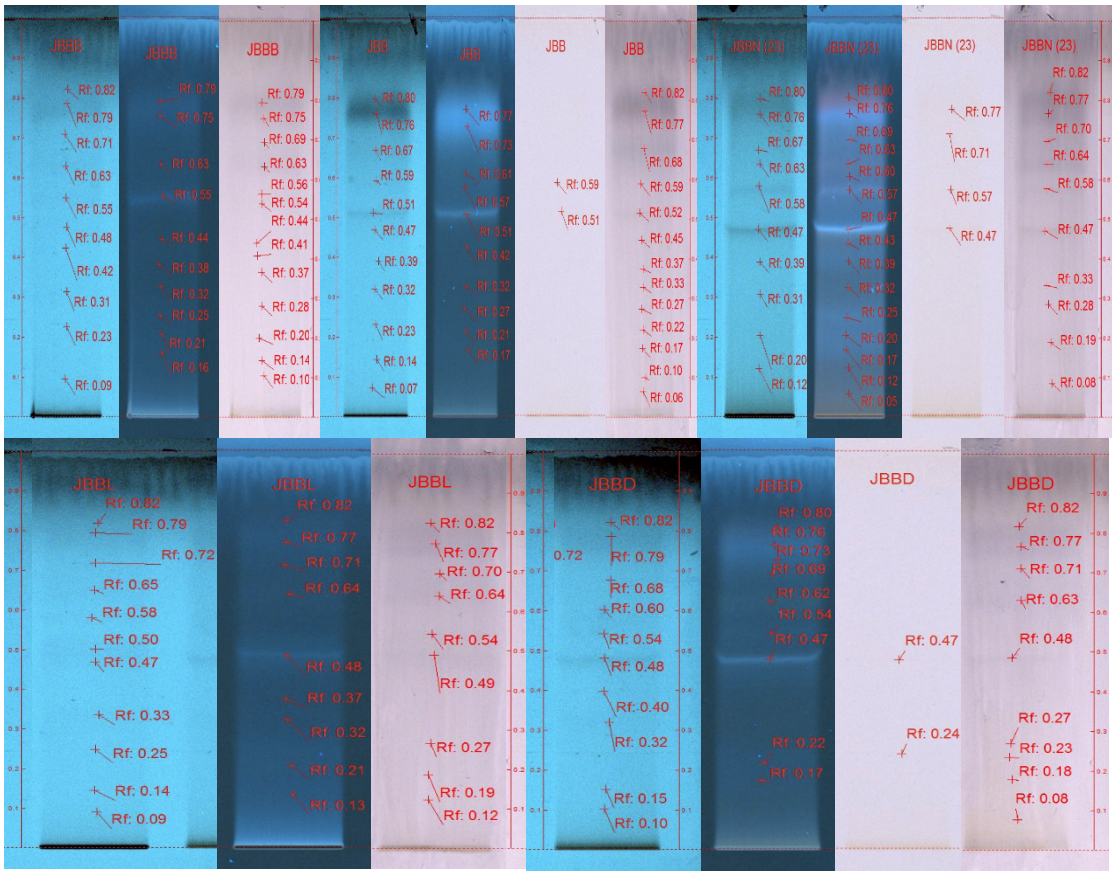


Figura 17. Placa cromatográfica do agrupamento em metanol com rfs das substâncias da espécie *Drulia uruguayensis.*

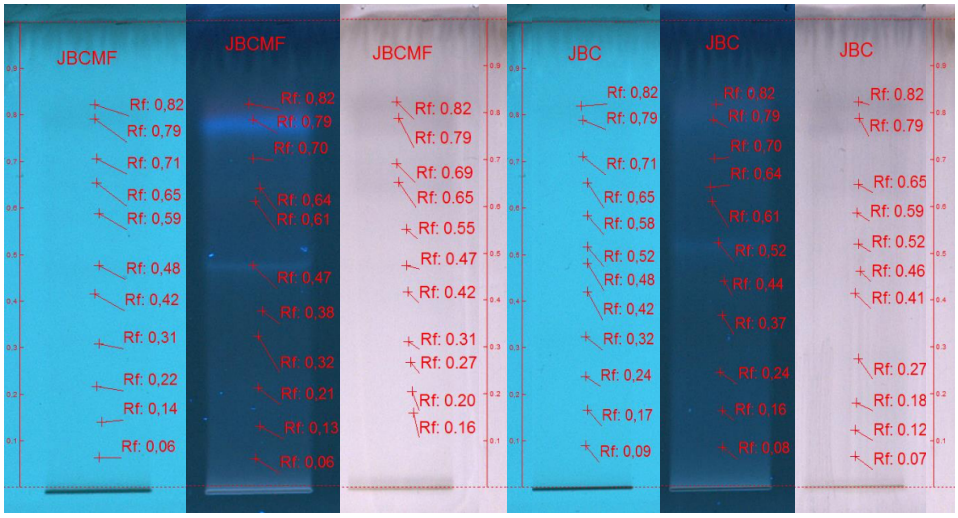


Figura 18. Placa cromatográfica do agrupamento em metanol com rfs das substâncias da espécie *Drulia browni.*



Figura 19. Placa cromatográfica do agrupamento em metanol com rfs das substâncias da espécie *Drulia cristata.*

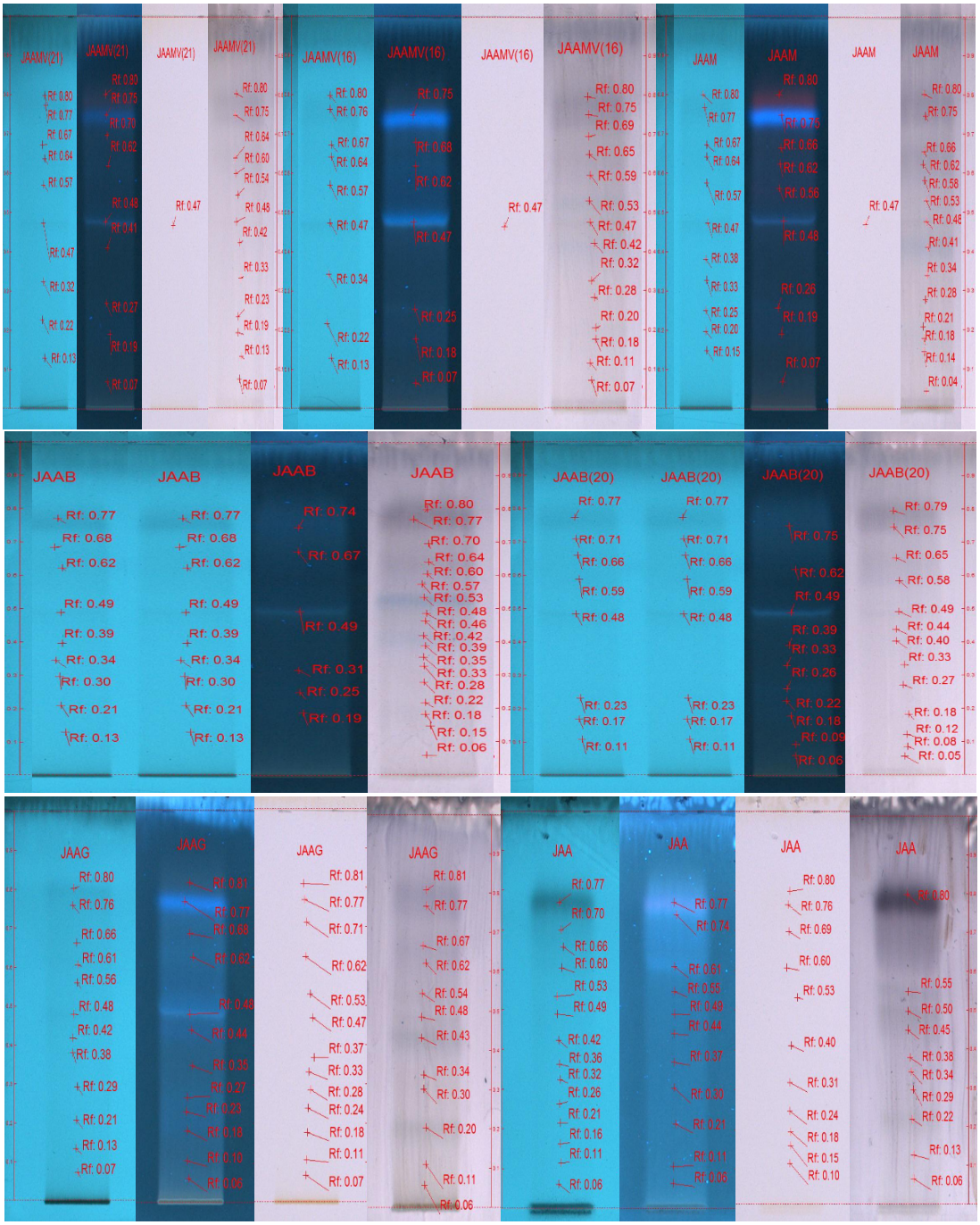


Figura 20. Placa cromatográfica do agrupamento em metanol com rfs das substâncias da espécie *Metania reticulata.*

A caracterização química das espécies avaliadas envolveu a determinação de diversos parâmetros para identificar as substâncias encontradas. Entre as técnicas utilizadas, a ccd apresentou a separação de diferentes compostos, em condições de análise distintas, tais como, eluentes para separação, tipos de reveladores, tipos de sílicas (fase

normal e fase reversa). Por envolver o uso de diferentes condições de análise, cada amostra foi caracterizada por diversos valores, no caso a grande quantidade de rfs apresentado.

Pela complexidade dos dados, os métodos de análise mais recomendados para explorar e extrair informações dessas matrizes de dados são os métodos de análise multivariada. Os mais conhecidos, e utilizados neste estudo, foram as análises de agrupamento por método hierárquico (HCA) e de componentes principais (PCA), com intuito de encontrar semelhanças e agrupamentos naturais entre as amostras.

A partir das análises de HCA e PCA, foi realizada a análise de HCA e PCA dos extratos em acetato de etila e metanol tendo como variáveis os R*f*s discriminados nas revelações em UV 254 nm, 366 nm, visível e revelador químico vanilina sulfúrica.

A análise hierárquica foi realizada a partir da distância Euclidiana por meio do método de Ward, para interpretação do HCA foi utilizada a menor distância (abaixo de 4 da distância Euclidiana) entre os grupos como critério de avaliação para agrupar as amostras.

No dendrograma da figura 21, pode-se verificar a ocorrência de 5 clusteres contendo amostras de esponjas de diferentes espécies e gêneros. Os clusteres foram divididos em grupos para melhor observação e compreensão. O Grupo A, composto pelas espécies *Drulia uruguayensis* (JBBD) e *Drulia browni* (JBC), apresenta-se como um grupo homogêneo para o gênero *Drulia* cuja similaridade ocorre principalmente no que diz respeito o perfil químico de média à baixa polaridade neste sistema cromatográfico, com R_f superior a 0,40, conforme pode ser observado nas Figuras 11 e 12.

O Grupo B apresentou constituição heterogênea, com gêneros e espécies distintas, sendo observada as amostras de *Drulia uruguayensis* (JBBN), *Metania reticulata* (JAAA e JAAM) e *Trochospongilla paulula* (JDAP). Dentro deste grupo ainda é possível

observar que as amostras de *Drulia uruguayensis* (JBBN), *Metania reticulata* (JAAA) apresentam maior similaridade entre si, assim como as amostras de *Metania reticulata* (JAAM) e *Trochospongilla paulula* (JDAP). A ocorrência de grupos heterogêneos neste tipo de análise é esperado visto que a análise por cromatografia em camada delgada discrimina apenas uma pequena porção da constituição total dos extratos de cada espécie estudada, o que aumenta a probabilidade de as substâncias detectadas serem comuns as diferentes espécies avaliadas. De forma similar, o Grupo C também apresentou composição heterogênea, sendo constituído por amostras de *Drulia uruguayensis* (JBBL) e *Metania fitikaui* (JABA), que são de gêneros e espécies diferentes.

No Grupo D, as amostras *Drulia uruguayensis* (JBBB) e *Drulia cristata* (JBAA) foram mais semelhantes entre si devido à pouca distância entre elas, já a amostra de *Metania reticulata* (JAAG) tornou-se distinta por apresentar uma distância maior em relação as outras amostras deste cluster, é importante ressaltar que as duas amostras mais semelhantes são do mesmo gênero, explicando assim sua proximidade.

O Grupo E, composto pela semelhança das amostras de *Drulia uruguayensis* (JBB) e *Drulia browni* (JBCMF), apresentou amostras do mesmo gênero, porém não possuem a mesma espécie. O posicionamento das amostras de *Drulia uruguayensis* em três clusteres distintos pode ser um indicativo de mudanças no perfil químico em relação a fatores exógenos aos espécimes coletados tais como período e local de coleta.

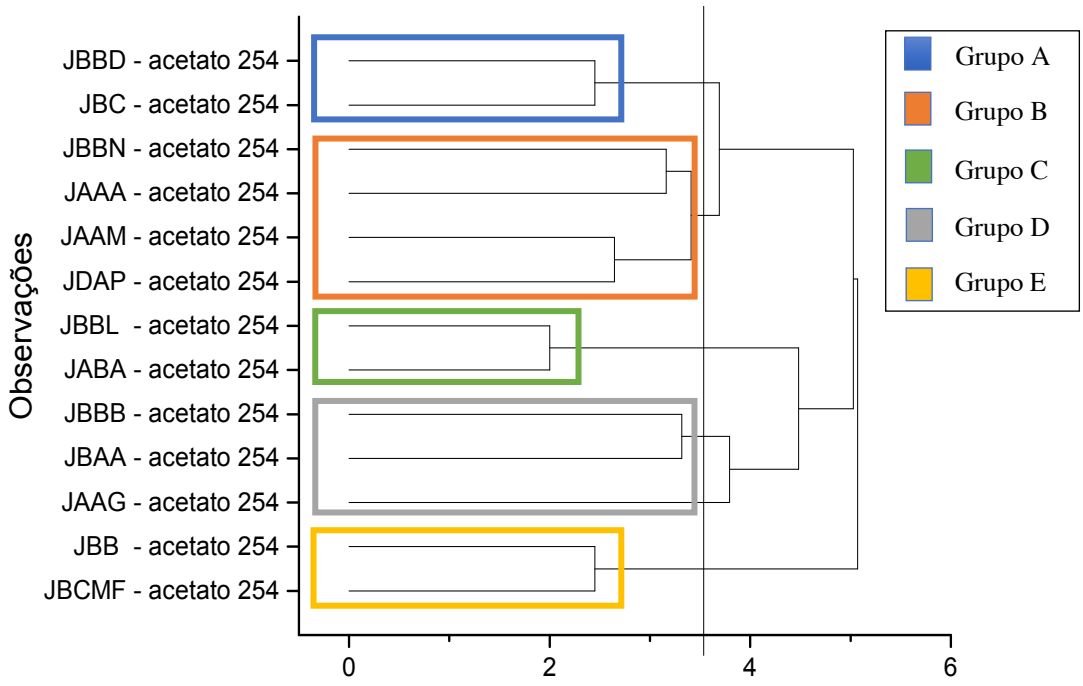


Figura 21. Dendrograma de similaridade das espécies de esponjas em extrato em acetato de etila no revelador em ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm por meio da análise estatística de HCA.

Na análise de PCA são gerados gráficos conhecidos como *plots* que precisam ser analisados em conjunto para melhor compreensão dos dados, o *score plot* e *loading plot*. O *score plot* exibe as coordenadas das amostras em uma nova organização de eixos/variáveis formado pelas componentes principais. Já o *loading plot* indica o quanto cada variável contribuiu na criação de cada componente principal.

Na figura 22, pode-se observar o gráfico *biplot* contendo o *score plot* (com símbolos) e *loading plot* (com linhas e números). A partir da análise do gráfico, pode ser observada a formação de agrupamentos de amostras similares aos observados na análise de HCA, corroborando a mesma. Os grupos observados na Figura 22 foram separados com base na similaridade das amostras quando comparadas entre si em relação a 4 intervalos distintos de Rf que compõem as componentes principais extraídas. Pela análise do *loading plot* pode ser observado que a componente principal 1 (representando 21,50% dos dados) ocasiona a separação dos grupos, horizontalmente no gráfico, baseado

principalmente nos intervalos de Rf compreendidos entre 0,37 a 0,54 e 0,76 a 0,85, enquanto que a componente principal 2 (representando 16,35% dos dados) separou os grupos verticalmente no gráfico baseado principalmente nos intervalos de Rf de 0,13 a 0,25 e 0,58 a 0,66.

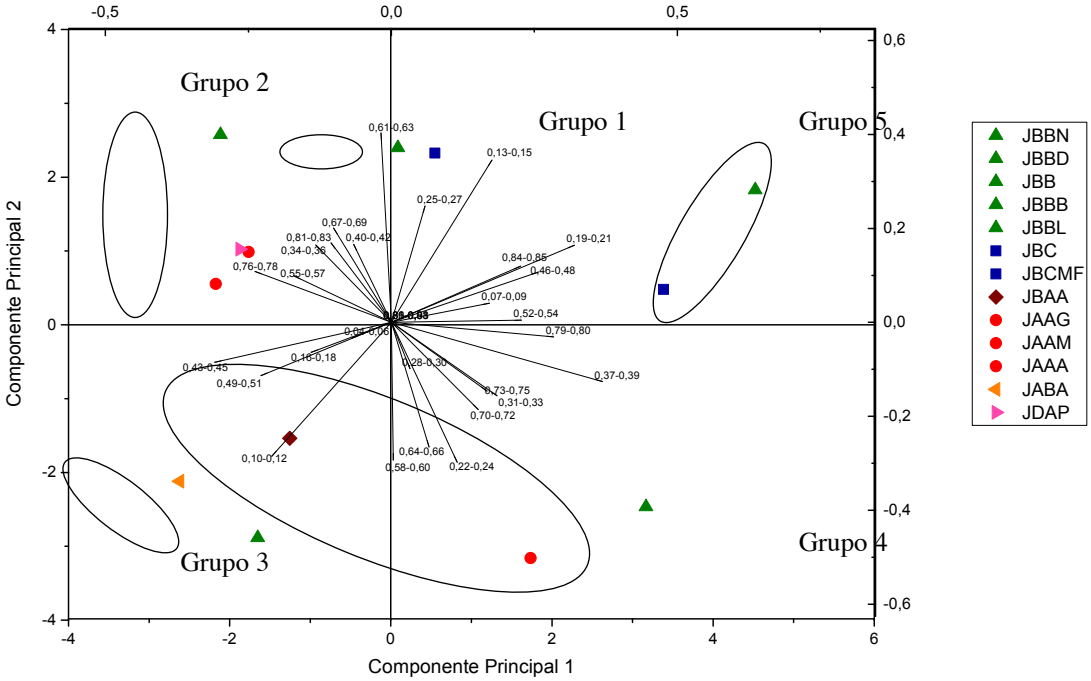


Figura 22. Representação gráfica dos componentes principais das espécies de esponjas em extrato em acetato de etila no revelador em ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm.

A análise de HCA para os extratos em acetato de etila reveladas em UV 366 nm pode ser observado na Figura 23, onde também ocorreu a formação de 5 clusters distintos. O Grupo A, constituído apenas por espécies do gênero *Drulia*, apresentou duas amostras de *Drulia uruguayensis* (JBBD e JBBB), as quais apresentaram maior similaridade entre si, e uma amostra de *Drulia browni* (JBC), confirmando o agrupamento observado no Grupo A da Figura 21, onde as amostras JBBD e JBC apresentavam-se juntas. O Grupo B é composto apenas por uma amostra de *Drulia uruguayensis*, apresentando, a uma distância euclidiana de 4 no dendograma gerado, similaridade com o Grupo A, ainda corroborando um agrupamento de espécies do gênero *Drulia.*

O Grupo C, foi formado também apenas por amostras do gênero *Drulia*, contendo as espécies *Drulia uruguayensis* (JBBL e JBBN) e *Drulia browni* (JBCMF), estando as amostras JBBL e JBCMF mais próximas e consequentemente mais semelhantes do que a amostra JBBN, porém todas foram agrupadas no mesmo cluster por possuírem alguma semelhança no comprimento de onda de 366 nm.

O Grupo D revelou ser o único grupo heterogêneo dentre os formados nesta análise, possuindo amostras das espécies *Drulia cristata* (JBAA), *Metania reticulata* (JAAM), *Trochospongilla paulula* (JDAP) e *Metania fitikaui* (JABA). Dentro deste cluster, as amostras JBAA e JAAM foram mais próximas entre si, assim como a JDAP e JABA. Apesar da distância entre as espécies de *Metania* dentro deste grupo, vale ressaltar que o mesmo apresenta similaridade com o Grupo E, em uma distância Euclidiana de 4 no dendograma, com o Grupo E o qual é constituído apenas por amostras de *Metania*, as espécies *Metania reticulata* (JAAG e JAAA).

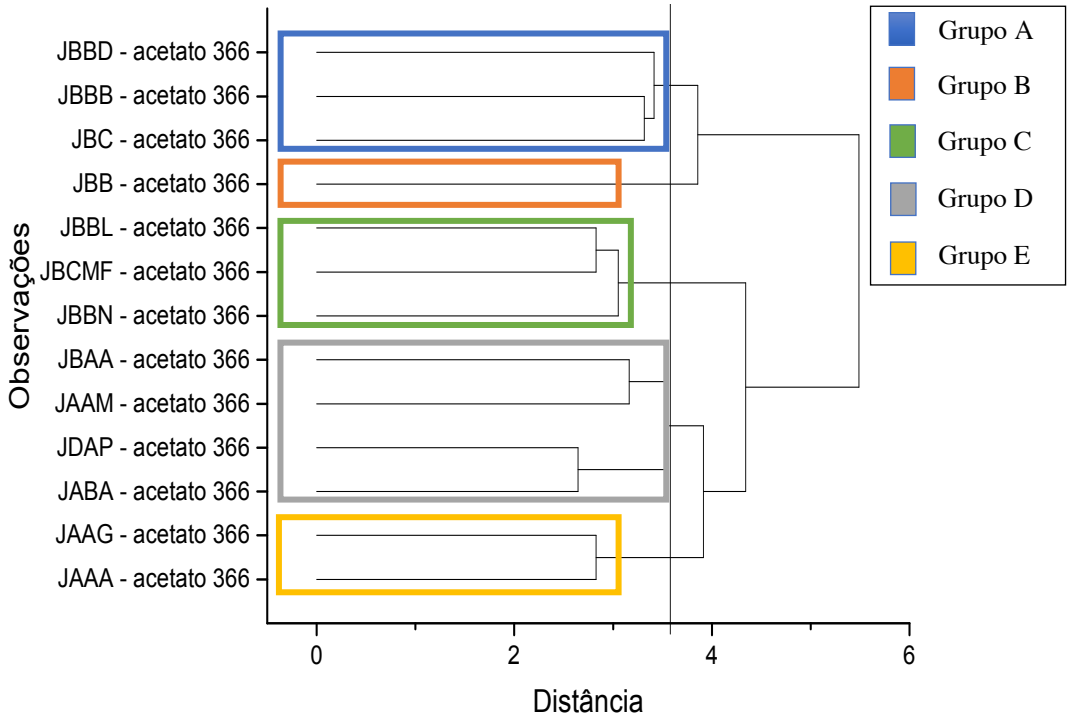


Figura 23. Dendrograma de similaridade das espécies de esponjas em extrato em acetato de etila no revelador em ultravioleta no comprimento de onda de 366 nm por meio da análise estatística de HCA.

No gráfico de PCA (Figura 24), o Grupo 1 é representado pelas espécies de *Drulia uruguayensis* (JBBB e JBBL) e *Trochospongilla paulula* (JDAP). Já o Grupo 2 é composto pelas amostras das espécies de *Drulia cristata* (JBAA), *Drulia browni* (JBCMF) e *Metania fitikaui* (JABA). O Grupo 3 foi agrupado pelas espécies de *Drulia uruguayensis* (JBBN) e *Metania reticulata* (JAAM, JAAG, JAAA). O Grupo 4 possui apenas um representante da espécie *Drulia browni* e o Grupo 5 é descrito por duas amostras de *Drulia uruguayensis*. Nesta análise de PCA a representatividade dos dados na Figura 24 foi ligeiramente menor que a observada na Figura 22, com a componente principal 1 representando 21,40% dos dados enquanto a componente principal 2 representou 15,90% dos dados. Ressaltando que, quanto menor esta representatividade dos dados, menor será a resolução da análise para distinguir os agrupamentos, e por isso a análise de PCA não ratificou a análise de HCA. A separação dos grupos horizontalmente ao longo do gráfico, em função da componente principal 1 ocorreu principalmente em função do perfil químico das amostras nos Rf de 0,01 a 0,30, enquanto a componente principal 2 separou os grupos verticalmente no gráfico principalmente por sua composição nos Rf de 0,34 a 0,45.

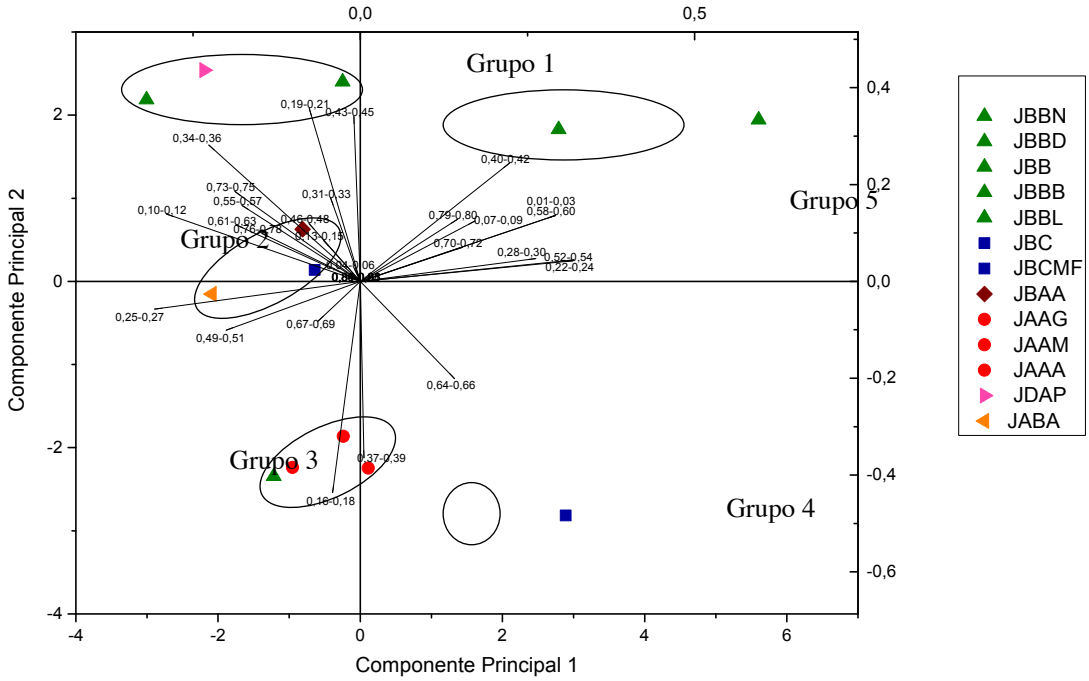


Figura 24. Representação gráfica dos componentes principais das espécies de esponjas em extrato em acetato de etila no revelador em ultravioleta no comprimento de onda de 366 nm.

A Figura 25 relata a análise de HCA das amostras em UV visível, o Grupo A, foi o grupo que obteve o maior agrupamento de amostras por semelhança, com as espécies *Drulia uruguayensis* (JBBD), *Drulia browni* (JBC), *Drulia cristata* (JBAA), *Trochospongilla paulula* (JDAP), *Metania fitikaui* (JABA) e *Metania reticulata* (JAAM e JAAA).

O Grupo B, apresentou um cluster com espécies de *Drulia uruguayensis* (JBBL e JBBB), *Drulia browni* (JBCMF) e *Metania reticulata* (JAAG), sendo as amostras JBBL e JAAG mais próximas, assim como as amostras JBBB e JBCMF que são do mesmo gênero, no entanto, as amostras JBBL e JBBB que são da mesma espécie apresentaram uma leve distância entre elas dentro do cluster. No Grupo C, foi observada apenas duas amostras de *Drulia uruguayensis* (JBB e JBBN) que foram agrupadas.

A separação destes clusters apresenta um padrão distinto dos anteriores, associado ao que se pode ser observado nas Figuras 1 a 6, onde poucas amostras apresentam

manchas definidas quando reveladas apenas com a luz visível.

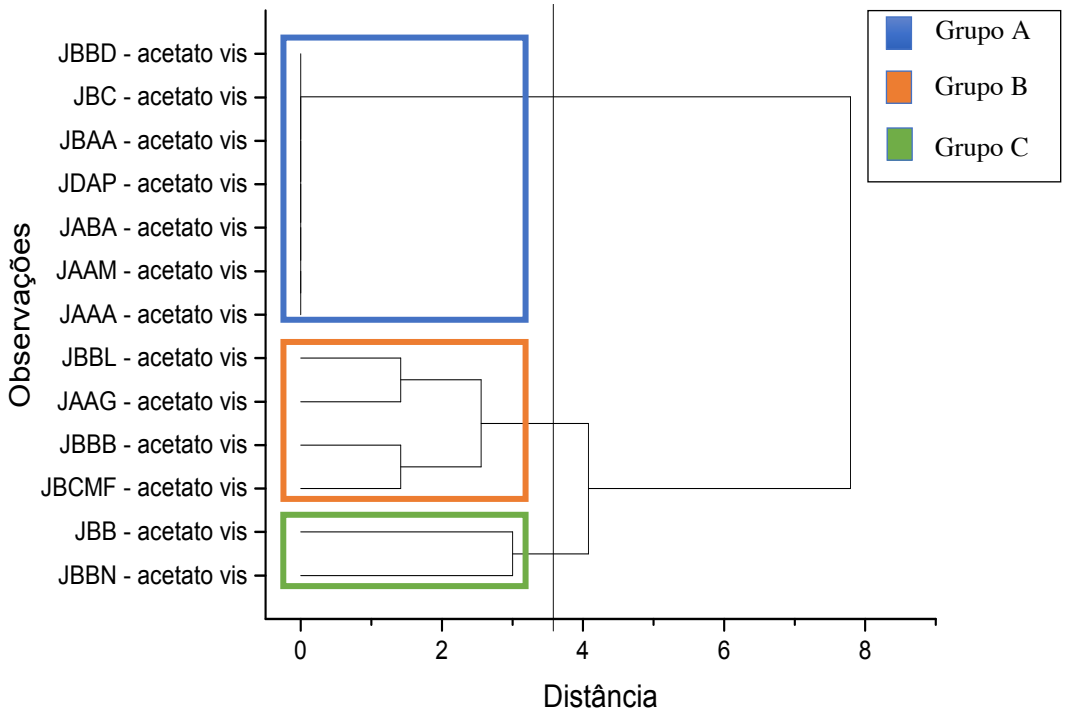


Figura 25. Dendrograma de similaridade das espécies de esponjas em extrato em acetato de etila no revelador em ultravioleta no comprimento de onda do visível por meio da análise estatística de HCA.

No gráfico representado pela Figura 26, os Grupos 1 (JBB) e 4 (JBBN), foram observados apenas uma amostra em cada da espécie de *Drulia uruguayensis*. O Grupo 2 apresentou amostras de um mesmo gênero (*Drulia*), entretanto espécies diferentes, *Drulia uruguayensis* (JBBB) e *Drulia cristata* (JBCMF). O Grupo 3 foi o maior grupo, constituído por amostras heterogêneas das espécies de *Drulia uruguayensis* (JBBL, JBBD), *Drulia browni* (JBC), *Drulia cristata* (JBAA), *Trochospongilla paulula* (JDAP), *Metania reticulata* (JAAM, JAAA) e *Metania fitikaui* (JABA). Assim como ocorreu no PCA do UV em 366 nm, esta PCA não confirmou a análise de HCA, entretanto pode se observar que as amostras de *Drulia* apresentam-se majoritariamente separada das demais em função da componente principal 1, estando posicionadas mais a direita do gráfico (porção positiva do eixo X), o que corrobora os agrupamentos homogêneos de *Drulia* citados nas análises de HCA anteriores com o UV em 254 e 366 nm.

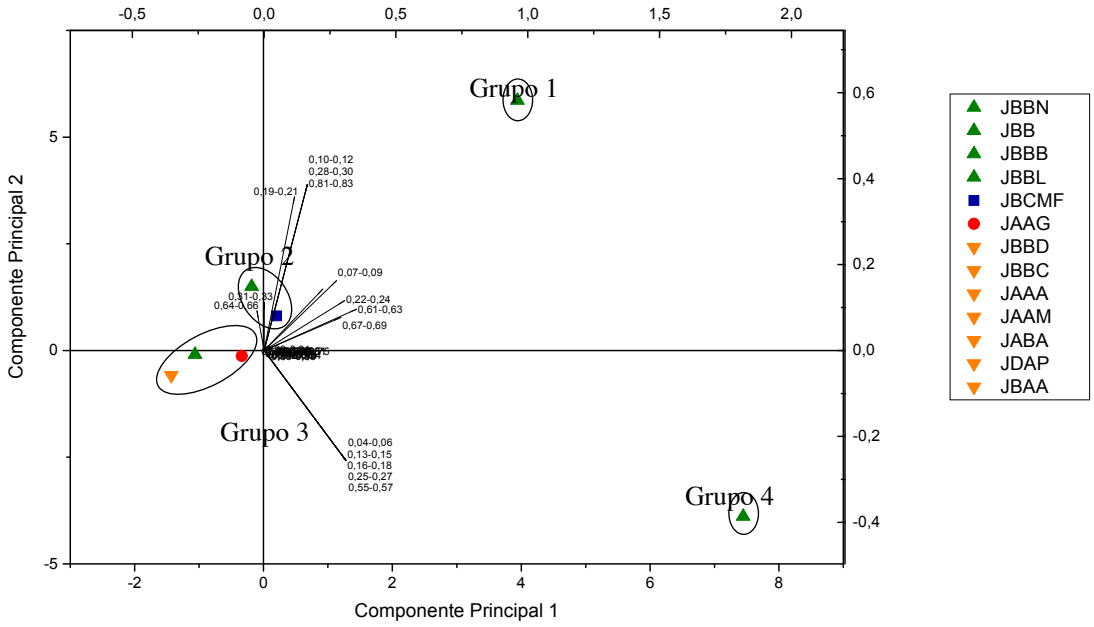


Figura 26. Representação gráfica dos componentes principais das espécies de esponjas em extrato em acetato de etila no revelador em ultravioleta no comprimento do visível.

O dendrograma do revelador químico vanilina (Figura 27), mostrou cinco grupos de clusters. O Grupo A4 foi agrupado por duas amostras do gênero *Drulia*, contudo as amostras são de espécies distintas, sendo uma *Drulia uruguayensis* (JBBD) e a outra *Drulia browni* (JBCMF). O Grupo B formou um cluster com amostras diversas, constituído por *Drulia uruguayensis* (JBBL e JBBN) e *Metania fitikaui* (JABA) e *Trochospongilla paulula* (JDAP), referindo-se a semelhança, as amostras JBBL e JABA que estão mais próximas tornam-se mais semelhantes em relação as amostras JDAP e JBBN que estão mais distantes. Assim como o Grupo A o Grupo C foi constituído por amostras do gênero *Drulia* e espécies diferentes, contendo espécime de *Drulia uruguayensis* (JBBB) e *Drulia cristata* (JBAA). O Grupo D foi formado por representantes das espécies *Drulia uruguayensis* (JBB) e *Metania reticulata* (JAAG e JAAM), sendo estas, mais próximas e semelhantes do que a amostra JBB. O último cluster formado, o Grupo E, foi composto por amostras de *Drulia browni* (JBC) e *Metania*

reticulata (JAAA), que foram agrupadas devido a sua proximidade, tornando-as semelhantes.

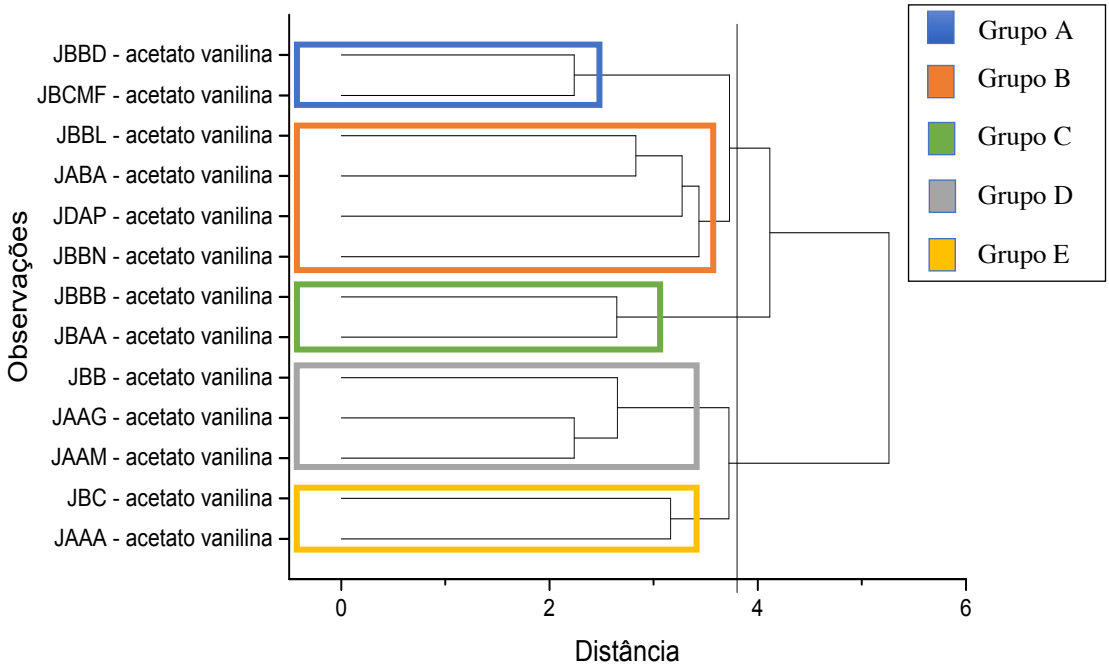


Figura 27. Dendrograma de similaridade das espécies de esponjas em extrato em acetato de etila no revelador químico vanilina por meio da análise estatística de HCA.

O PCA das amostras reveladas em vanilina (Figura 28), demostrou o agrupamento de cinco grupos distintos. O conjunto de amostras reunidas em cada grupo, não é equivalente ao agrupamento das amostras em cada grupo no HCA ou similar aos observados nas análises anteriores.

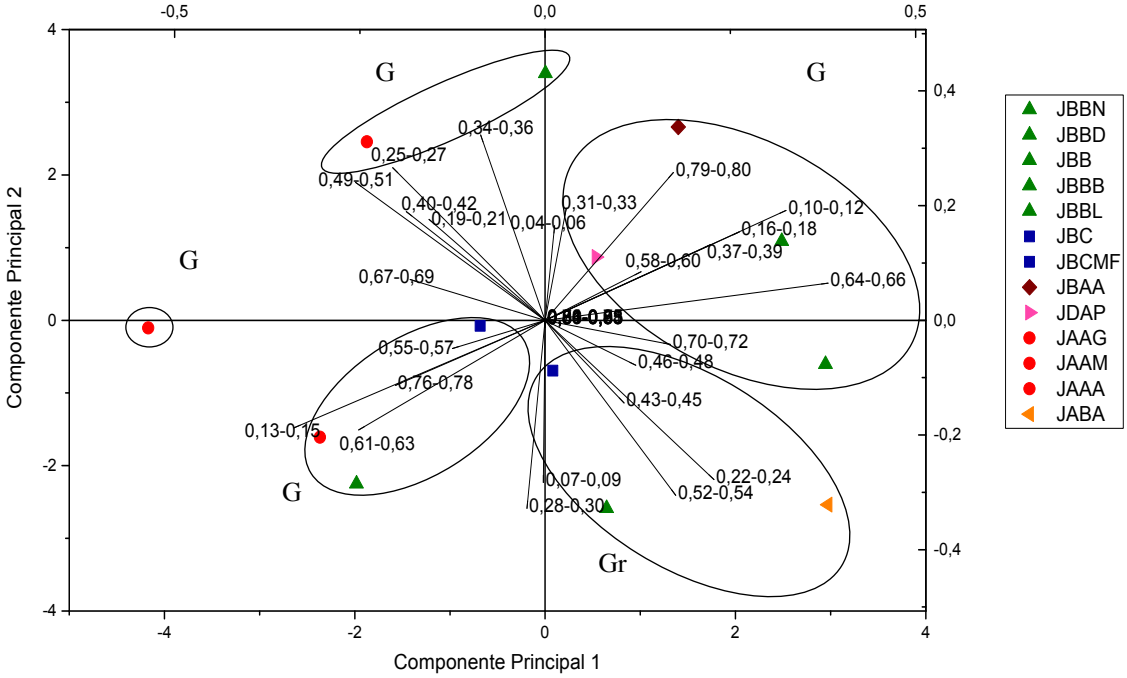


Figura 28. Representação gráfica dos componentes principais das espécies de esponjas em extrato em acetato de etila no revelador químico vanilina sulfúrica.

A Figura 29 demonstra o dendrograma com uma formação de seis cluters a partir amostras em extrato metanólico que apresentaram rfs com revelação em UV 254 nm. O Grupo A de mostrou três amostras do gênero *Drulia* e das espécies *Drulia uruguayensis* (JBBB) e *Drulia browni* (JBCMF e JBC), estas duas últimas são mais próximas, assim, são mais semelhantes em relação a amostra JBBB. O Grupo B também apresentou amostras do gênero *Drulia*, no entanto, suas espécies foram de *Drulia uruguayensis* (JBBL) e *Drulia cristata* (JBAB(10) e JBA), neste cluster as amostras que tiveram mais semelhanças foram JBBL e JBAB(10), o mais interessante foi, que as amostras JBAB(10) e JBA que são da mesma espécie estão mais distantes, sendo assim, menos semelhantes entre si. A mesma situação ocorreu no Grupo C, em que foi observado as amostras de *Drulia cristata* (JBAA) e *Metania reticulata* (JAAB(20) e JAA), sendo semelhantes JBAA e JAAB(20). No cluster do Grupo D, exibiu somente amostras de *Drulia uruguayensis* (JBB, JBBN(23) e JBBD), sendo JBB e JBBN(23) mais próximas entre si.

Assim como o Grupo D, os Grupos E e F também geraram amostras da mesma espécie (*Metania reticulata*), para o Grupo E as amostras foram JAAB e JAAG e para o Grupo F, JAAMV(21), JAAMV(16) e JAAM, sendo que, neste cluster as amostras JAAMV(21) e JAAMV(16) foram as mais próximas e semelhantes entre si.

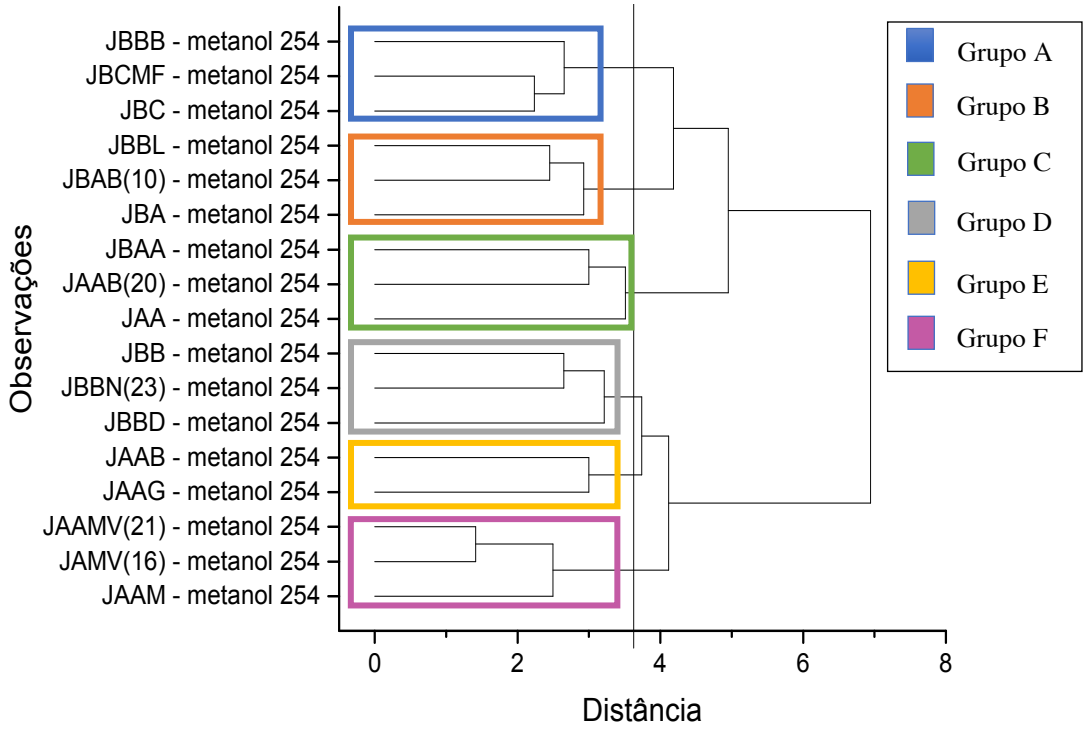


Figura 29. Dendrograma de similaridade das espécies de esponjas em extrato em metanol no revelador em ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm por meio da análise estatística de HCA.

Os seis grupos formados a partir do agrupamento das amostras reveladas em UV 254 nm (Figura 30), mostraram-se diferenciados entre si, assim como as amostras reunidas em cada grupo. O Grupo 1 e 6, são compostos por somente uma amostra, indicando que nenhuma delas é semelhante às outras amostras. O Grupo 3, foi constituído por amostras de uma única espécie. Já os demais grupos (Grupos 2, 4 e 5), apresentaram amostras de espécies diferentes. O PCA apresenta pouca similaridade com o HCA, sendo possível observar a separação dos Grupos A, B e C se apresentam a direita do gráfico e os Grupos D, E e F a esquerda do gráfico, posicionamento este relacionado a componente principal 1, a qual representa 19,74% dos dados, sendo composta majoritariamente pelos

intervalos de Rf de 0,16-0,18; 0,37-0,39; 0,55 – 0,63; 0,67 – 0,72; 0,76 – 0,78; e 0,81 – 0,83. Com isso, a separação dos grupos pode ser associada principalmente, porém não exclusivamente, a diferente composição que cada amostra tem considerando os intervalos de Rf supracitados.

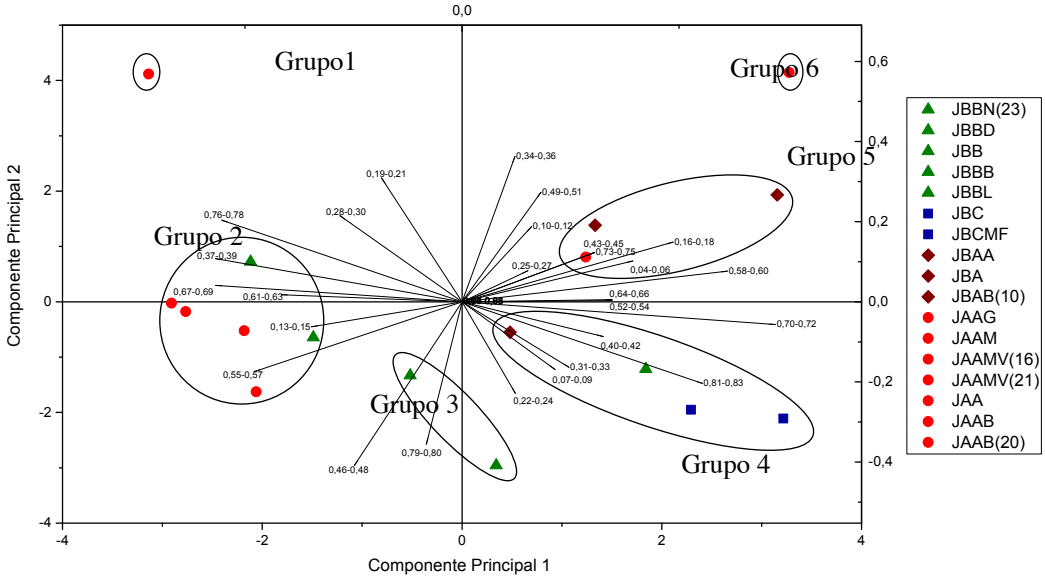


Figura 30. Representação gráfica dos componentes principais das espécies de esponjas em extrato em metanol no revelador em ultravioleta no comprimento de onda de 254 nm.

As amostras do extrato metanólico reveladas em UV 366, exibiu um dendrograma com seis cluters distintos (Figura 31). O primeiro cluster (Grupo A), retratou o agrupamento de duas amostras de *Metania reticulata* (JAAMV(21) e JAAM). O Grupo B expôs amostras de gêneros e espécies diferentes, as amostras JAAB (*Metania reticulata*) e JBB *(Drulia uruguayensis*) mesmo sendo de espécies diferentes, foram mais próximas, tornando-as mais semelhantes em comparação a amostra JAAB(20) (*Metania reticula*). O Grupo C também demostrou amostras de *Metania reticulata* (JAA) e *Drulia uruguayensis* (JBBB e JBBN(23)), no entanto, as amostras JBBB e JBBN(23) que foram mais próximas e mais semelhantes são da mesma espécie, um fato oposto ao ocorrido no Grupo B. O agrupamento das amostras semelhantes no Grupo D foi composto pelas

espécies *Drulia uruguayensis* (JBBL) e *Drulia browni* (JBCMF), estando as amostras inseridas no mesmo gênero. O Grupo E, foi o maior grupo exposto no dendrograma, com amostras heterogêneas. Foram agrupadas neste cluster amostras de *Metania reticulata* (JAAMV(16)), *Drulia uruguayensis* (JBBD), *Drulia cristata* (JBA, JBAB(10) e JBAA), as amostras JBBD e JBA foram mais similares entre si, assim como, as amostras JBAB(10) e JBAA. A amostras JAAMV(16) que também está inserida no Grupo E, foi menos similar que as demais por estar mais distante dentro do cluster em relação a distância euclidiana. A amostra JBC da espécie *Drulia browni* pertencente ao Grupo F, foi a única destro deste cluster, assim como, a amostra JAAG de *Metania reticulata*, que também foi a única do Grupo G, isso deve ter ocorrido, devido as amostras serem mais distante de todas as demais amostras, tornando-a as únicas dessemelhante.

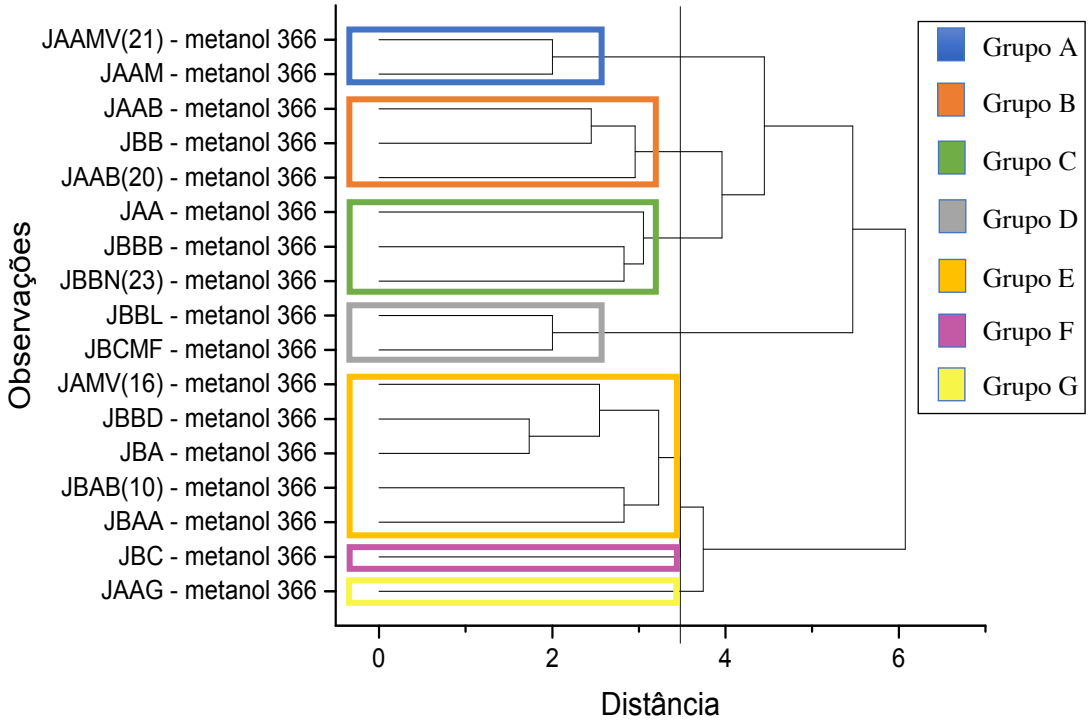


Figura 31. Dendrograma de similaridade das espécies de esponjas em extrato em metanol no revelador em ultravioleta no comprimento de onda de 366 nm por meio da análise estatística de HCA.

Neste PCA (Figura 32), a composição dos Grupos 1, 2, 3 e 6 foi bem heterogênea, já os Grupos 4 e 5, A formação dos grupos foi pela presença de amostras de uma única

espécie. Os grupos formados, com exceção do Grupo 1, corroboram os agrupamentos da análise de HCA, onde o Grupo A6 corresponde ao Grupo 5; o Grupo D corresponde ao Grupo 6; O grupo G6 corresponde ao Grupo 4; e os Grupos 2 e 3 contem em conjunto o Grupo E. O *loading plot* indica ainda que a maior parte da separação dos grupos ocorre verticalmente no gráfico, em função da componente principal 2 (eixo Y) a qual possui uma representatividade de dados de 16,55%, similar ao observado para a componente principal 1 (17,29%). A componente principal 2 separou os grupos baseado principalmente em 4 intervalos distintos de Rf: 0,07 – 0,09; 0,19-0,24; 0,28 – 0,33; 0,52 – 0,57. Podendo se assumir que estar regiões contem as substâncias que ocasionam os agrupamentos observados.

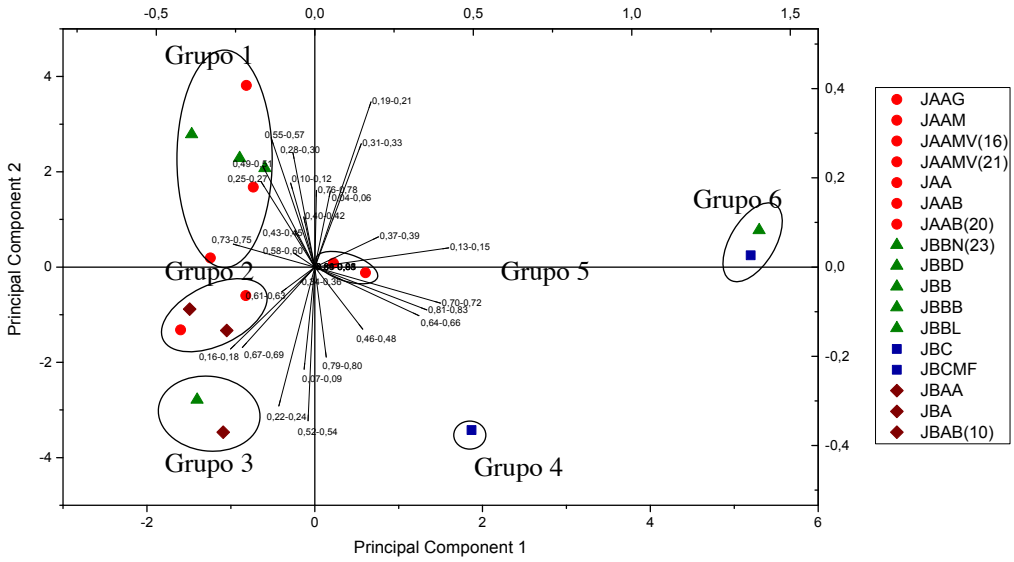


Figura 32. Representação gráfica dos componentes principais das espécies de esponjas em extrato em metanol no revelador em ultravioleta no comprimento de onda de 366 nm.

A Figura 33 mostra o dendrograma das amostras em UV visível. No Grupo A é possível visualizar amostras de *Drulia uruguayensis* (JBBB, JBBL e JBB) e *Drulia browni* (JBCMF e JBC), todas pertencentes ao mesmo gênero. As amostras JBBB, JBBL, JBCMF e JBC são mais próximas, com isso, tornam-se mais parecidas entre si, já a JBB está mais distante das demais amostras, dessa forma é a menos semelhante. O Grupo B é

formado apenas por amostras da espécie *Drulia cristata* (JBA, JBAB(10) e JBAA), na qual as amostras JBA e JBAB(10) estão mais próximas dentro do cluster, por isso são mais parecidas em relação a amostra JBAA. O Grupo C é o maior cluster do dendrograma, com amostras de *Drulia uruguayensis* (JBBN(23) e JBBD) e *Metania reticulata* (JAAMV(16), JAAM, JAAB, JAAB(20). A amostra JBBN(23) é menos similar que as demais devido a sua distância, quando comparada as amostras JBBD, JAAMV(16), JAAM, JAAB, JAAB(20), que são mais análogas entre si. O Grupo D, apresentado no gráfico, possui apenas uma amostra de *Metania reticulata* (JAAG), o mesmo caso ocorre com o Grupo E, sendo a amostra JAA de *Metania reticulata*, provavelmente isso aconteceu por essas amostras não serem similares com nenhuma amostra dos outros clusters e por uma variação biogeográfica quando comparada as demais amostras de *Metania reticulata*.

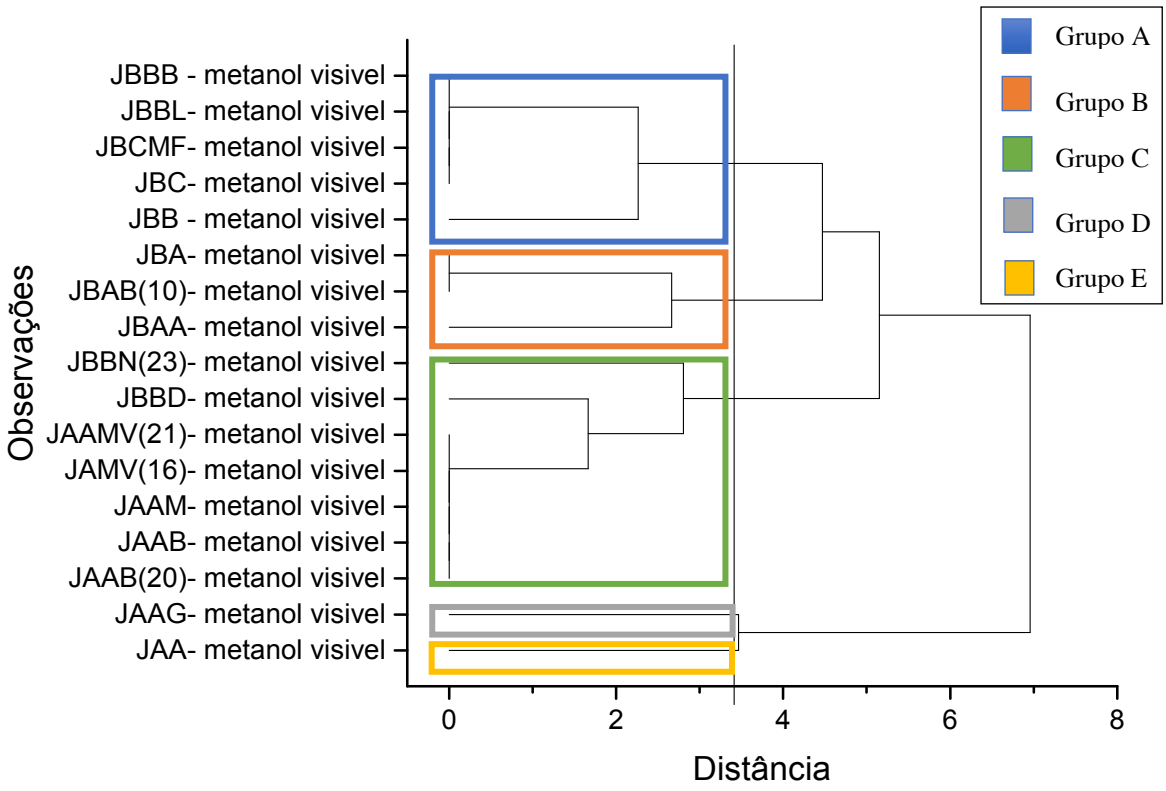


Figura 33. Dendrograma de similaridade das espécies de esponjas em extrato em metanol no revelador em ultravioleta visível por meio da análise estatística de HCA.

A partir da análise do gráfico (Figura 34), as amostras similares entre si foram agrupadas formando um grupo, no entanto, houve uma diferenciação entre os cinco grupos constituídos. Foi possível verificar por meio da distribuição dos grupos, as variáveis (valores de rfs) responsáveis pelas separações das amostras. Notou-se que os Grupos 1, 2, 3, 4 e 5 corroboram com a análise hierárquica, sendo agrupadas as amostras análogas de diferentes espécies em um mesmo grupo.

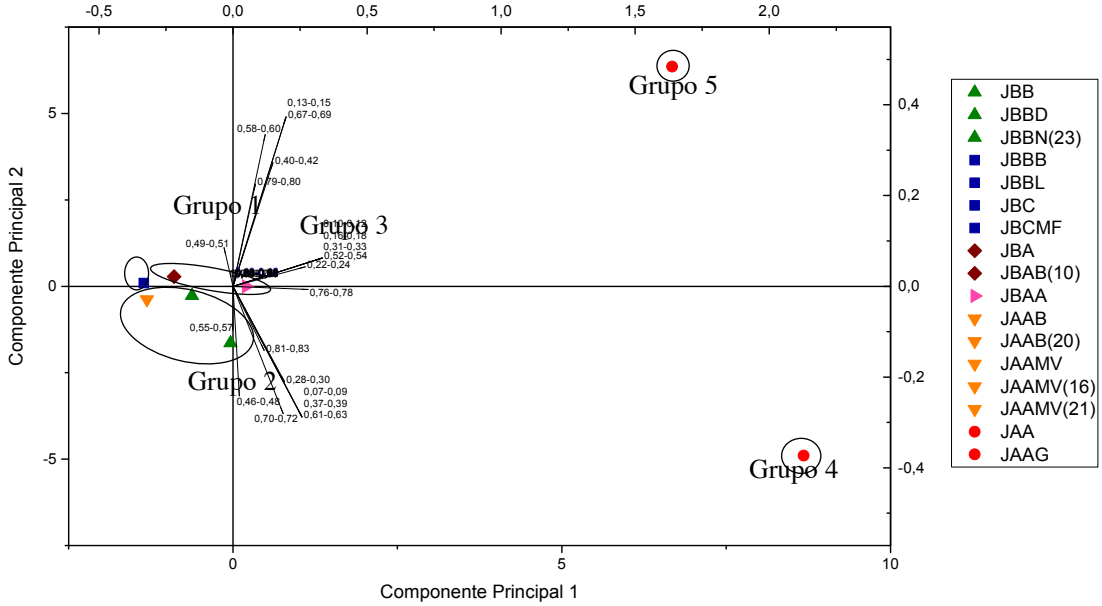


Figura 34. Representação gráfica dos componentes principais das espécies de esponjas em extrato em acetato de etila no revelador em ultravioleta no comprimento do visível.

O dendrograma com a revelação de vanilina sulfúrica (Figura 35), mostrou a formação de seis clusters. O Grupo A apresentou amostras das espécies de *Drulia uruguayensis* (JBB e JBBB) e *Metania reticulata* (JAAG), com as amostras JBB e JAAG, que são de espécies diferentes, mais próximas e mais semelhantes dentro do cluster, sendo a JBBB menos similar que as demais. O grupo B foi formado somente por duas amostras de *Metania reticulata* que estão mais próximas, transformando-as em amostras semelhantes. Assim como no Grupo B, o Grupo C foi constituído apenas por amostras de uma espécie, no caso, a espécie *Drulia uruguayensis* (JBBN(23), JBBD e JBBL), dentro

do cluster as amostras mais similares foram a JBBN(23) e JBBD, devido sua proximidade, sendo a amostra JBBL mais distante e menos similar. O Grupo D, teve como representante amostras das espécies *Drulia browni* (JBCMF) e *Drulia cristata* (JBAA e JBA), sendo amostras de espécie diferente (JBCMF e JBAA) mais próximas e mais parecidas do que a amostra da mesma espécie (JBAA e JBA). No Grupo E, as amostras que predominaram o cluster foram das espécies *Drulia browni* (JBC), *Metania reticulata* (JAAB(20)) e *Drulia cristata*, no grupo as amostras mais similares entre si foram JBC e JAAB(20). O Grupo F, foi composto exclusivamente pela espécie *Metania reticulata* (JAAMV(20), JAAMV(16) e JAAM), com a similaridade mais acentuada das amostras JAAMV(20), JAAMV(16).

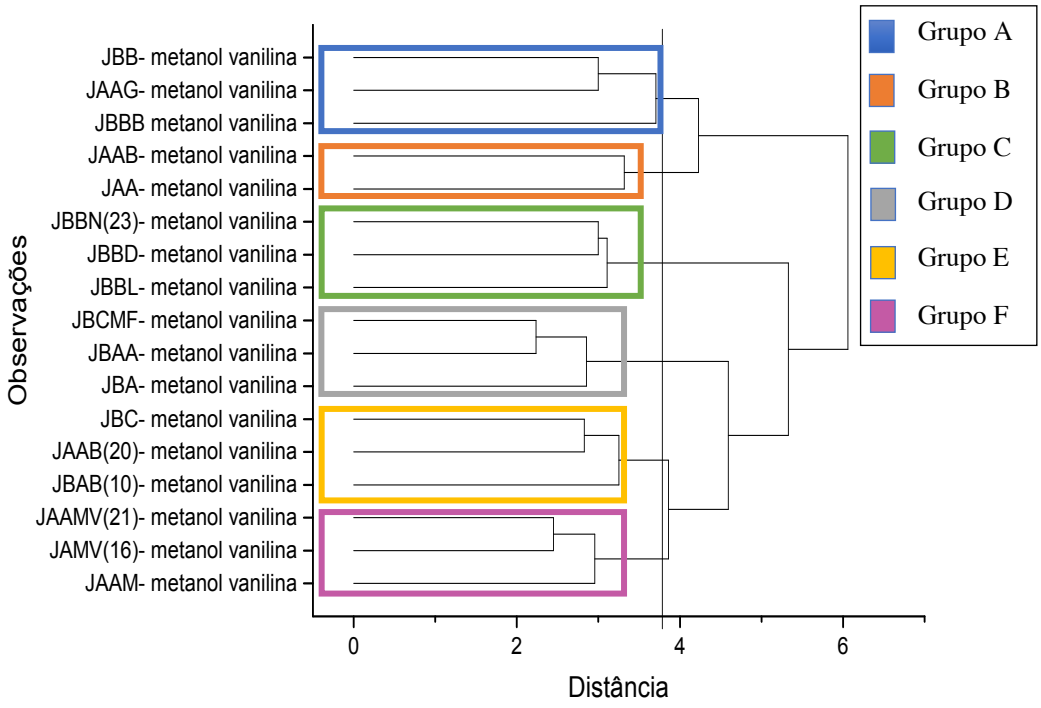


Figura 35. Dendrograma de similaridade das espécies de esponjas em extrato em acetato de etila no revelador químico vanilina por meio da análise estatística de HCA.

O gráfico de PCA da Figura 36, mostrou cinco grupos distintos, O Grupo 1 corroborou com o Grupo F do dendrograma (Figura 35). Já o Grupo 2 apresentou um agrupamento maior de amostras, sendo envolvidas amostras dos Grupos D e E. O

agrupamento das amostras do Grupo 3 foi igual ao do Grupo C. O Grupo 4 confirmou a similaridade entre si das amostras JBB e JAAG no cluster do Grupo A, no entanto a amostra JBBB apresentou um distanciamento do grupo, sendo esta incluída no Grupo 5, juntamente com as amostras JAAB e JAA. Pode-se perceber pequenas alterações nos agrupamentos relacionados ao HCA.

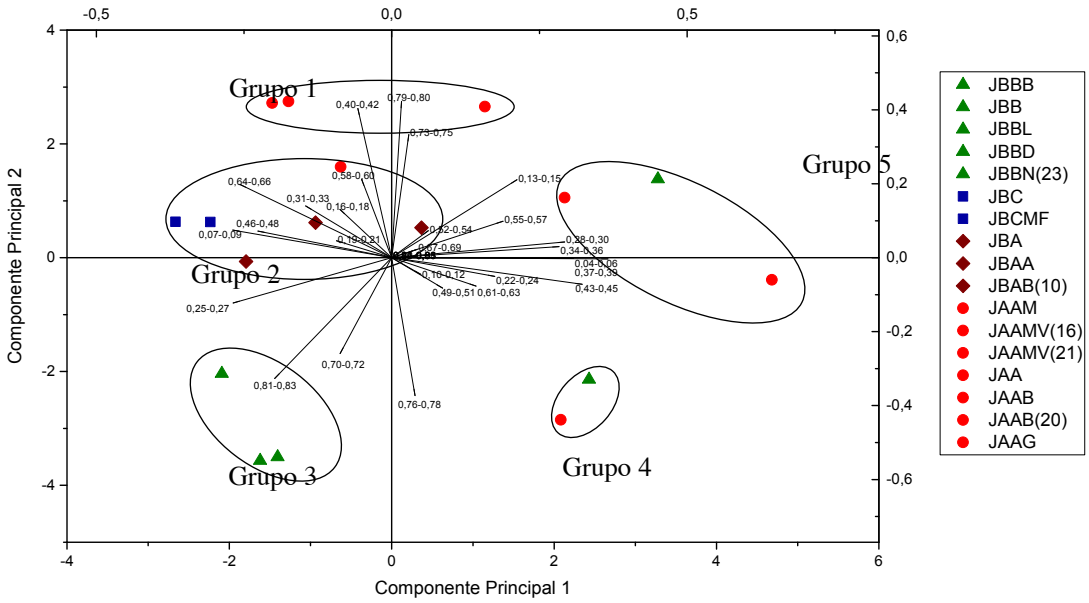


Figura 36. Representação gráfica dos componentes principais das espécies de esponjas em extrato em metanol no revelador químico vanilina sulfúrica.

Nas análises de HCA e PCA de todas as amostras de ambos extratos, observou-se a formação de agrupamentos que diferenciaram, na maioria dos casos, as amostras de *Drulia* das do gênero *Metania*, principalmente ao se comparar os Rf referentes a substâncias de média polaridade dentre aquelas discriminadas durante a análise de CCD.

Nas análises de HCA das amostras referentes ao extrato de acetato de etila, foram notados padrões de agrupamentos que ocorreram com as amostras JBBD e JBC, pertencentes ao gênero *Drulia*, nos Grupos A dos reveladores 254 e 366 nm. As amostras de JBBN (*Drulia*) e JDAP (*Trochospongilla*), nos Grupos B dos reveladores 254 nm e vanilina. JBBL (*Drulia*) e JABA (*Metania*), no Grupo B em vanilina e Grupo C em 254

nm. Amostra dos gêneros *Drulia* JBBB e JBAA no Grupo C em vanilina e Grupo D em 254 nm. Desse modo, percebeu-se que as análises de HCA, as amostras do gênero *Drulia* apresentaram maior tendência formada principalmente referentes aos reveladores 254 nm e vanilina. Consequentemente, houve um indicativo de similaridade de composição química entre os pares de amostras citados.

Nas análises de HCA das amostras referentes ao extrato de metanol, também foram notados padrões de agrupamentos que ocorreram com as amostras JBAB(10) e JBA da espécie *Drulia cristata*, nos Grupos B no revelador 254 nm e E no revelador 366 nm. Com as amostras da espécie de *Drulia uruguayensis*, JBBN(23) e JBBD no Grupo D em 254 nm e Grupo C em vanilina. Com as amostras JAAMV(21), JAAMV(16) e JAAM pertencentes a espécie de *Metania reticulata*, nos Grupos F em 254 e vanilina, e as amostras JAAMV(21) e JAAM no Grupo A do revelador 366 nm. Assim, notou-se que nas amostras do extrato metanólico, ocorreu um padrão de agrupamento em função das espécies, a qual as amostras pertencem, no que se refere aos reveladores 254 e 366 nm.

As análises de HCA do extrato metanólico mostrou-se mais eficiente para identificação do agrupamento de espécies, sugerindo assim a presença de substâncias padrões que definem as espécies. Enquanto as análises do extrato em acetato foram induzidas por fatores externos que culminou no agrupamento de diferentes amostras de gêneros e espécies, tendo então, substâncias mais comuns a todas amostras.

Apesar de que em alguns casos, os padrões de agrupamento observados não evidenciarem similaridade entre amostras da mesma espécie ou gênero, este comportamento é aceitável, podendo ser atribuído a variabilidade da composição química das amostras ocasionada por fatores inerentes a coleta, tais como a sazonalidade e localização do espécime coletado.

Considerando que a matriz de dados utilizados corresponde a informações

qualitativas (ausência/presença) de uma pequena fração das substâncias presentes nos extratos, as informações extraídas dos agrupamentos são suficientes para direcionar estudos quimiométricos quantitativos futuros, utilizando técnicas de maior resolução, como a cromatografia líquida de alta eficiência e a espectrometria de massas.

Nas análises de PCA das amostras do extrato em acetato e metanólico, foi possível verificar as componentes principais que influenciam nas separações dos grupos contendo as amostras de diferentes gêneros e espécies.

Para as amostras que foram reveladas no comprimento de onda 254 nm no extrato em acetato as componentes principais 1 e 2 atuaram na separação dos grupos com os intervalos de Rfs entre 0,37-0,54 e 0,76-0,85 e de 0,13-0,25 e 0,58- 0,66, respectivamente. Este fato foi condizente com análise de HCA. Já a análise das amostras reveladas em 366 nm não corroborou com o HCA. Tendo a separação dos grupos influenciados pelos os Rfs de 0,01-0,30 da componente principal 1 e Rfs 0,34-0,45 da componente principal 2. Assim como a análise de PCA em 366 nm, a de vanilina não confirmou a análise de HCA da mesma.

Para as amostras reveladas no comprimento de onda 254 nm no extrato em metanol o PCA apresentou uma certa similaridade com HCA, tendo os Rfs de 0,16-0,18; 0,37-0,39; 0,55-0,63; 0,67-0,72; 0,76-0,78; e 0,81-0,83 como interferência na separação dos grupos de substâncias. O PCA do revelador em 366 nm corroborou com HCA do respectivo, com exceção do Grupo 1. Os Rfs 0,07-0,09; 0,19-0,24; 0,28-0,33; 0,52-0,57 foram os que predominaram na separação dos grupos. Já o PCA de vanilina apresentou algumas alterações pequenas em relação ao seu HCA. Dependendo das variáveis que compõe as PCs pode ocorrer, que componentes com menor nível de representatividade descrevam o conjunto de dados de forma mais concisa, que as PC 1e PC 2, como ocorreu nos conjunto de dados nos extratos em acetato UV 366 nm, visível vanilina, extratos em

metanol UV 254 e 366 nm, no qual, o uso dessas componentes principais não realizou uma descrição concisa dos dados.

4.2 Cromatografia Líquida de Média Pressão

Com o propósito de fracionar e isolar as substâncias existentes nos extratos das esponjas de água doce da Amazônia, as amostras foram analisadas em CLMP e CCDP,

Na Cromatografia Líquida de Média Pressão (CLMP) foi escolhida uma amostra da mesma espécie *Drulia cristata* em extrato em acetato de etila. Para este teste foram utilizados apenas 30 mg. Após a análise, foi obtido o cromatograma (Figura 37), sendo algumas frações foram reunidas de acordo com o cromatograma e para avaliar o perfil da coluna cromatográfica, foram realizadas ccds em vários sistemas de eluentes para verificar o perfil cromatográfico apresentado nas frações.

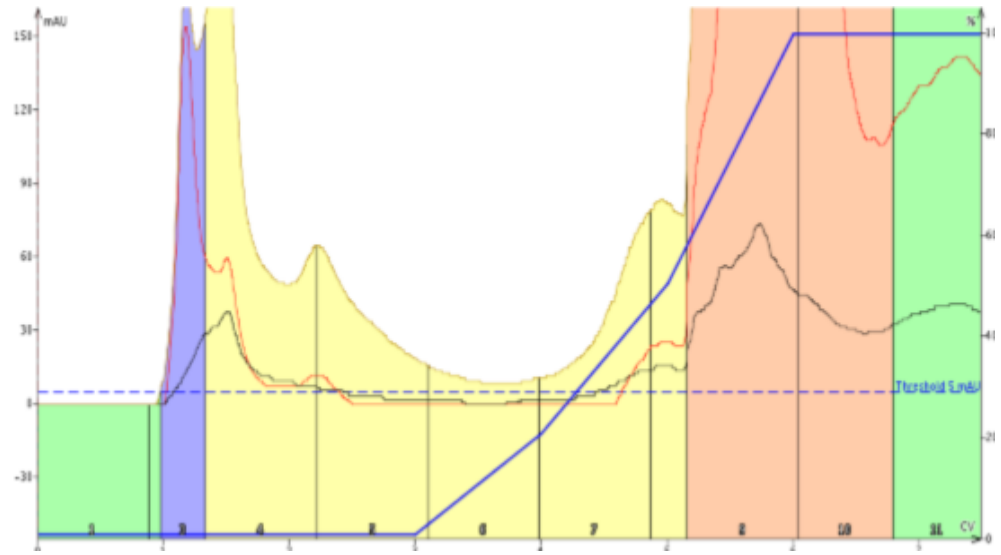


Figura 37. Cromatograma da coluna em CLMP da fração em clorofórmio. linha azul: sistema de eluentes; linha vermelha: 254 nm e linha preta: 366 nm.

O fracionamento da coluna em clorofórmio mostrou-se eficiente apresentando as frações 3, 4 e 5 em forma de cristais. Em análises em ccds, constatou-se que esses cristais que estão sendo formados em diferentes frações de colunas, apresentam a mesma

substância majoritária, levando a concluir que seria apenas uma fragmentação dessa substância em diversas frações. A placa da coluna utilizou os comprimentos de onda para visualização, 366nm e 254nm, eluida nos eluentes clorofórmio/acetato de etila, 9: 1 (Figura 38).

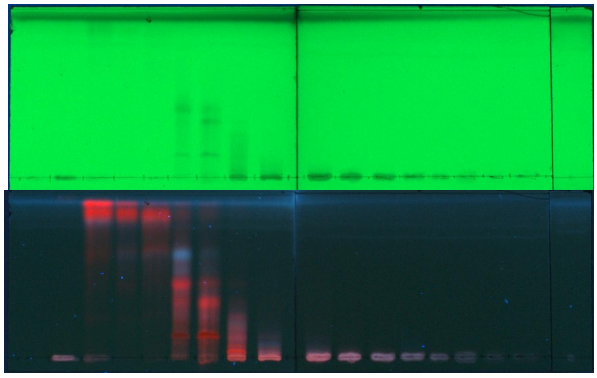


Figura 38. Placa cromatográfica das frações 1 a 18 da coluna do MPLC com a fração clorofórmio. Eluente da placa: clorofórmio/acetato de etila 9: 1. Visualização luz UV 366 nm e 254 nm.

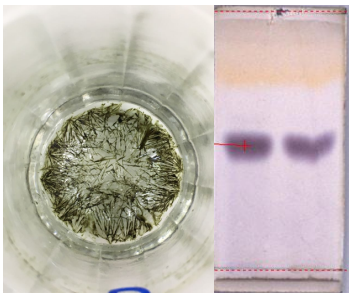


Figura 39. Cristais e CCD dos cristais formados das frações 3 e 4.

Apenas foi possível isolamento de uma substância que para ser identificada utilizou-se a técnica de RMN. A substância identificada foi o estigmasterol, muito comum e encontrado em diversos organismos. No entanto, ainda não havia sido isolado em esponjas de água doce da Amazônia.

Para obter melhores separações, novos testes de sistemas de eluentes foram realizados. No entanto novas as análises em CLMP passaram a ser realizadas com amostras de extratos de outra espécie de esponja.

A partir dos resultados obtidos pelos testes de eluentes realizados em cromatografia

em camada delgada, foi possível programar e analisar sistemas de eluentes para uma nova coluna cromatográfica, desta vez com amostra da espécie de *Drulia uruguayensis* (JBBN). Após a realização da coluna obteve-se o cromatograma (Figura 40), no qual foi possível visualizar onze frações com a presença de substâncias distintas, que foram monitoradas nos comprimentos de onda 254 nm e 366 nm.

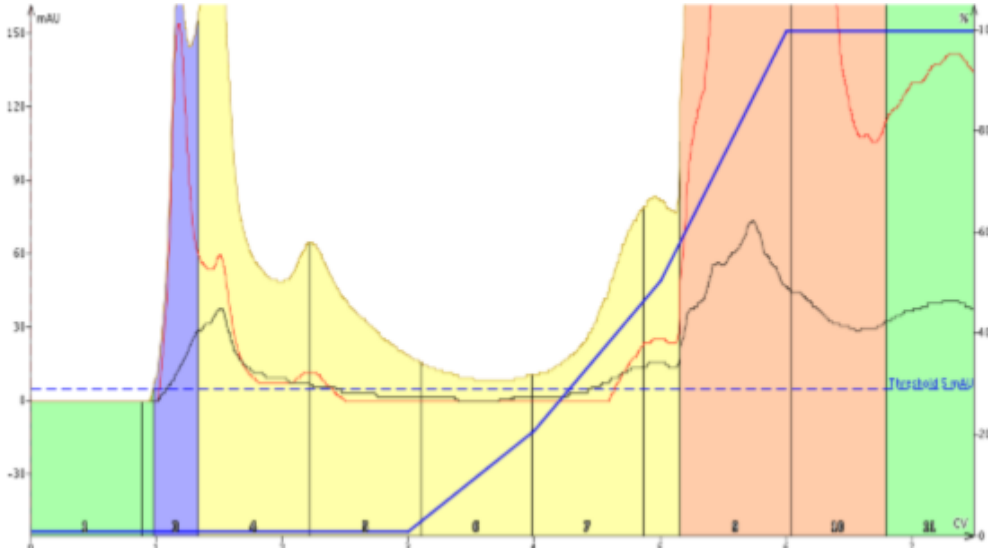


Figura 40. Cromatograma da coluna em CLMP da fração em diclorometano. linha azul: sistema de eluentes; linha vermelha: 254 nm e linha preta: 366 nm.

Para analisar as frações da coluna cromatográfica, foram realizadas ccds para visualizar o desempenho da coluna (Figura 41). Analisando as frações obtidas por meio da placa cromatográfica, percebeu-se que a coluna foi eficiente por apresentar um perfil de substâncias de baixa a alta polaridade.

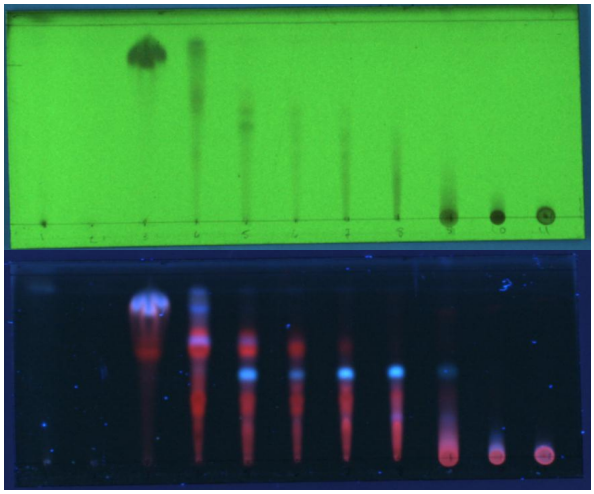


Figura 41. Placa cromatográfica das frações 1 a 11 da coluna do MPLC. Eluentes da placa: diclorometano (100%). Visualização luz UV 366 nm e 254 nm.

Na tentativa de isolamento de alguma substância, foi escolhida a fração 5 (F5) com 35 mg, da coluna em CLMP, então fez-se o uso da Cromatografia em Placa Preparativa para dar seguimento a esse isolamento.

Na Figura 42 (A, B e C), pode-se observar as etapas das eluições realizadas. A partir da terceira eluição, a placa foi cortada e raspada de acordo com as manchas visualizadas em UV 366 nm, obtendo 10 frações.

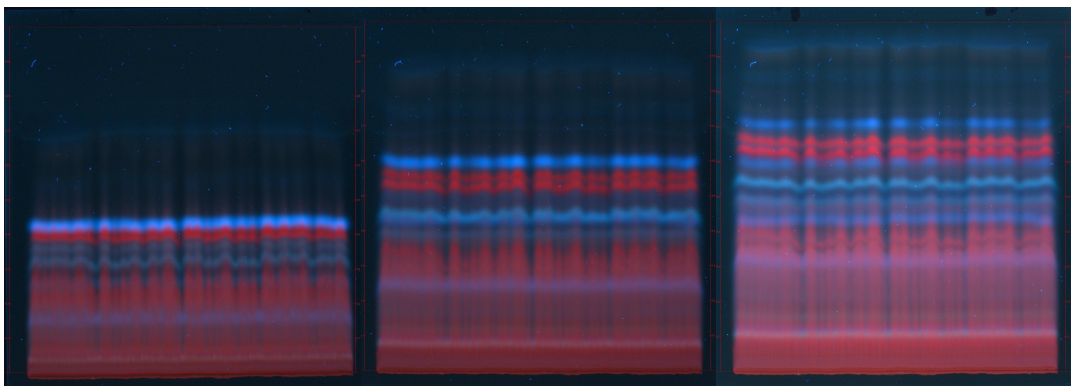


Figura 42. Placa preparativa na primeira (A), segunda (B) e terceira (C) eluição usando a fração 5 da coluna do MPLC. Eluentes da placa: diclorometano: clorofórmio (90:10) Visualização luz UV 366 nm.

A partir da extração das substâncias das 10 frações, uma nova ccd foi realizada para verificar se alguma substância havia sido isolada (Figura 43). Contudo, observou-se que não houve o isolamento das substâncias majoritárias, assim não alcançando o objetivo geral do experimento. Ao observar que algumas frações ficaram com o perfil químico

semelhante, sugeriu-se o agrupamento das mesmas para obter uma maior quantidade de massa das frações para realizar uma futura placa preparativa para o isolamento. Foram reunidas as frações 3 e 4, frações 5 e 6 e frações 7 e 8. As frações que foram agrupadas foram refracionadas e analisadas. Já as frações que não foram agrupadas sendo elas, F1, F2, F9, F10 foram enviadas ao RMN (Ressonância Magnética Nuclear). Porém, como as frações apresentaram um rendimento baixo, não sendo possível obter um bom espectro de RMN.

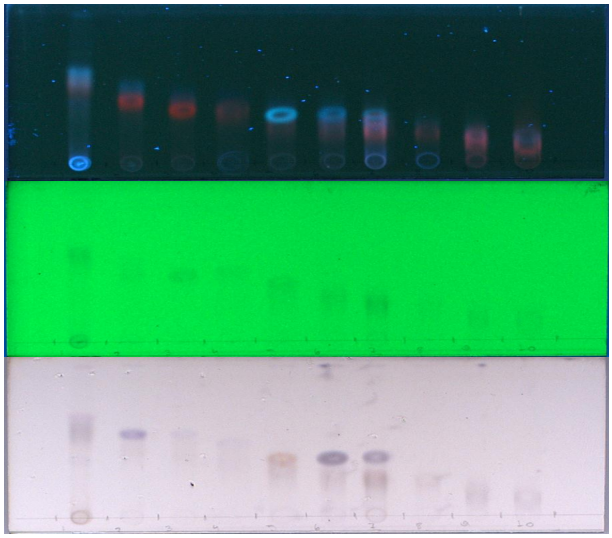


Figura 43. CCD das frações 1 a 10 da placa preparativa eluentes da placa: diclorometano: clorofórmio (90:10) Visualização luz UV 366 nm, 254 nm e vanilina sulfúrica.

As tentativas de isolamento para identificação dos compostos químicos presentes nos extratos foram inúmeras, porém, não foi possível alcançar este objetivo, pois os rendimentos das frações mostraram-se pequenos, necessitando de vários fracionamentos para obter uma quantidade maior de amostra, o que se tornou inviável devido a quantidade da massa dos extratos serem pequenas. Todavia, foi verificado que a melhor maneira para realizar a identificação das substâncias presentes nos extratos de esponjas, foi por espectrometria de massas.

A partir das análises dos perfis cromatográficos, testes de bioatividades foram realizados para direcionar os fracionamentos, os isolamentos e identificação das

substâncias.

5 Ensaios Biológicos

5.1 Atividade inibidora da acetilcolinesterase

Extratos metanólicos de esponjas de água doce da Amazônia foram avaliados na concentração de 1,0 mg / mL quanto à capacidade de inibir a AChE de enguia elétrica (*Electrophorus electricus*), EeAChE e BChE do soro equino, EqBChE. Nenhum dos extratos foi capaz de inibir o EqBChE. No entanto, todos os extratos inibiram a EeAChE em certa medida (Tabela 1), sendo o extrato de *Drulia uruguayensis* o mais potente, com uma inibição de 52% da atividade enzimática.

Os extratos das esponjas marinhas das ilhas Maurício foram examinados a uma concentração de 0,1 mg/mL e apenas nove extratos (de 134 extratos, de 45 espécies) apresentaram atividade moderada de inibição da AChE de 50-64%, enquanto outros dois extratos inibiram mais de 90% da atividade enzimática (BEEDESSEE et al., 2013).

Table1. Atividade de EeAChE na presença de extratos metanólicos de esponjas coletadas na Amazônia.

*Ee*AChE (média±S.E.)	Atividade [%]	Inibição [%]
CTRL	100±1,09	--
MeOH 5%	98,45±0,69	1,5
D. browni	80,93±0,93	19,1
D. cristata	87,50±1,00	12,5
D. uruguayensis	47,72±1,00	52,3
M. reticulata	77,98±0,94	22,02

A curva de inibição do extrato metanólico de *Drulia uruguayensis* foi determinada (Figura 44) e o IC_{50} observado foi de 1,04 ± 0,01 mg /mL. Os melhores resultados de IC_{50} observados por Beedessee e colaboradores, cerca dos dois extratos mais potentes foram 0,018 e 0,016 mg/mL. O único relato na literatura sobre a atividade anticolinesterase de esponjas de água doce foi um estudo com o extrato de acetona obtido de uma esponja

sérvia, *Ochridaspongia rotunda*, que mostrou um AChE IC_{50} de 23,07 µg/mL (TALEVSKA et al., 2017). Embora a atividade inibitória observada em nosso estudo seja moderada (IC_{50} = 1,04 mg/mL), a pesquisa é relevante, pois é o primeiro relato desse tipo de atividade para esponjas de água doce da Amazônia. Esse resultado também é promissor, pois estimula a avaliação da atividade em relação a outros alvos relacionados à DA, como emaranhados β-amilóides e neurofibrilares, além do isolamento e identificação dos componentes individuais do extrato para avaliação futura, a fim de verificar se a atividade provém de uma única substância ou de sinergismo.

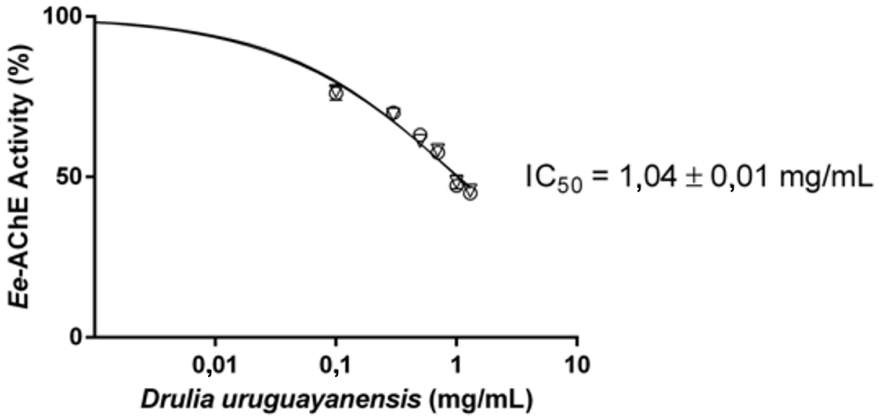


Figura 44. Curva de inibição de Ee-AChE pelo extrato metanólico de *D. uruguayensis*.Valores representam a média de dois ensaios independentes, cada um realizado em triplicata. *p<0,05.

5.2 Atividade antiplasmodial

Os extratos avaliados apresentaram inibição parasitária contra *P. falciparum* (FCR3), sendo o melhor resultado apresentado pelo extrato metanólico de *M. reticulata*, IC_{50} de 2,7µg/mL, seguido pelo extrato de *Drulia browni*, com IC_{50} de 9,9 µg/mL. Extratos com IC_{50} abaixo de 10µg/mL foram considerados resultados promissores para a investigação de moléculas que poderiam ser utilizadas no desenvolvimento de medicamentos antimaláricos. Isso ocorre porque a composição dos extratos envolve um grande complexo de substâncias que podem restringir a substância bioativa, reduzindo

sua capacidade de inibição. Portanto, mesmo com atividade moderada de IC_{50} acima de 15µg/mL, os extratos metanólicos de *D. cristata* e *D. uruguayensis* não devem ser excluídos de estudos futuros para esse tipo de atividade. Não há relatos de estudos com atividade antimalárica com substâncias derivadas de esponjas de água doce, no entanto, é comum observar estudos com substâncias de esponjas marinhas, como o de Said e colaboradores (SAID et al., 2010) com diferentes extratos de diferentes espécies de esponjas marinhas da ilha de Zanzibar, com 23 dos 55 extratos testados mostrando atividade antimalárica, com uma inibição de 41,8% contra as cepas de *Plasmodium falciparum* W2 em mais de 50% nas concentrações de 250 e 50 µg/mL.

6 Espectrometria de Massas

A fim de obter mais informações abrangentes sobre o perfil das amostras que foram realizados os testes biológicos, fez-se necessário análise de massas dessas amostras, assim foram identificados constituintes das amostras utilizadas nos ensaios biológicos.

A análise por espectrômetro de massa no modo de íons positivo e negativo de ionização por eletropulverização (ESI) forneceu evidências da presença de quatro ácidos graxos (Figura 45) em amostras de *D. uruguayensis, D. browni, D. cristata* e *M. reticulata*. Biossinteticamente originada da via do acetato, as estruturas químicas de três ácidos foram sugeridas com base nos íons quase-moleculares *m/z* 311, 325 e 339 $[M-H]^-$ e no fragmento *m/z* 183, observado em todos os extratos. Eles sugerem a presença de ácido 8-metilnonadecanóico ($C_{20}H_{40}O_2$; 1), ácido 9-metilicosanóico ($C_{21}H_{42}O_2$; 2) e ácido 10-metilenodicosanóico ($C_{22}H_{44}O_2$; 3), respectivamente. Essas são cadeias de carbono longas, lineares e saturadas, diferenciando-se apenas no metil ramificado em C8 para massa *m/z* 311, C9 para *m/z* 325 e C10 para *m/z* 339. Estruturas semelhantes foram

encontradas por Dembitsky e colaboradores (DEMBITSKY et al., 1991, 1993, 1994, 2003). nas esponjas de água doce do lago Baikal, na Rússia, a diferença está na ramificação do metil identificada em C11. Outro íon quasi-molecular observado foi *m/z* 381 $[M-H]^-$, sugerindo a presença de ácido pentacosanóico ($C_{25}H_{50}O_2$; 4), o espectro de massa não mostrou fragmento, sugerindo uma cadeia linear de carbono longa, saturada e não ramificada, enfatizando a diferença entre os outros ácidos identificados. O ácido pentacosanóico também foi descrito em esponjas do lago Baikal (DEMBITSKY et al., 1991, 1993, 1994, 2003). Além dos ácidos graxos sugeridos, também foram detectados esteróis (Figura 41), nos quais foram analisados por ESI de modo iônico positivo. Nesse modo de ionização, dois íons quase-moleculares (*m/z* 375 e 399 $[M+H]^+$) foram encontrados em três espécies (*D. uruguayensis, D. cristata* e *M. reticulata*), diferenciando-os de outros íons. O íon *m/z* 375 $[M+H]^+$ sugere a presença de 19-nor-5α-colestan-3β-ol, um esterol raro (5), que mostrou os principais fragmentos em *m/z* 373, 357, 343 e 233, e já foi identificado e isolado na esponja marinha *Axinella polypoides* e na esponja de água doce *Ephydatia fluviatilis* (CRIST e DJERASSI, 1983; MANCONI et al., 1988). O íon *m/z* 399 $[M+H]^+$ indica a possível presença de 24α-metilcolesta-5,22-dien-3β-ol, conhecido como brassicasterol (6), com *m/z* 381, 367, 354, 335, 299, 271, 253 e 231. A mesma substância já foi isolada e identificada em *Petrosia fuciformis* e na esponja de água doce *S. lacustres* (KHALIL et al., 1980; MANCONI et al., 1988).

Os íons *m/z* 403, 413, 415, 419, 425 e 427 $[M+H]^+$ estavam presentes nas quatro espécies estudadas. Os íons em *m/z* 403, 415 e 419 $[M+H]^+$ indicaram a presença de esteróis poli-hidroxilados, sendo um di-hidroxilado e dois tri-hidroxilados. O íon em *m/z* 415 sugere o 24-metilideno-5α-colest-7-en-3β, 6α-diol (7) di-hidroxilado, com fragmentos em *m/z* 397, 363, 328, 254, 211 sendo observado. Os compostos tri-hidroxilados são sugeridos por *m/z* 403 íons, indicando a presença de 5α-colesta-7,22-

dien-3β, 5α, 6β-triol (8) com os fragmentos em *m/z* 371, 366, 267, 209, enquanto *m/z* 419 denota o 5α-colest-7-en-3β, 5α, 6 β-triol (9), com os fragmentos *m/z* 387, 286, 271 e 250. Esses esteróis foram identificados apenas em esponjas marinhas como *Spongionella gracilis*. (PICCIALI e SICA, 1986, 1987; MANCONI et al., 1988). O íon *m/z* 425 propõe a possível existência do 24-isopropenilcolesta-5,22-dien-3β-ol (10), que já foi identificado na esponja marinha *Aplysina fistularis* (CATALAN et al., 1985; MANCONI et al., 1988. O 24-etil-25-metilcolesta-5,22-dien-3β-ol (11), sugerido por *m/z* 427, mostrou fragmentos em m / z 408, 393, 35, 300 e 285. Esta mesma substância já foi identificada na esponja marinha *Halichondria* sp. (SHUBINA et al., 1984; MANCONI et al., 1988). A substância 24α-etilcolesta-5,22-dien-3β-ol (12) foi a única substância avaliada pela fonte de ionização por espectrometria de massa ESI (modo de íon positivo) e APCI (modo de íon negativo), e isolada e identificada adequadamente. Caracterizou-se pelo íon quasi-molecular em *m/z* 413 $[M+H]^+$, com a presença dos principais fragmentos em *m/z* 409, 395, 383, 311 e 255. Essa mesma substância também foi encontrada por Manconi e colaboradores (MANCONI et al., 1988), que isolaram se da esponja de água doce *Spongilla lacustris* e o identificaram como poriferasterol.

Durante a análise do modo iônico negativo ESI-MS, cada espécie apresentou um padrão singular, onde apenas os íons *m/z* 397 e 401 $[M-H]^-$ foram observados em todas as espécies dos dois gêneros (*Drulia e Metania*). Além disso, os íons quasi-moleculares em *m/z* 411, 413, 417, 423 e 425 $[M-H]^-$ foram verificados apenas nas espécies *D. uruguayensis* e *D. cristata.* Essas espécies (*D. uruguayensis* e *D. cristata*) se diferenciam pela presença de *m/z* 373 $[M-H]^-$ sinal exclusivamente na amostra de *D. cristata*. Além disso, no modo iônico positivo ESI-MS, todas as amostras apresentaram o mesmo padrão de íons composto pelos íons quase-moleculares em *m/z* 375, 399, 403, 413, 415, 419, 425, 427 $[M+H]^+$. Portanto, os extratos de *D. cristata* se diferenciam dos demais por

apresentarem todos os íons analisados nos dois modos de ionização (ESI).

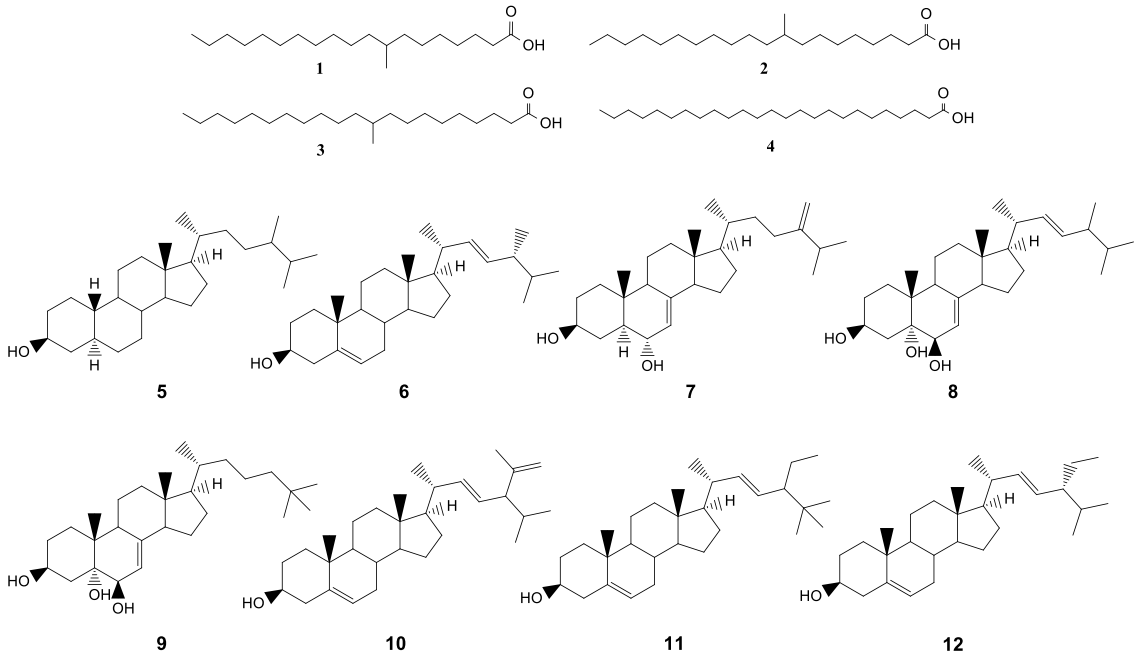


Figura 45. Estrutura químicas dos compostos 1-12.

Estes resultados enriquecem não só o conhecimento, mas também a importância e o potencial deste animal na região Amazônica, já que este é tão abundante e pouco explorado.

Pela complexidade das amostras e dos dados obtidos por meios das análises químicas, foi possível realizar uma parceria com a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), onde foi realizado uma análise química mais sensível por meio da técnica cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detector de espectrometria de massas de alta resolução, com isso foi possível realizar um estudo metabolômico, no qual, pode-se identificar mais substâncias e biomarcadores que distingue as espécies, trabalho pioneiro com esponjas de água doce.

O perfil cromatográfico de cada amostra demonstra uma distinção clara entre as espécies nos dois modos de ionização (Figuras 46 e 47). Uma média de 31 picos foi

detectada por cromatografia líquida em espectrometria de massa de alta resolução (LC-HRMS) (sinal-ruído maior que 3) em todas as amostras avaliadas nos modos positivo e negativo. Nos dois casos, todas as espécies apresentaram seus maiores picos como compostos de baixa polaridade relativa, eluindo de 7 a 10,9 min. (Figura 42 e 43). No modo de ionização positiva, o perfil cromatográfico de *D. uruguayensis* apresentou um comportamento peculiar quando comparado às outras três espécies avaliadas. Essa espécie foi a única dentre as estudadas a apresentar compostos de média a alta polaridade no perfil cromatográfico com intensidade relativa superior a 15% (Figura 42).

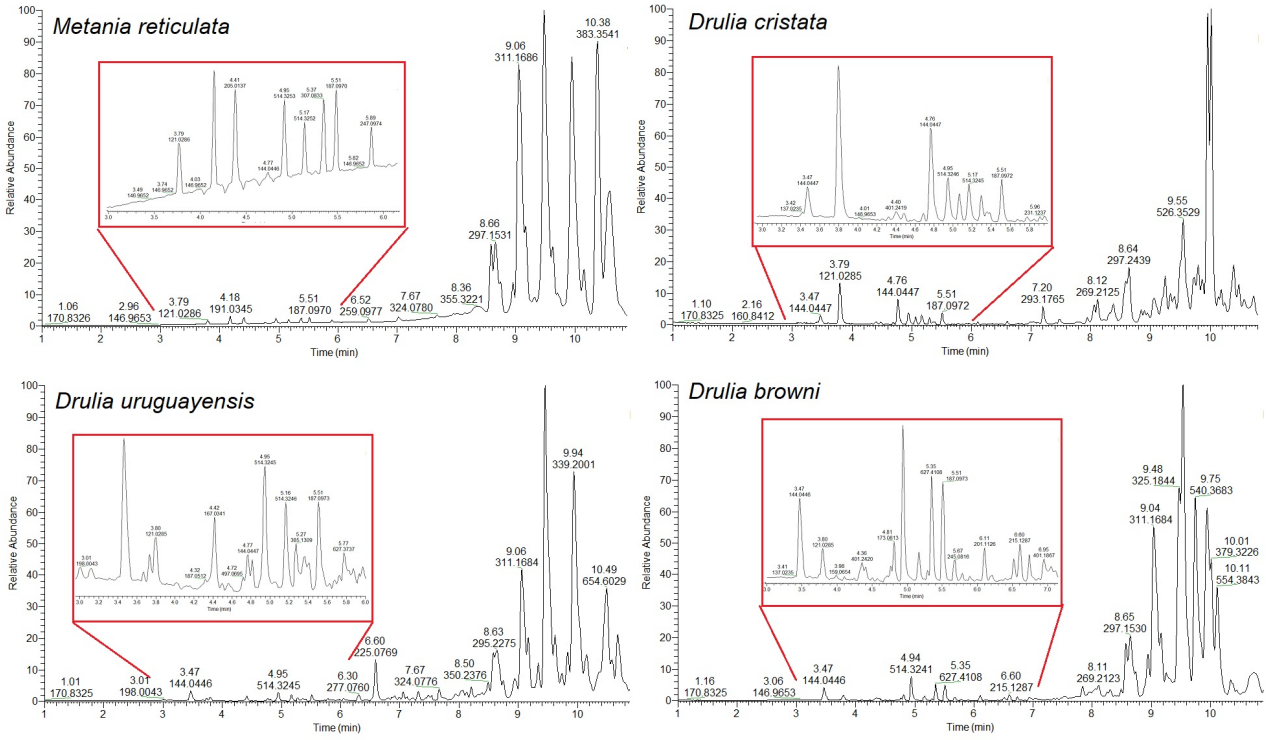


Figura 46. Cromatograma pico-base de cada espécie avaliada no modo de ionização negativa.

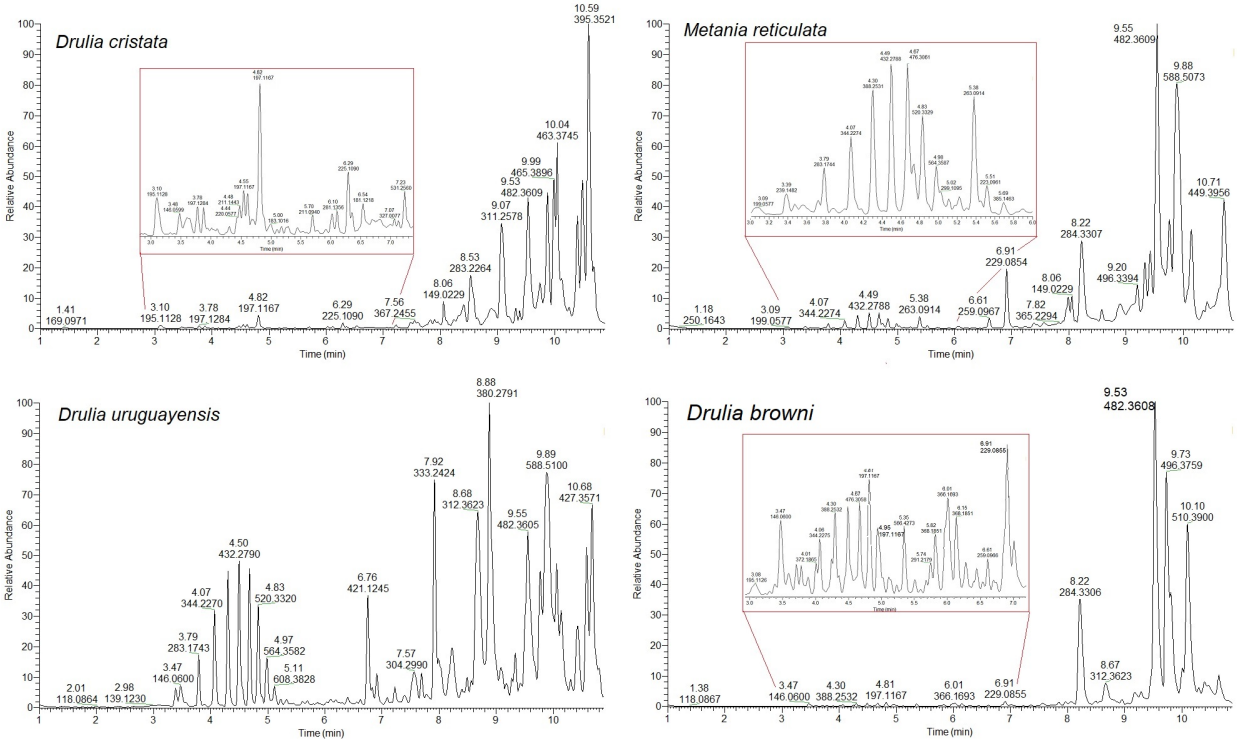


Figura 47. Cromatograma pico-base de cada espécie avaliada no modo de ionização positiva.

A identificação de compostos para todas as espécies foi realizada principalmente no modo de ionização positiva. Entre os picos cromatográficos, 6 compostos foram identificados sugestivamente pelo seu padrão de fragmentação em HRMS (Tabela 2) como ácido graxo (1) e esteróis (5). O ácido araquídico, o único ácido graxo identificado, estava presente em *D. cristata*, *D. uruguayensis* e *M. reticulata*. Somente *D. browni* não apresentou esse ácido graxo em sua composição. Esse composto já havia sido relatado em outras esponjas de água doce, como *Euspongilla lacustris* (DEMBITSKY et al., 1991). Além disso, outros 13 picos (Tabela 3) foram sugestivamente classificados como ácidos graxos, pois seu padrão de fragmentação exibe perda de 45 e 17 Da, valores típicos para a perda de grupos carbonil e hidroxi.

Tabela 2. Padrão de fragmentação dos sinais identificados no modo de ionização positiva.

Tempo de retenção (min.)	sinal *m/z*	fragmentos observados	identificação
9,62	313,2871	296,2563; 268,1064; 253,1580; 241,1211; 227,1415; 283,0586; 267,1736; 253,1580	Ácido araquídico
5,68	385,2227	369,1651; 300,1129; 281,0991; 255,2108; 213,0561	22-dehidrocolesterol
8,50	425,2578	383,2032; 365,1931; 327,1412; 309,1302; 298,2747; 281,1356; 252,2299; 240,2678; 213,1627; 109,1014	24-isopropilcolesta-5,22,25-trien-3β-ol
9,01	469,3497	405,3185; 423,3277; 451,3252; 452,3151	Pentahidroxi 9,11-secosterol
7,95	431,3281	369,3101; 271,2053; 253,1942; 211,1476	Esterol dihidroxilado
8,01	431,3281	287,1281; 269,0761; 226,9512	Esterol trihidroxilado

Table 3. Sinais (*m/z*) mais significativos para o agrupamento de amostras durante a análise quimiométrica dos dados do modo de ionização positiva.

		Intensidade relativa			
Sinais caracterizado *m/z*	Sugestão de classificação	*M. reticulata* (M.R)	*D. cristata* (D. C)	*D. uruguayensis* (D. U)	*D. browni* (D. B)
284,3307 (D. B)	Ácido graxo linear saturado	100	38,36	35,65	100
433,2358 (M. R)	Ácido graxo	66,05	0,0	21,04	2,26
409,2942 (D. C)	Ácido graxo	57,41	53,11	20,69	12,02
395,2796 (D. C)	Ácido graxo	48,89	67,82	21,87	7,50
597,4111 (D. C)	Ácido graxo	46,95	62,25	4,11	17,03
393,2562 (D. C)	Ácido graxo	40,64	64,36	26,95	5,32
431,3281 (M. R)	Esterol	33,02	24,42	4,89	0,0
367,2366 (D. C)	Ácido graxo	25,08	73,42	26,97	12,89
283,2179 (D.C)	Ácido graxo	23,53	100	53,52	6,04
445,3650 (M. R)	Ácido graxo	22,79	0,0	0,0	3,24
351,2389 (D. C)	Ácido graxo	22,76	70,33	26,31	6,28
353,2484 (D. C)	Ácido graxo	21,07	55,96	23,87	6,04
455,2778 (D. U)	-	20,36	0,0	30,76	5,11

Sinais caracterizado *m/z*	Sugestão de classificação	Intensidade relativa *M. reticulata* (M.R)	*D. cristata* (D. C)	*D. uruguayensis* (D. U)	*D. browni* (D. B)
411,2877 (M. R)	Ácido graxo	19,37	0,0	0,0	3,60
251,1912 (D. C)	Ácido graxo	18,33	56,36	27,81	5,92
425,2578 (D. U)	Esterol	17,52	0,0	29,99	0,0
437,3390 (M. R)	Ácido graxo	17,16	0,0	0,0	0,0
341,2760 (D. U)	-	15,19	20,04	66,62	6,17
469,2817 (D. U)	Esterol	13,61	0,0	27,08	4,45
307,2172 (D. C)	Ácido graxo	12,08	69,09	30,88	3,85
321,3498 (D. U)	-	11,85	10,99	100	27,45
291,1639 (D. U)	-	11,48	28,28	41,45	5,11
385,2227 (D. U)	Esterol	11,13	21,53	74,49	3,64
333,2244 (D. U)	-	11,10	20,88	82,30	4,55
313,2871 (D. U)	Ácido graxo	0,0	15,65	37,01	10,03
303,2106 (D. U)	-	6,20	9,40	48,89	1,53
380,2754 (D. U)	-	5,80	8,98	66,52	0,98

*() Sinais m/z caracterizados de: D.U = *Drulia uruguayensis*; D. B = *Drulia browni*; M. R = *Metania reticulata*; D. C = *Drulia cristata*.

Entre os esteróis identificados, o 22-dehidrocolesterol (Figura 48B), que já havia sido descrito na esponja de água doce *Spongilla lacustris* (MANCONI et al., 1998), estava ausente apenas em *D. cristata* entre as quatro espécies avaliadas. Além disso, todas as espécies apresentaram os esteróis 24-isopropilcolesta-5,22,25-trien-3β-ol (Figura 48C) (KOKKE et al., 1979; TAM HA et al., 1985; MANCONI et al., 1998) e penta-hidroxi 9,11-secosterol (Figura 48D), que está sendo relatado pela primeira vez na composição de esponjas de água doce. Esse fato traz luz para novas possibilidades de explorar esse organismo na produção de bioprodutos, uma vez que esses metabólitos são um dos muitos compostos especializados descritos em extratos bioativos de esponjas marinhas, uma fonte natural bem explorada de bioprodutos (CAPON e FAULKNER, 1985, MANCONI et al., 1998). O quase-íon m / z 431.3281 apresentou dois padrões de fragmentação distintos (Tabela 3), que permitem sua classificação como esteróis di-hidroxilados (Figura 48E) em *M. reticulata* e *D. cristata* e como esterol tri-hidroxilado (Figura 48F) em *D. uruguayensis*. *D. browni* foi a única espécie que não apresentou o quase-íon

431.3281 em sua composição. Além dessas espécies de água doce (BOLSON et al., 2019), esses esteróis di e tri-hidroxilados haviam sido relatados anteriormente apenas em esponjas marinhas (PICCIALLI e SICA, 1986; 1987).

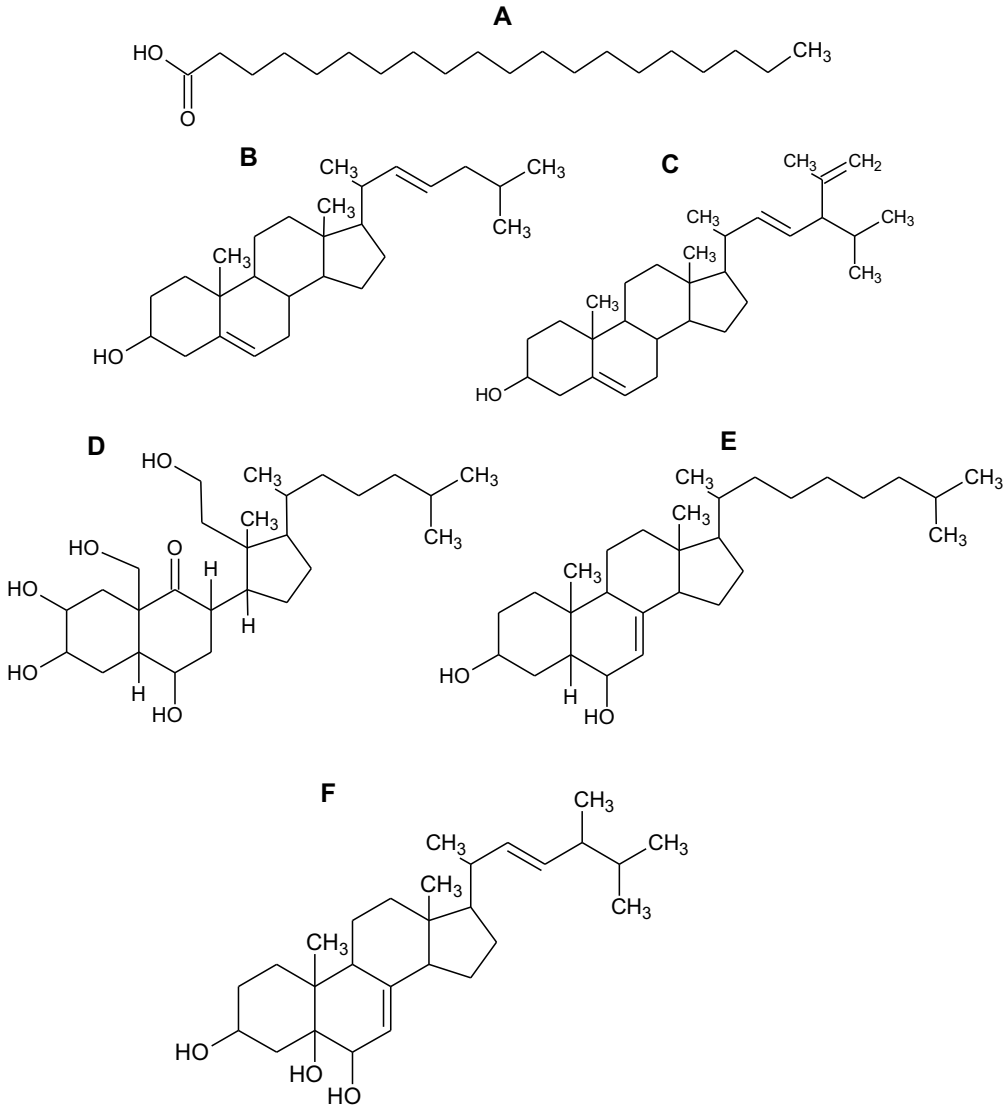


Figura 48. Moléculas identificadas - (A) ácido araquídico, (B) 22-desidrocolesterol, (C) 24-isopropilcolesta-5,22,25-trien-3β-ol, (D) penta-hidroxi-9,11-secosterol, (E) esteróis di-hidroxilados e (F) esterol tri-hidroxilado.

6.1 Avaliação quimiossistemática do modo de ionização positiva

A avaliação quimiométrica dos íons totais no modo de ionização positiva por HCA e PCA (Figura 49) demonstrou a formação de dois grupos correlacionados principalmente a sinais m/z na faixa de 250,0 a 600,0 Da. Os resultados da HCA (Figura

49A) correlacionaram fortemente *M. reticulata* em um cluster inesperado composto por *D. uruguayensis* e *D. cristata*. Além disso, *D. browni* foi classificado como um grupo de espécies únicas. Os resultados do PCA mostraram um padrão de grupo mais consistente sistematicamente nos Componentes Principais (PC) 1, 2 e 3. Apesar da combinação dos PC 1 e 2 (Figura 49B) apresentarem o mesmo padrão dos resultados do HCA (Figura 49A), nos quais *M. reticulata* e *D. uruguayensis* estão intimamente relacionados, traz informações importantes para distinguir especificamente cada espécie de *Drulia*, pois eram extremamente distantes dentro desses PCs. Além disso, a combinação dos PCs 1 e 3 foi capaz de fornecer informações para diferenciar os gêneros avaliados, pois todas as espécies de *Drulia* foram agrupadas na parte superior do gráfico de escores (Figura 49C).

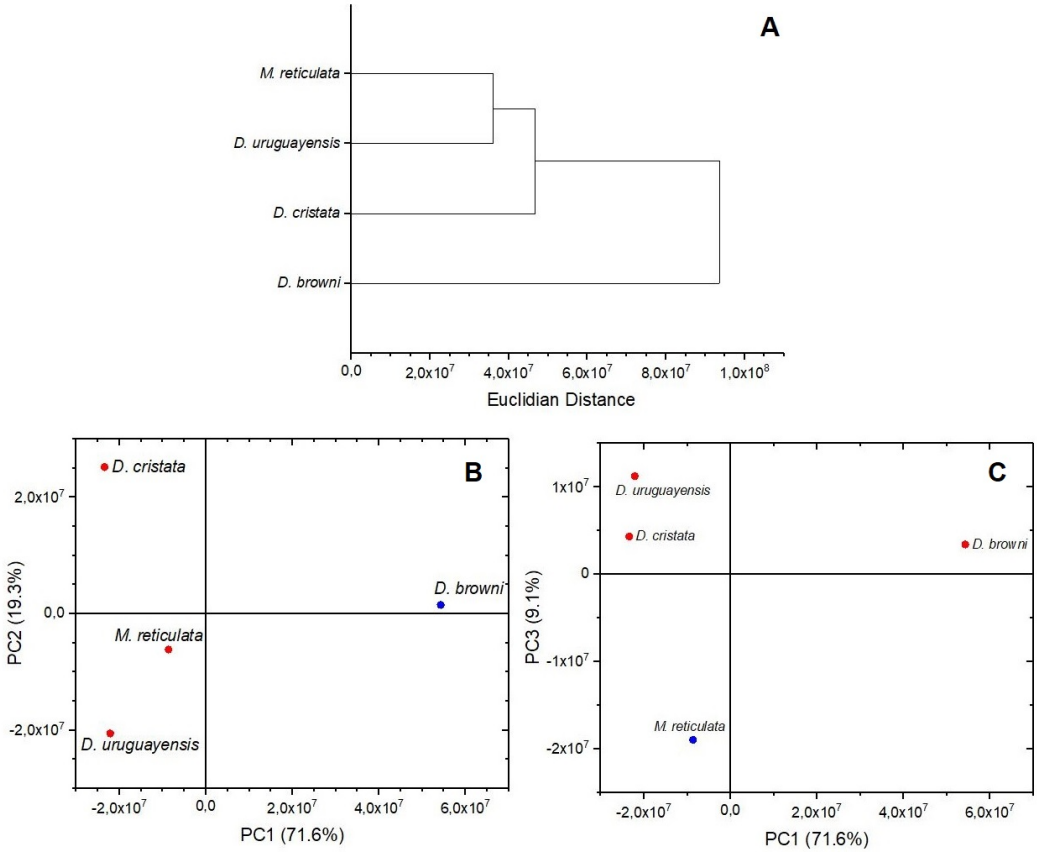


Figura 49. Análise quimiométrica do modo de ionização positiva por (A) HCA, (B) PCA com os principais componentes 1 e 2 e (C) PCA com os principais componentes 1 e 3.

A análise de cargas nos PC 1 e 2 demonstra que a distinção de espécies de *Drulia*

(Figura 49B) está relacionada aos seus principais sinais *m/z* (Tabela 2), que eram diferentes em cada um deles, contribuindo para sua separação. Além disso, os sinais de 21 *m/z* observados nas amostras de *Drulia* estavam relacionados à sua distinção devido aos diferentes padrões de concentração semiquantitativa (intensidade relativa) deles ao longo de cada espécie (Tabela 2). Entre esses sinais, os $[M+H]^+$ 455,2778, 425,2578, 469,2817 e 433,2358 moleculares não ocorreram em *D. cristata* e apresentaram-se com concentração relativa menor que 5% em *D. browni*. Portanto, eles podem estar indicando como possíveis marcadores químicos específicos da espécie para *D. uruguayensis* dentro de seu gênero. Dentro de *Drulia*, *D. browni* foi a espécie menos quimiodiversidade no modo de ionização positiva. Sua principal característica era seu principal composto, representado pelo $[M+H]^+$ 284,3307, um ácido graxo linear saturado, que também é o principal composto de *M. reticulata*. Além disso, esse sinal *m/z* é o principal responsável pela similaridade entre as duas espécies (Figura 49B) no PC 2.

A diferenciação de gêneros de *Drulia* e *Metania* pelos PCs 1 e 3 pode trazer luz a possíveis marcadores químicos para caracterização de gêneros. *M. reticulata* foi caracterizada por sinais de cinco *m/z* (Tabela 2), cuja identificação putativa também os sugere como ácidos graxos e esteróis. Dentro deles, os sinais *m/z* 437,3390, 411,2877 e 445,3650 eram quase exclusivos para *M. reticulata* (Tabela 2), classificando-os como marcador químico de *Metania* para espécies ou até para gêneros. Vale ressaltar que essa definição exigiria a avaliação de uma variedade maior de espécies de *Metania*. Os outros dois sinais característicos de *M. reticulata* foram mais adequados para abordagens não direcionadas, pois ocorreram em todas as espécies avaliadas.

Pesquisas anteriores já haviam discutido que a variabilidade da composição de ácidos graxos de cadeia longa (mais de 25 carbonos) nas esponjas marinhas poderia ser usada como marcadores quimiotaxonômicos para nível de ordem e classe (ERPENBECK

e SOEST, 2007). Como nossos resultados indicam uma grande distinção entre espécies relacionadas à sua composição em ácidos graxos de cadeia média (C_{15}-C_{25}), pode-se hipotetizar que essa classe química possa apresentar significância taxonômica relevante no nível de espécie das esponjas de água doce.

6.2 Avaliação quimiossistemática do modo de ionização negativa

O modo de ionização negativa corrobora os dados do modo de ionização positiva (Figura 50). Os resultados de HCA e PCA indicaram uma clara distinção entre os gêneros e enfatizam semelhanças entre *D. uruguayensis* e *D. cristata*. Em geral, os perfis espectrométricos obtidos no modo de ionização negativa foram menos quimiodiversos em comparação ao modo positivo e apresentaram seu sinal mais significativo para análises quimiométricas dentro de *m/z* variando de 100 a 400.

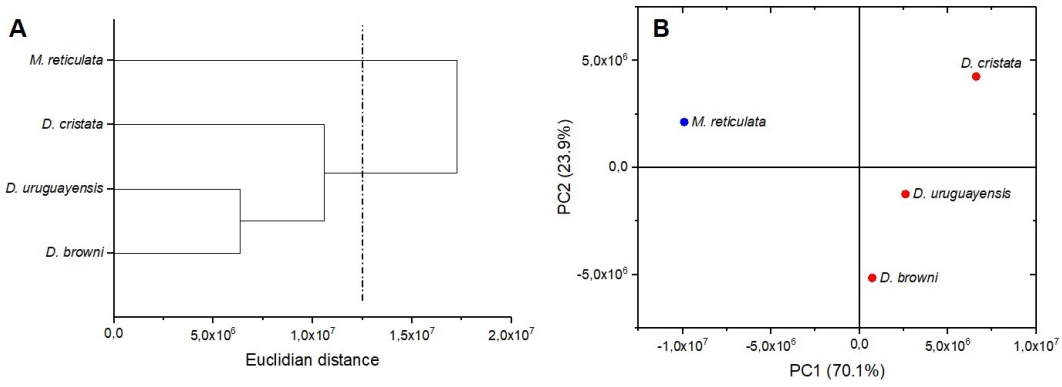


Figura 50. Análise quimiométrica do modo de ionização negativa por (A) HCA, (B) PCA.

A avaliação das cargas de PCA destaca as principais diferenças entre os gêneros em seus principais compostos (Tabela 4). A caracterização de *M. reticulata* no modo de ionização negativa pode estar principalmente associada à sua concentração relativa dos sinais *m/z* 147,9530 e 116,9258, que também eram seus compostos majoritários (Tabela 4). Por outro lado, a caracterização de *Drulia* pode ser correlacionada com alta

concentração relativa de *m/z* 200,9842, 198,9245 e 196,9469 (Tabela 4).

Tabela 4. Sinais (*m/z)* mais significativos para o agrupamento de amostras durante a análise quimiométrica dos dados do modo de ionização negativa.

	Intensidade relativa			
Sinal *m/z*	*M. reticulata*	*D. cristata*	*D. uruguayensis*	*D. browni*
147,9530	100	12,43	24,40	41,94
116,9258	81,54	0,61	0,83	1,93
297,1705	49,10	10,09	33,37	100
175,9468	37,99	5,07	7,84	33,34
198,9245	37,39	100	100	97,18
116,9775	31,96	0,36	0,80	1,43
196,9469	28,76	81,82	83,43	79,28
355,1364	27,95	3,10	5,91	7,70
404,1049	27,86	0,36	30,83	13,68
130,9628	21,90	2,14	3,45	6,07
161,0795	17,11	27,98	17,84	35,01
200,9842	15,68	45,74	43,68	42,19
163,9055	14,84	27,81	18,48	35,57
165,9474	6,87	10,41	8,55	15,99
202,9345	5,32	11,08	12,24	12,51
505,1929	3,31	2,57	5,54	82,58
343,1402	2,95	3,81	6,29	35,99
195,0389	2,04	5,18	5,39	5,21
359,1748	1,71	4,09	6,13	8,06
541,173	1,36	1,88	2,40	39,16
667,234	1,13	0,57	0,0	36,85
568,2009	0,73	0,07	1,26	38,56
702,4128	0,44	0,25	13,06	0,80

Além disso, para a distinção de gêneros, também foi possível destacar marcadores químicos para cada espécie de *Drulia*, entre seus compostos menores (Tabela 4),

indicando a viabilidade desse modo de ionização especialmente para abordagens não direcionadas. *D. uruguayenis* e *D. browni* foram caracterizados principalmente por quatro sinais quase exclusivamente em *m/z* 702,4128 (*D. uruguayensis*), 541,1730, 568,2009 e 667,2340 (*D. browni*).

Como o modo de ionização negativa apresentou a maioria de seus sinais relevantes para distinção de espécies e gêneros em compostos menores, esse método de análise é mais confiável em abordagens não direcionadas e não deve ser usado na seleção de variáveis para métodos direcionados, nos quais o isolamento do composto é obrigatório.

7 CONCLUSÃO

Durante a caracterização do perfil químico cromatográfico dos extratos em acetato de etila e metanol, observou-se diferentes perfis, com a presença de substâncias com a coloração azul e vermelha, sendo marcantes na maioria das amostras.

A análise de agrupamento hierárquico e a análise dos componentes principais, no qual a formação dos conjuntos em cada análise foi sempre composta por grupos heterogêneos, ou seja, a formação dos grupos fora em sua maioria constituídos por amostras de gêneros e espécies diferentes.

A avaliação metabolômica não direcionada das espécies *Drulia* e *Metania* trouxe uma ideia inicial em várias questões relacionadas à sistemática e quimiotaxonomia das esponjas de água doce. Foi possível estabelecer vários marcadores químicos, que podem ser facilmente aplicados na identificação de espécies e gêneros. Em geral, as espécies avaliadas podem ser identificadas pelo seu perfil de ácidos graxos de cadeia média, comportamento semelhante observado nas esponjas marinhas, que enfatiza a importância dessa classe química na avaliação das esponjas. Os resultados também sugeriram que o perfil de esteróis poderia ser usado como marcadores químicos taxonômicos específicos da espécie, uma vez que permitiram a distinção entre espécimes de *D. uruguayensis* e *M. reticulata*. Como vários dos ácidos graxos e esteróis putativamente identificados neste trabalho foram descritos anteriormente como compostos bioativos de esponjas marinhas, os resultados indicam o possível uso de esponjas de água doce como nova fonte desses compostos para a indústria farmacêutica, a aplicabilidade desse organismo na biossíntese estudo de via de ácidos graxos bioativos e esteróis interessantes e no desenvolvimento de sistemas eficientes de aquicultura de esponjas bioativas.

Um esterol foi isolado e identificado por meio das análises químicas realizadas, o

estigmasterol, esta substância mesmo sendo comum em muitos organismos, foi de muita relevância para a pesquisa da tese.

Os extratos de esponjas de água doce, já mostraram um potencial na inibição da enzima acetilcolinesterase e do plasmódio *P. falciparum*, podendo as substâncias provenientes dos metabolismos das esponjas de água doce da Amazônia se transformar em um alvo terapêutico para doenças neurodegenerativas e malária.

8 REFERÊNCIAS

BAKER, D. D.; CHU, M.; OZA, U.; RAJGARHIA, V. The value of natural products to future pharmaceutical discovery. Natural Product Reports. v. 24, p. 1225–1244, 2007.

BARROS, I. B.; VOLKMER-RIBEIRO, C.; VEIGA JUNIOR, V. F. Sterols from sponges of Anavilhanas. Biochemical Systematics and Ecology. v. 49, p. 167-171, 2013

BEEDESSEE, G.; RAMANJOOLOO, A.; SURNAM-BOODHUN, R.; VAN SOEST, R. W.; & MARIE, D. E. Acetylcholinesterase-inhibitory activities of the extracts from sponges collected in Mauritius Waters. Chemistry & Biodiversity. v.10, n. 3, p. 442-451, 2013.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. Natural Products Reports. v. 20, p. 1–48, 2003.

_____. Marine natural products. Natural Products Reports. v. 21, p: 1–49, 2004.

_____. Marine natural products. Natural Products Reports. v. 22, p. 15–61, 2005.

_____. Marine natural products. Natural Products Reports. v. 23, p. 26–78, 2006.

_____. Marine natural products. Natural Products Reports. v. 27, p.165–237, 2010.

_____. Marine natural products. Natural Products Reports. v. 28, p. 196–268, 2011.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; HU, W. -P.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. Natural Products Reports. v. 24: p. 31–86, 2007.

_____. Marine natural products. Natural Products Reports. v. 25: p. 35–94, 2008.

_____. Marine natural products. Natural Products Reports. v.26: p. 170–244,

2009.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. Natural Products Reports. v. 29, p. 144–222, 2012.

_____. Marine natural products. Natural Products Reports. v. 30, p. 237–323, 2013.

_____. Marine natural products. Natural Products Reports. v. 31, p. 160–258, 2014.

BOLSON, G. C. M. DA C.; DE BARROS, I. B.; VOLKMER-RIBEIRO, C.; LIMA, J. A.; FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, I.; ORLANDI, P. P; DA VEIGA JUNIOR, V. F. Chemical composition and biological activities of *Metania* and *Drulia* (Metanidae) Freshwater sponges from Amazonia. Chemistry and Biodiversity. v.16, n. 8, p. 1-7, 2019.

CAPON, R. J.; & FAULKNER, D. J. Herbasterol, an Ichthyotoxic 9, 11-Secosterol from the Sponge *Dysidea herbacea*. Journal of Organic Chemistry. v. 50, n. 24, p. 4771–4773, 1985.

CATALAN, C. A.; THOMPSON, J. E.; KOKKE, W. C. M. C.; DJERASSI, C. Biosynthetic studies of marine lipids – 3: Experimental demonstration of the course of side chain extension in marine sterols. Tetrahedron. v. 41, n. 6, p.1073-1084, 1985.

CRIST, B. V.; & DJERASSI, C. Minor and trace sterols in marine invertebrates 47. A re-investigation of the 19-nor stanols isolated from the sponge *Axinella polypoides*. Steroids. v. 42, n. 3, p. 331-343, 1983.

DEMBITSKY, V. M.; KASHIN, A. G.; KARAGANOVA, M. V. Phospholipid and fatty acid composition of the freshwater sponge *Euspongilla lacustris* from the Volga river estuary. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B:* Comparative Biochemistry. v. 100, p. 185-187, 1991.

DEMBITSKY, V. M., REZANKA, T., & KASHIN, A. G. Comparative study of the endemic freshwater fauna of Lake Baikal—II. Unusual lipid composition of two

sponge species *Baicalospongia bacillifera* and *Baicalospongia intermedia* (family Lubomirskiidae, class Demospongiae). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry. v.106, n. 4, p. 825-831, 1993.

DEMBITSKY, V. M.; KASHIN, A. G. Comparative study of the endemic freshwater fauna of Lake Baikal—VI. Unusual fatty acid and lipid composition of the endemic sponge *Lubomirskia baicalensis* and its amphipod crustacean parasite *Brandtia (Spinacanthus)* parasitica. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry. v. 109, n.2-3, p. 415-426, 1994.

DEMBITSKY, V. M.; REZANKA, T.; SREBNIK, M. Lipid compounds of freshwater sponges: family Spongillidae, class Demospongiae. Chemistry and physics of lipids. v. 123, n. 2, p. 117-155, 2003.

DE BARROS I. B.; SANTOS, E. S. G. D.; GOMES, D. E. D.; VOLKMER-RIBEIRO, C.; SILVA, C. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. Elemental composition of freshwater sponges *Drulia uruguayensis* and *Drulia cristata* collected in the Tapajós river. X-Ray Spectrometry. v. 42, n. 2, p. 59-62, 2013.

DE BARROS, I. B.; VOLKMER-RIBEIRO, C.; VEIGA JUNIOR, V. F. Esteróis e constituintes voláteis da esponja dulcícola *Trochospongilla paulula* (BOWERBANK). Quimica Nova. v. 38, n. 9, p. 1192–1195, 2015.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemistry. Pharmacology. v. 7, p. 88-95, 1961.

ERPENBECK, D.; VAN SOEST, R. W. M. Status and Perspective of sponge chemosystematics. Marine Biotechnology. v. 9, p. 2-19, 2007.

GRANATO, A. C.; DE OLIVEIRA, J. H.; SELEGHIM, M. H.; BERLINCK, R. G.; MACEDO, M. L.; FERREIRA, A. G.; ... & MORAES, M. O. Produtos naturais da ascidia *Botrylloides giganteum*, das esponjas *Verongula gigantea*, *Ircinia felix*, *Cliona*

delitrix e do nudibrânquio *Tambja eliora*, da costa do Brasil. Química Nova. v. 28, n. 2, p. 192-198, 2005.

KHALIL, M. W.; DJERASSI, C.; SICA, D. Minor and trace sterols in marine invertebrates XVII. 1 (24R)-24, 26-dimethylcholesta-5, 26-dien-3β-01, a new sterol from the sponge *Petrosia ficiformis*. Steroids. v. 35, n. 6, p. 707-719, 1980.

KELECOM, A. Synthesis of marine natural products in Brazil. Journal of the Brazilian Chemical Society. v. 9, n. 2, p. 101-118, 1998.

KOKKE, W. C. M. C.; TARCHINI, C.; STIERLE, D. B.; DJERASSI, C. Isolation, structure elucidation and partial synthesis of xestosterol, biosynthetically significant sterol from the sponge *Xestospongia muta*. The Journal of Organic Chemistry. v. 44, n. 19, p. 3385-3388, 1979.

LIMA J.A; COSTA, R. S; EPIFÂNIO R. A.; CASTRO, N. G.; ROCHA, M. S.; PINTO, A. C. *Geissospermum vellosii stembark* Anticholinesterase activity and improvement of scopolamine-induced memory deficits. Pharmacology Biochemistry and Behavior. v. 92, 3, p.508–513, 2009.

MANCONI, R.; PICCIALLI, V.; PROZATO, R.; SICA, D. Steroids in porifera. Sterols from freshwater sponges *Ephydatia fluviatilis* (L.) and *Spongilla lacustris* (L.). Comparative Biochemistry and Physiology. v. 91b, n. 2, p. 237-245, 1988.

MEHBUB, M. F.; LEI, J.; FRANCO, C.; ZHANG, W. Marine Sponge Derived Natural Products between 2001 and 2010: Trends and opportunities for discovery of bioactives. Marine Drugs. v.12, p. 4539-4577, 2014.

PICCIALLI, V.; SICA, D. New dihydroxylated sterols from the marine sponge *Spongionella gracilis*. Journal of Natural Products. v. 49, p. 779-783, 1986.

PICCIALLI, V.; SICA, D. Four new trihydroxylated sterols from the sponge *Spongionella gracilis*. Journal of Natural Products. v. 50, p. 915-920, 1987.

RABELO, D. M.; PINHEIRO M. L. B; BARISON, A.; SALOMÉ, K. S.; COSTA, E.V.; SILVA, F. M. A.; CHAVES, Y.; BASTOS, I. S. ‘Isoquinolinic alkaloids and

investigation of the antiplasmodic and antibacterial activities of *Guatteria citriodora* (Annonaceae)', Química. Nova. n. 37, p. 1453-1458, 2014.

SAID, S. A.; MOSHI, M. J.; NONDO, R. S. O.; MASIMBA, P. J.; INNOCENT, E.; GUANTAI, A. Evaluation of the potential of the marine sponges of the Zanzibar Island to yield antimalarial and antimicrobial active compounds. Tanzania Journal of Health Research. v. 12, n. 3, p. 195-202, 2010.

SHUBINA, L. K.; MAKAR'EVA, T. N.; STONIK, V. A. Steroid compounds of marine sponges. III. 24-Ethyl-25-methylcholesta-5, 22-dien-3β-ol—A new marine sterol from the sponge *Halichondria* sp. Chemistry of Natural Compounds. v. 20, n. 4, p. 438-441, 1984.

TALEVSKA, A., PEJIN, B., BERIC, T., & STANKOVIC, S. Further insight into the bioactivity of the freshwater sponge *Ochridaspongia rotunda*. Pharmaceutical Biology. v. 55, p. 1313-1316, 2017.

TAM HA, T. B.; KOKKE, W. C. M. C.; PROUDFOOT, J. R.; DJERASSI, C.; THOMPSON, J. Minor and Trace Sterols in Marine Invertebrates 53: Further novel marine sterols resulting from triple and quadruple biomethylation of the cholesterol side-chain. Steroids. v. 45, n. 3–4, p. 263-276, 1985.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture, Science. n. 193, p. 673-675, 1976.

ANEXO 1 – Chemical Composition and Biological Activities of Metania and Drulia (Metaniidae) Freshwater Sponges from Amazonia

DOI: 10.1002/cbdv.201900318 FULL PAPER CHEMISTRY & BIODIVERSITY

Chemical Composition and Biological Activities of *Metania* and *Drulia* (*Metaniidae*) Freshwater Sponges from Amazonia

Glaucia Cristina Manço da Costa Bolson,[a] Iuri Bezerra de Barros,[a] Cecília Volkmer-Ribeiro,[b] Josélia Alencar Lima,[c] Tanos Celmar Costa França,[c] Ivanildes Santos,[d] Patrícia Puccinelli Orlandi,[d] and Valdir Florêncio da Veiga-Junior*[a, c]

[a] Department of Chemistry, Institute of Exact Sciences, Federal University of Amazonas, Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200 – Coroado I, Manaus 69067-005, Amazonas, Brazil, e-mail: valdir.veiga@gmail.com
[b] Natural Sciences Museum, Rio Grande do Sul Zoobotanical Foundation, R. Dr. Salvador França, 1427 – Jardim Botânico, Porto Alegre 90690-000, Rio Grande do Sul, Brazil
[c] Department of Chemical Engineering, Military Institute of Engineering – IME, Praça Gen. Tibúrcio, 80 – Urca, Rio de Janeiro 22290-270, Rio de Janeiro, Brazil
[d] Institute Leonidas and Maria Deane – Fiocruz Amazonia, Rua Terezina, 476 – Adrianopolis, Manaus 69057-070, Amazonas, Brazil

Referências

W. Bergmann, R.J. Feeney, 'The isolation of a new thymine pentoside from sponges', *J. Am. Chem. Soc*. **1950**, *72*, 2809-2810.

W. Bergmann, R.J. Feeney, 'Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. I', *J. Org. Chem.* **1951**, *16*, 981-987.

B. Pejin, A. Talevski, A. Ciric, J. Glamoclija, M. Nikolic, T. Talevski, M. Sokovic, 'In vitro evaluation of antimicrobial activity of the freshwater sponge *Ochridaspongia rotunda* (Arndt, 1937)', *Nat. Prod. Res*. **2014**, *28*, 1489—1494.

H. M. Dionisi, M. Lozada, N.L. Olivera, 'Bioprospection of marine microorganisms: biotechnological applications and methods', *Rev. Argent. Microbiol*. **2012**, *44*, 49-60.

M.F. Mehbub, J. Lei, C. Franco, W. Zhang, 'Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: Trends and opportunities for discovery of bioactives', *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 4539-4577.

M. Alghazwi, Y.Q. Kan, W. Zhang, W.P. Gai, X.-X. Yan, 'Neuroprotective Activities of Marine Natural Products from Marine Sponges', *Curr. Med. Chem*. **2016**, *23*, 360-382.

D. Sipkema, M.C.R. Franssen, R. Osinga, J. Tramper, R.H. Wijffels, 'Marine sponges as pharmacy', *Mar. Biotechnol.* **2005**, *7*, 142-162.

I. B. de Barros, C. Volkmer-Ribeiro, V. F. de Veiga Jr., 'Sterols from sponges of Anavilhanas', *Biochem. Syst. Ecol*. **2013**, *49*, 167-171.

I. B. de Barros, E. S. G. D. Santos, D. E. D. Gomes, C. Volkmer-Ribeiro, C. C. Silva, V. F. da Veiga Jr., 'Elemental composition of freshwater sponges *Drulia uruguayensis* and *Drulia cristata* collected in the Tapajós river', *X-Ray Spectrom.* **2013**, *42*, 59-62.

A. Talevska, B. Pejin, T. Beric, S. Stankovic, 'Further insight into the bioactivity of the freshwater sponge *Ochridaspongia rotunda*', *Pharm. Biol*. **2017**, *55*, 1313--1316.

K. Anjum, S. Q. Abbas, S. A. A. Shah, N. Akhter, S. Batool, S. S. ul Hassan, 'Marine sponges as a drug treasure', *Biomol. Ther.* **2016**, *24*, 347-362.

G. Beedessee, A. Ramanjooloo, R. Surnam-Boodhun, R. W. M. Van Soest, D. E. P. Marie, 'Acetylcholinesterase-Inhibitory Activities of the Extracts from Sponges Collected in Mauritius Waters', *Chem. Biodiversity* **2013**, *10*, 442-451.

C. Volkmer-Ribeiro, F. B. D. Almeida, in 'Biotupé: Meio Físico, Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo Rio Negro, Amazônia Central', Ed. E.M. Santos-Silva, INPA Pulisher, Manaus, 2005, Vol. 8, p. 123-134.

C. Volkmer-Ribeiro, V. F. Veiga Jr., D. L. Guadagnin, I. B. Barros, C. C. B. Herzog, 'Composition, distribution and substrates of the sponge fauna (Porifera: Demospongiae) at the National Park of Anavilhanas', *Neotrop. Biol. Conserv.* **2012**, *7*, 188-198.

C. Volkmer-Ribeiro, I. E. D. Drago, V. D. S Machado, M. H. Sabaj, '*Drulia cristinae*, new species of sponge from the rio Xingu, Amazonas Basin, Brazil (Porifera: Demospongiae: Poecilosclerida: Metaniidae Volkmer-Ribeiro, 1986)', *Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia* **2017**, *166*, 1-17.

C. Volkmer-Ribeiro, 'Evolutionary study of the freswhater sponge genus *Metania* Gray, 1867: III. Metaniidae, new family', *Amazoniana* **1986**, *9*, 493-509.

C. Volkmer-Ribeiro, P. R. C. Costa, 'On *Metania spinata* (Carter, 1881) and *Metania kiliani* sp. nov.: Porifera, Metaniidae Volkmer-Ribeiro, 1986', *Amazoniana* **1992**, *12*, 7-16.

V. M. Dembitsky, T. Rezanka, A. G. Kashin, 'Comparative study of the endemic freshwater fauna of Lake Baikal-II. Unusual lipid composition of two sponge species *Baicalospongia bacillifera* and *Baicalospongia* intermedia (family Lubomirskiidae, class Demospongiae)', *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **1993**, *106*, 825-831.

V. M. Dembitsky, A. G. Kashin, M. V. Karaganova, 'Phospholipid and fatty acid composition of the freshwater sponge *Espongilla lacustris* from the volga river estuary', *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **1991**, *100*, 185-187.

V. M. Dembitsky, T. Rezanka, M. Srebnik, 'Lipid compounds of freshwater sponges: family Spongillidae, class Demospongiae', *Chem. Phys. Lipids* **2003**, *123*, 117-155.

V. M. Dembitsky, A. G. Kashin, 'Comparative study of the endemic freshwater fauna of Lake Baikal-VI. Unusual fatty acid and lipid composition of the endemic sponge *Lubomirskia baicalensis* and its amphipod crustacean parasite *Brandtia (Spinacanthus) parasitica*', *Comp. Biochem. Physiol. Part B* **1994**, *109*, 415-426.

V. B. Crist, C. Djerassi, 'Minor and trace sterol in marine invertebrates. A re-investigation of the 19-nor stanols isolated from the sponge *Axinella Polypoides*', *Steroids* **1983**, *42*, 331-343

R. Manconi, V. Piccialli, R. Prozato, D. Sica, 'Steroids in porifera. Sterols from freshwater sponges *Ephydatia fluviatilis* (L.) and *Spongilla lacustris* (L.)', *Comp. Biochem. Physiol.* **1988**, *91*, 237-245.

M. W. Khalil, C. Djerassi, D. Sica, 'Minor and trace sterols in marine invertebrates XVII. 1 (24*R*)-24,26-dimethylcholesta-5,26-dien-3□-ol, a new sterol from the sponge *Petrosia ficiformis'*, *Steroids* **1980**, *35*, 707-719.

V. Piccialli, D. Sica, 'New dihydroxylated sterols from the marine sponge *Spongionella gracilis*', *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 779-783.

V. Piccialli, D. Sica, 'Four new trihydroxylated sterols from the sponge *Spongionella gracilis*', *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 915-920.

C. A. Catalan, J. E. Thompson, W. C. M. C. Kokke, C. Djerassi, 'Biosynthetic studies of marine lipids-3: experimental demonstration of the course of side chain extension in marine sterols', *Tetrahedron* **1985**, *41*, 1073-1084.

L. K. Shubina, T. N. Makareva, V. A Stonik, 'Steroid compounds of marine sponges. III. 24-Ethyl-25-methylcholesta-5,22-dien-3□-ol -- A new marine sterol from the sponge *Halichondria* sp.', *Chem. Nat. Compd.* **1984**, *20*, 438-441.

S. A. Said, M. J. Moshi, R. S. O. Nondo, P. J. Masimba, E. Innocent, A. N. Guantai, 'Evaluation of the potential of the marine sponges of the Zanzibar Island to yield antimalarial and antimicrobial active compounds', *Tanzan J. Health Res.* **2010**, *12*, 195-202.

G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, R.^^M. Featherstone, 'A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity', *Biochem. Pharmacol*. **1961**, *7*, 88-95.

J. A. Lima, R. S. Costa, R. A. Epifânio, N. G. Castro, M. S. Rocha, A. C. Pinto, '*Geissospermum vellosii* stembark: Anticholinesterase activity and improvement of scopolamine-induced memory deficits', *Pharmacol. Biochem. Behav*. **2009**, *92*, 508-513.

W. Trager, J. B. Jensen, 'Human malaria parasites in continuous culture', *Science* **1976**, *193*, 673-675.

D. M. Rabelo, M. L. B Pinheiro, A. Barison, K. S. Salomé, E. V. Costa, F. M. A. Silva, Y. Chaves, I. S. Bastos, 'Isoquinolinic alkaloids and investigation of the antiplasmodic and antibacterial activities of *Guatteria citriodora* (Annonaceae)', *Quim. Nova* **2014**, *37*, 1453-1458.

ANEXO 2 - Freshwater Sponge Sterols



Capítulo

Freshwater Sponge Sterols

Iuri Bezerra de Barros[1],
Glaucia Cristina Manço da Costa Bolson[1]
and Valdir Florencio da Veiga Junior[1,2]
[1]Chemistry Department, Amazonas Federal University,
Manaus, Amazonas, Brazil
[2]Chemical Engineering Department,
Military Institute of Engineering, Rio de Janeiro,
Rio de Janeiro, Brazil

Referências

Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H., Prinsep, M. R. (2015). Marine Natural Products. *Natural Products Reports,* v. 32, p. 116 - 211. doi: 10.1039/C4NP00144C.

Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H. G., Prinsep, M. R. (2017).

Marine Natural Products. *Natural Products Reports*, v. 34, p. 235 - 294. doi: 10.1039/C6NP00124F.

Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H. G., Prinsep, M. R. (2016). Marine Natural Products. *Natural Products Reports,* v. 33, p. 382 - 431. doi: 10.1039/C5NP00156K.

Blunt. J. W., Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A. Prinsep, M. R. (2018). Marine Natural Products. *Natural Products Reports,* v. 35, p. 8 - 53. doi: 10.1039/C7NP00052A.

Bolson, G. C. M. da C., de Barros, I. B., Volkmer-Ribeiro, C., Lima, J. A., França, T. C. C., Santos, I., Orlandi, P. P., da Veiga Junior, V. F. (2019). Chemical composition and biological activities of *Metania* and *Drulia* (Metanidae) Freshwater sponges from Amazonia. *Chemistry and Biodiversity,* v. 16, e1900318. https://doi.org/10.1002/ cbdv.201900318.

Burgoyne, D. L., Andersen, R. J., Allen, T. M. (1992). Contignasterol, a highly oxygenated steroid with the unnatural 14β configuration from the marine sponge Petrosia contignata Thiele, 1899. *The Journal of Organic Chemistry,* v. 57, p. 525 - 528. https://doi.org/10.1021/ jo00028a024.

Carrol, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A., Prinsep, M. R. (2019). Marine Natural Products. *Natural Products Reports,* v. 36, p. 122 - 173. doi: 10.1039/C8NP00092A.

Cheung, R. C. F., Ng, T. B., Wong, J. H. Chen, Y. Chan, W. Y. (2016). Marine natural products with anti-inflamatory activity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* v. 100, p. 1645 - 1666. https://doi.org/10.1007/ s00253-015-7244-3.

de Barros, I. B., Volkmer-Ribeiro, C., da Veiga Junior, V. F. (2015). Sterols and volatile compounds of the freshwater sponge *Trochospongilla paulula* (Bowerbank,

1863). *Química Nova,* v. 38, n. 9, p. 1192 - 1195. http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150134.

de Barros, I. B., Volkmer-Ribeiro, C., da Veiga Junior, V. F. (2013). Sterols from sponges of Anavilhanas. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 49, p. 167 - 171. https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.03.022.

de Goeji, J. M., van den Berg, H., van Oostveen, M. M., Epping, E. H. G., van Duyl, F. (2008). Major bulk dissolved organic carbon (DOC) removal by encrusting coral reef cavity sponge. *Marine Ecology Progress Series,* v. 357, p; 139 - 151. doi: 10.3354/meps07403.

Dembitsky, V. M., Rezanka, T., Srebnik, M. (2003). Lipid compounds of freshwater sponges: family Spongillidae, class Demospongiae. *Chem. Phys. Lipids,* V. 123. p. 117 - 155. doi: 10.1016/S0009-3084(03)00020-3.

Djerassi, C., Silva, C. J. (1991). Sponge sterols: Origin and biosynthesis. *Accounts of Chemical Research*, v. 24, p. 371 - 378.

Gallimore, W. A., Cabral, C., Kelly, M., Scheuer, P. J. (2008). A novel D-ring unsaturated A-nor sterol from the Indonesian sponge, *Axinella carteri* Dendy. *Nat. Prod. Res.,* v. 22, p. 1339 - 1343. doi: 10.1080/ 14786410601132279.

Goad, L. J. (1983). Steroid biochemistry of marine invertebrates. *Marine Chemistry,* v. 12, p. 225.

Gross, H., König, G. (2006). Terpenoids from Marine Organisms: Unique Structures and their Pharmacological Potential. *Phytochemistry Reviews,* v. 5, p. 115 - 141.

Hickman, J. R. C. P., Roberts, L. S., Larson, A. (2000). *Integrated principles of zoology*. 11 ed. Nova York: McGraw-Hill Science. 928.

Hu, J. M., Zhao, Y.-X., Chen, J.-J., Miao, Z.-H., Zhou, J. (2009). A new

spongilipid from the freshwater sponge *Spongilla lacustris*. *Bulletin of the Korean Chemical Society,* v. 30, p. 1170 - 1172.

Jiménez, C. (2018). Marine Natural Products in Medicinal Chemistry. *ACS Medicinal Chemistry Letters,* v. 9, p. 959 - 961. https://doi.org/ 10.1021/acsmedchemlett.8b00368.

Kerr, R. G. et al. (1992). Biosynthetic studies of marine lipids. 38.1 mechanism and scope of sterol side chain dealkylation in sponges: Evidence for concurrent alkylation and dealkylation. *Journal of the American Chemical Society*, v. 114, p. 299 - 303.

Kerr, R. G. et al. (1990). Biosynthetic studies of marine lipids-XXIX. Demonstration of sterol side chain dealkylation using cell-free extracts of marine sponges. *Tetrahedron Letters,* v. 31, p. 5425 - 5428.

Kolesnikova, I. A., Makarieva, T. N., Stonik, V. A. (1992). Natural products from the Lake Baikal organisms - II. Sterols from the sponge *Lubomirskia baicalensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology,* v. 103, p. 501 - 503. https:// doi.org/10.1016/0305-0491(92)90326-M.

Makarieva, T. N., Bondarenko, I. A., Dmitrenok, A. S., Boguslavsky, V. M., Stonik, V. A., Chermih, V. I., Efremova, S. M. (1991). Natural products from lake Baikal organisms, I. Baikalosterol, a novel steroid with an unusual side chain, and other metabolites from the sponge *Baicalospongia bacilifera*. *Journal of Natural Products,* v. 54, p. 953 - 958. https://doi.org/10.1021/np50076a005.

Malik, S., Kerr, R. G., Djerassi, C. (1988). Biosynthesis of marine lipids. 19. Dealkylation of the sterol side chain in sponges. *Journal of the American Chemical Society,* v. 110, p. 6895 - 6897.

Manconi, R., Piccialli, V., Sica, D. (1988). Steroids in porifera, sterols from freshwater sponges Ephydatia fluviatilis (L.) and Spongilla lacustris (L.). *Comparative*

Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and, v. 91, p. 237 - 245. https://doi.org/10.1016/0305-0491(88)90138-1.

Manconi, R., Pronzato, R. (2008). Global diversity of sponges (Porifera: Spongillina) in freshwater. *Hydrobiologia,* v. 595, p. 27 - 33. doi:10.1007/s10750-007-9000-x.

Maquestiau, A., van Haverbeke, Y., Flammang, R, Mispreuve, H. (1978). Study of complex mariena sterol mixtures by mass-analysed ion kinetic energy spectrometry, *Steroids,* v. 2121, p. 31 - 48.

Mazur, A. (1941). 5,6-Dihydrostigmasterol. *Journal of the American Chemical Society,* v. 63, p. 2442 - 2444.

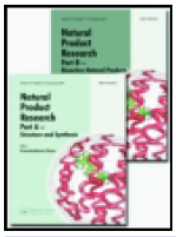
Pereira, F. (2019). Have marine natural product drug discovery efforts been productive and how can we improve their efficiency? *Expert Opinion on Drug Discovery,* v. 14, p. 717 - 722. doi: 10.1080/ 17460441.2019.1604675).

Ruppert, E. E., Fox, R. S., Barnes, R. D. (1996). *Zoologia dos Invertebrados.* 6 ed. São Paulo-SP: Roca, p. 1088.

Van Soest, R. W. M., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Dohrmann, M., Erpenbeck, D., De Voogd, N. J., Santodomingo, N., Vanhoorne, B., Kelly, M., Hooper, J. N. A. (2012). Global Diversity of Sponges (Porifera). *PLoS ONE,* v. 7, e35105. https://doi.org/10.1371/ journal.pone.0035105.

Van Soest, R. W. M., Boury-Esnault, N., Hooper, J. N. A., Rützler, K., de Voogd, N. J., Alvarez, B., Hajdu, E., Pisera, A. B., Manconi, R., Schönberg, C., Klautau, M., Kelly, M., Vacelet, J., Dohrmann, M., Díaz, M.-C., Cárdenas, P., Carballo, J. L., Ríos, P., Downey, R., Morrow, C. C. (2019). *World Porifera Database.* Accessed at http://www.marinespecies.org/porifera on 2019-09-27. doi:10.14284/ 359.

ANEXO 3 - Chemosystematic evaluation of Amazonian Freshwater sponges



Natural Product Research
Formerly Natural Product Letters

ISSN: 1478-6419 (Print) 1478-6427 (Online) Journal homepage: https://www.tandfonline.com/loi/gnpl20

Chemosystematic evaluation of Amazonian freshwater sponges

Glaucia Cristina Manço da Costa Bolson, Ananda da Silva Antonio, Iuri Bezerra de Barros, Gustavo Ramalho Cardoso dos Santos, Henrique Marcelo Gualberto Pereira, Larissa Silveira Moreira Wiedemann & Valdir Florêncio da Veiga-Junior

To cite this article: Glaucia Cristina Manço da Costa Bolson, Ananda da Silva Antonio, Iuri Bezerra de Barros, Gustavo Ramalho Cardoso dos Santos, Henrique Marcelo Gualberto Pereira, Larissa Silveira Moreira Wiedemann & Valdir Florêncio da Veiga-Junior (2020): Chemosystematic evaluation of Amazonian freshwater sponges, Natural Product Research, DOI: 10.1080/14786419.2020.1753736

To link to this article: https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1753736

Referências

Bolson, G. C. M. da C., de Barros, I. B., Volkmer-Ribeiro, C., Lima, J. A., França, T. C. C., Santos, I., ... & da Veiga Junior, V. F. (2019). Chemical composition and biological activities of *Metania* and *Drulia* (Metanidae) Freshwater sponges from Amazonia. *Chemistry and Biodiversity*. Advanced online publication. doi: 10.1002/cbdv.201900318

Capon, R. J., & Faulkner, D. J. (1985). Herbasterol, an Ichthyotoxic 9, 11-Secosterol from the Sponge *Dysidea herbacea*. *Journal of Organic Chemistry* 50(24), 4771–4773.

Dembitsky, V. M., Kashin, A. G., & Karaganova, M. V. (1991). Phospholipid and fatty acid composition of the freshwater sponge *Euspongilla lacustris* from the Volga river estuary. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 100(1), 185-187.

De Barros I. B., Santos, E. S. G. D., Gomes, D. E. D., Volkmer-Ribeiro, C., Silva, C. C., & Veiga Junior, V. F. (2013). Elemental composition of freshwater sponges *Drulia uruguayensis* and *Drulia cristata* collected in the Tapajós river. *X-Ray*

Spectrometry. 42(2), 59–62.

De Barros, I. B., Volkmer-Ribeiro, C., & Veiga Junior, V. F. (2015). Esteróis e constituintes voláteis da esponja dulcícola *Trochospongilla paulula* (BOWERBANK). *Quimica Nova*. 38(9), 1192–1195.

Erpenbeck, D., & Van Soest, R. W. M. (2007). Status and Perspective of Sponge Chemosystematics. *Marine Biotechnology* 9(1), 2–19.

Kokke, W. C. M. C., Tarchini, C., Stierle, D. B., & Djerassi, C. (1979). Isolation, structure elucidation and partial synthesis of xestosterol, biosynthetically significant sterol from the sponge Xestospongia muta. *The Journal of Organic Chemistry*, 44(19), 3385-3388.

Manconi, R., Piccialli, V., Prozato, R., & Sica, D. (1988). Steroids in porifera. Sterols from freshwater sponges *Ephydatia fluviatilis* (L.) and *Spongilla lacustris* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 91b(2), 237–245.

Piccialli, V., & Sica, D. (1987). Four new trihydroxylated sterols from the sponge *Spongionella gracilis*. *Journal of Natural Products.* 50, 915-920.

Talevska, A., Pejin, B., Beric, T., & Stankovic, S. (2017). Further insight into the bioactivity of the freshwater sponge *Ochridaspongia rotunda*. *Pharmaceutical Biology*. 55(1), 1313–1316.

Tam Ha, T. B., Kokke, W. C. M. C., Proudfoot, J. R., Djerassi, C., & Thompson, J. (1985). Minor and Trace Sterols in Marine Invertebrates 53: Further Novel Marine Sterols Resulting from Triple and Quadruple Biomethylation of the Cholesterol Side-Chain. *Steroids* 45(3–4), 263–276.