



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Caracterização metabolómica e determinação da atividade antimicrobiana de extratos de tecidos da estrela-do-mar *Marthasterias glacialis*

Catarina Teixeira Silva

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

(JUNHO, 2021)



INSTITUTO DE HIGIENE E
MEDICINA TROPICAL
DESDE 1902

**Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

Caracterização metabolómica e determinação da atividade antimicrobiana de extratos de tecidos da estrela-do-mar *Marthasterias glacialis*

Catarina Teixeira Silva

Orientador: Ana Maria de Jesus Bispo Varela Coelho

Coorientador: Laidson Paes Gomes

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Ciências Biomédicas

Apoio financeiro do projeto ONEIDA, cofinanciado pela FEEI e dos fundos nacionais da FCT.

Agradecimentos

Ao projeto ONEIDA (LISBOA-01-0145-FEDER-016417) cofinanciado pela FEEI (Fundos Europeus Estruturais e de Investimento) do "Programa Operacional Regional Lisboa 2020" e aos fundos nacionais da FCT (Fundação para a Ciência e a Tecnologia) por terem financiado, parcialmente, os ensaios de LC-MS realizados.

À minha orientadora, Doutora Ana Maria de Jesus Bispo Varela Coelho, pela elevada disponibilidade para discussão e esclarecimento de dúvidas; cedência de bibliografia; apoio incondicional durante todo o estágio e pela revisão do manuscrito.

Ao meu co-orientador, Laidson Paes Gomes, por me ter amparado e ajudado em todo o decorrer do meu estágio; por toda a bibliografia que me facultou; pelo incentivo para a realização deste trabalho e por toda a paciência com que me recebeu.

À Filipa Fernandes, por me passar, amavelmente, todo o seu conhecimento sobre utilização e interpretação dos resultados gerados pelo software Compound Discover 3.1.1.12.

A todos com quem partilhei o laboratório e as bancadas, nomeadamente, à minha gémea de nome Catarina Silva; ao Fábio Giovannercole e ao Luís Gafeira- durante o desenvolvimento deste projeto.

Aos meus pais, irmão, família, namorado e amigos pela constante subida de moral; por serem a minha maior motivação e por me fazerem sempre sorrir.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste estágio curricular, que tem como objetivo a obtenção do grau de mestre, o meu muito obrigada!



Resumo

Os péptidos antimicrobianos, as asterosaponinas e outros metabolitos isolados da estrela-do-mar *Marthasterias glacialis*, apresentam um amplo espectro de bioatividades. Os péptidos antimicrobianos, que podem ser encontrados nos equinodermos, demonstraram atividades inibitórias contra diversas estirpes microbianas. Por outro lado, acredita-se que as asterosaponinas desempenham um papel protetor sobre as estrelas-do-mar, no entanto, as suas funções biológicas continuam a não estar bem estabelecidas e, pensa-se que possam ser elucidadas através de estudos sobre a sua localização, num dado organismo.

Para caracterizar e inferir sobre a atividade antimicrobiana de compostos extraídos da *M. glacialis*, estrela-do-mar abundante na Costa Atlântica Portuguesa, foram analisados, por LC-MS/MS, metabolitos dos componentes do disco central (CDC) e das gónadas (femininas-GF e masculinas-GM).

Foi verificado que os níveis de esteroides polares sulfatados nos extratos (metanólicos-M e aquosos-A) dos órgãos estudados são diferentes e, além das 79 asterosaponinas, foram detetados 10 compostos com atividade antimicrobiana e antibacteriana e 24 compostos com outras propriedades bioativas descritas. Através de LC-MS/MS foram detetados 433 compostos para A-GM; 432 para A-CDC; 430 para M-GM; 427 para M-GF e, por fim, 422 para a amostra A-GF. Foi feita a comparação da composição dos extratos dos diferentes órgãos com a atividade antimicrobiana obtida e deduziu-se que a variabilidade encontrada nos diferentes tecidos pode estar associada a funções biológicas específicas em *M. glacialis*.

Após análise do rastreio de atividade antimicrobiana dos tecidos estudados, concluiu-se que todos inibem o crescimento de *Escherichia coli*. A concentração inibitória mínima foi de 2,5 µg/µL para o extrato aquoso e metanólico das gónadas masculinas; 4,0 µg/µL para o extrato metanólico das gónadas femininas e para o extrato aquoso dos componentes do disco central e 5,0 µg/µL para o extrato aquoso das gónadas femininas. Referente aos ensaios de concentração bactericida mínima, as amostras M-GM e A-GM apresentaram atividade bactericida aos 2,5 e 5,0 µg/µL, respetivamente. As restantes amostras, apresentaram atividade bacteriostática para as concentrações de 4,0 µg/µL M-GF e A-CDC e 5,0 µg/µL para A-GF.

Deste modo, através da comparação das asterosaponinas face ao total de compostos identificados, dos compostos com propriedades bioativas descritas, dos compostos com propriedades antibacterianas e dos metabolitos presentes nos diferentes órgãos da *M. glacialis* acreditamos que estes compostos possam participar em diferentes funções biológicas e que isto possa dever-se às propriedades tóxicas, protetoras ou antimicrobianas destes compostos (Maier, 2008).

Palavras-chave: *Marthasterias glacialis*, gónadas, componentes do disco central, metabolómica, LC-MS/MS, atividade antimicrobiana

Abstract

Antimicrobial peptides, asterosaponins and other metabolites isolated from the starfish *Marthasterias glacialis*, showed a wide spectrum of bioactivities. Antimicrobial peptides, which can be found in echinoderms, have shown inhibitory activities against several antimicrobial strains. On the other hand, it is believed that asterosaponins play a protective role over starfish, however, their biological activities are still not well established and, therefore, it is thought that they can be clarified through studies about their location, in a certain organism.

To predict the antimicrobial activity of extracts from *M. glacialis*, a starfish abundant on the Portuguese Atlantic Coast, characterization of the central disc components (CDC) and from female (GF) and male (GM) gonads were analyzed.

It was found that the levels of sulfated polar steroids in the extracts (methanolic-M and aqueous-A) of the organs studied are different. Also, our study allowed the identification of 79 asterosaponins, 10 compounds with antimicrobial and antibacterial activity and 24 compounds with bioactive properties already reported. Through LC-MS/MS were detected from A-GM, A-CDC, M-GM, M-GF and A-GF, respectively 433, 432, 430, 427 and 422 compounds. The composition among the extracts obtained from the several organs was compared and tentatively correlated with their determined minimum inhibitory concentrations. It was hypothesized that the variability found in the different tissues may be associated with their biological functions in *M. glacialis*.

After the evaluation of the antimicrobial activity of each extract, it was concluded that all compounds showed ability to inhibit *Escherichia coli*. The minimum inhibitory concentration was 2.5 µg/µL for the aqueous and methanolic extracts of male gonads; 4.0 µg/µL for the methanolic extract of the female gonads and for the aqueous extract of the components of the central disc and 5.0 µg/µL for the aqueous extract of the female gonads. Regarding the minimum bactericidal concentrations, the samples M-GM and A-GM showed bactericidal activity with 2.5 µg/µL and 5.0 µg/µL, respectively, and the remaining samples showed bacteriostatic activity at concentrations of 4.0 µg/µL for M-GF and A-CDC and of 5.0 µg/µL for A-GF.

In conclusion, by comparing asterosaponins with the total of compounds identified, compounds with the bioactive properties, compounds with antibacterial properties and other metabolites that were found in different organs of *M. glacialis*, we believe that these compounds may participate in different biological functions, and that this may be due to the toxic, protective or antimicrobial properties of these compounds (Maier, 2008).

Keywords: *Marthasterias glacialis*, gonads and central disc components, metabolomics, LC-MS/MS, antimicrobial activity

Índice Geral

1. Introdução Teórica.....	1
1.1 O Oceano e a sua biodiversidade	1
1.2 Filo Equinodermata.....	2
1.3 Classe asteroidea: superfície oral, aboral e estrutura interna	4
1.4 <i>Marthasterias glacialis</i>	5
1.5 Compostos com possível atividade antimicrobiana: Compostos bioativos, aterosaponinas e Péptidos antimicrobianos	7
1.6 Resistência a fármacos e novas alternativas na indústria farmacêutica	11
2. Métodos Analíticos	12
2.1 Cromatografias: líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) e Extração em fase sólida (SPE)	12
2.2 Princípios básicos da espectrometria de massa.....	14
3. Objetivo de estudo	17
4. Materiais e Métodos.....	18
4.1 Espécie em estudo - <i>Marthasterias glacialis</i>	18
4.2 remoção das gónadas e dos componentes do disco central.....	19
4.3 Extração metanólica dos componetes presentes nas Gónadas Masculinas, Femininas e Componentes do Disco Central.....	20
4.4 Extração em fase sólida (SPE) das GM, GF e CDC	21
4.5 Preparação do extrato metanólico e aquoso das gónadas e dos componentes do disco central.....	21
4.6 Ensaio de bioatividade: determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)	22
4.7 Análise por espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF	23

4.8 Análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS)	24
5. Resultados e discussão	29
5.1 Extração dos compostos presentes no disco central, gónadas masculinas e femininas	29
5.2 <i>Screening</i> preliminar por MALDI-TOF/TOF e Análise por LC-MS/MS, para caracterização dos extratos de CDC, GF e GM	30
5.3 Caracterização geral dos extratos e dos vários tecidos/órgãos estudados	32
5.4 Caracterização dos extratos e dos vários tecidos/órgãos estudados quanto à presença de asterosaponinas e de compostos com propriedades antimicrobianas e antibacterianas	35
5.5 Ensaio de bioatividade: concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)	39
5.6 Correlação da quantificação relativa dos compostos presentes nos vários extratos e tecidos e correlação com o seu potencial antibacteriano	41
6. Conclusão	47
7. Referências bibliográficas	49
8. Anexos	55

Índice de Figuras

Figura 1: As cinco classes do filo Equinodermata.....	3
Figura 2: Representação das superfícies aborais (a) e orais (b) de <i>Asterias vulgaris</i> . Estrutura interna (c) e secção transversal do braço com o respetivo sistema hidrovascular....	4
Figura 3: <i>Marthasterias glacialis</i>	5
Figura 4: <i>Marthasterias glacialis</i> alimentando-se de mexilhão.....	6
Figura 5: Aglicona da molécula de Asterosaponina, onde R1 corresponde à cadeia oligossacárida com 5 ou 6 resíduos glicosídicos e R2 à cadeia lateral alifática.....	8
Figura 6: Estrutura molecular relativa de glicosídeos de polihidroxiesteroides.....	9
Figura 7: Procedimento experimental da extração em fase sólida.....	13
Figura 8: Fluxograma do trabalho experimental realizado. Procedimentos aplicados às amostras de gónadas masculinas (GM), gónadas femininas (GF) e componentes do disco central (CDC) obtidos de <i>M. glacialis</i>	18
Figura 9: Órgãos de <i>Marthasterias glacialis</i> utilizados no estudo.....	19
Figura 10: Extrato CHCl ₃ : MeOH: H ₂ O (100:45:20) após centrifugação onde é possível verificar que existe separação de fases. A fase superior do tubo (esbranquiçada) é composta por MeOH:H ₂ O e a inferior (translúcida) CHCl ₃	21
Figura 11: <i>Workflow</i> utilizado no pré-processamento dos dados LC-MS/MS no software Compound Discoverer 3.1.1.12.....	26
Figura 12: Diagrama de Venn representativo do total de compostos identificados nos três órgãos/tecidos, para os dois extratos analisados.	32
Figura 13: Total: de compostos identificados; de asterosaponinas e de compostos com atividade antimicrobiana e antibacteriana.....	37
Figura 14: Diagrama de Venn representativo das asterosaponinas e compostos com atividade antimicrobiana e antibacteriana reportada, identificados em cada órgão/tecido.....	37

Índice de Tabelas

Tabela 1: Preparação das amostras para ensaio LC-MS/MS.....	24
Tabela 2: Sistema de gradiente utilizado na cromatografia de fase reversa acoplada a MS.....	25
Tabela 3: Massa dos tecidos, massas dos extratos e rendimento final da extração....	29
Tabela 4: Compostos identificados por LC-MS/MS, em modo positivo e negativo para dois intervalos m/z	31
Tabela 5: Compostos que apresentam propriedades bioativas, excluindo os compostos com propriedades antibacterianas, descritas na literatura	34
Tabela 6: Compostos com propriedades antimicrobianas e antibacterianas identificados nos vários tecidos, de acordo com as bases de dados ChemSpider (1) e PubChem (2).....	36
Tabela 7: Compilação dos resultados da concentração inibitória mínima (CIM), respectivas médias de inibições das três réplicas biológicas e desvio padrão (SD) ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (%) e concentração bactericida mínima (CBM).....	40
Tabela 8: Lista das 15 asterosaponinas mais abundantes, encontradas nos dois tipos de extrato (A e M) e nos tecidos/órgãos (GM, GF, CDC), e respetivo somatório dos valores de área normalizada.....	43
Tabela 9: Compostos com propriedades antibacterianas e antimicrobianas e respetivos valores de área cromatográfica normalizada.....	45
Anexo 1: Mass List com a fórmula molecular de 286 asterosaponinas conhecidas.....	55
Anexo 2: m/z dos iões moleculares detetados pelo MALDI-TOF/TOF.....	62
Anexo 3: Quantificação dos compostos detetados nos órgãos GM; GF e CDC do extrato aquoso e GF e GM do extrato metanólico.....	65

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

ACN: Acetonitrilo

AF: Ácido fórmico

***m/z*:** Razão massa carga

MS: Espetrometria de massa (Do inglês: Mass Spectometry)

AMR: Resistência Antimicrobiana (Do inglês: Antimicrobial Resistance)

SPE: Extração em fase sólida ((Do inglês: Solid Phase Extration)

MDRO: Organismos multirresistentes (Do inglês: Multidrug-Resistance Organisms)

XDR: Bactéria extensivamente resistente (Do inglês: Extensively Drug Resistant Bacteria)

PDR: Bactéria resistente a todos os antimicrobianos que foram rotineiramente testados (Do inglês: Pandrug-Resistant)

AMP: Péptidos antimicrobianos (Do inglês: Antimicrobial Peptides)

TOF: Tempo de voo (Do inglês: Time Of Flight)

ESI: Ionização por Electrospray (Do inglês: Electrospray Ionization)

MALDI: Ionização e desadsorção a laser assistida por matriz (Do inglês: Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization)

CID: Dissociação induzida por colisão (Do inglês: Collision-Induced Dissociation)

1. INTRODUÇÃO TEÓRICA

1.1 O OCEANO E A SUA BIODIVERSIDADE

O oceano cobre cerca de 70% da superfície da Terra. Apesar de ser um recurso ainda pouco explorado, é responsável por hospedar uma grande diversidade de organismos vivos que biossintetizam compostos bioativos de interesse para a indústria farmacêutica (Carvalho *et al.*, 2018; Nalini *et al.*, 2018).

Nos ecossistemas marinhos podemos encontrar uma enorme variedade de biomoléculas que apresentam as mais diversas atividades biológicas, entre elas: anticancerígenas, antifúngicas, antibacterianas, antioxidantes, antivirais, anti-inflamatórias e analgésicas. Contudo, para a maioria e como se trata de uma área em desenvolvimento, as suas aplicações farmacológicas ainda não foram detalhadamente caracterizadas (Nalini *et al.*, 2018).

O ecossistema marinho é composto por diversas plantas; invertebrados (como por exemplo, a estrela-do-mar *Marthasterias glacialis*) e vertebrados que são ricos em diversos compostos bioativos (peptídeos, terpenos, alcaloides e proteínas), nomeadamente antimicrobianos (Nalini *et al.*, 2018).

O filo Equinodermata, em particular, a classe *Asteroidea*, tem vindo a ser largamente estudada nas últimas cinco décadas devido às bioatividades dos seus compostos (Nalini *et al.*, 2018).

Vários estudos têm provado que, os metabolitos da classe *Asteroidea* são uma fonte promissora de agentes antibacterianos contra várias estirpes resistentes a microrganismos patogénicos pelo que a descoberta de novos antibacterianos é crucial para o desenvolvimento de novos fármacos (Beaver *et al.*, 1967; Carvalho *et al.*, 2018; Nalini *et al.*, 2018).

1.2 FILO EQUINODERMATA

A palavra equinodermo provém da junção das palavras gregas *echinos* e *derma* que, traduzidas à letra, significam pele espinhosa. Esta designação foi utilizada inicialmente para descrever os ouriços-do-mar, conhecidos pelos espinhos que revestem o seu exosqueleto (Muller, 2005). Cada vez mais têm surgido estudos com equinodermos devido ao seu amplo registo fóssil, que remonta ao Pré-Cambriano; à sua importância ecológica, no ambiente marinho, à fácil manipulação dos seus embriões; à interessante morfologia dos organismos adultos e ao seu poder regenerativo (Beaver *et al.*, 1967); (Matranga, 2005).

Os equinodermos são invertebrados marinhos que habitam desde as águas mais profundas até à zona entre marés e o seu ciclo de vida é, geralmente, complexo. De um modo resumido, apresentam sexos separados; não têm dimorfismo sexual evidente e a sua reprodução é normalmente obtida por fertilização externa contudo, também pode ocorrer por reprodução assexuada (Ruppert *et al.*, 1996).

As características dos equinodermos distinguem-nos dos restantes animais marinhos. Entre elas não possuem coluna vertebral nem cérebro (por isso, o sistema nervoso coordena os movimentos dos pés ambulacrários que são pequenas projeções tubulares); são triblásticas (ou seja, possuem três tipos de tecidos: ectoderme, mesoderme e endoderme); são celomadas (pois possuem uma cavidade embrionária preenchida por fluído coelómico e revestida pela mesoderme) e deuterostómios (o blastóporo origina, primeiramente, o ânus e só depois a boca); por apresentarem simetria radial pentâmera (o corpo é dividido em cinco partes organizadas em torno de um eixo central); possuem esqueleto interno (endosqueleto) de origem mesodérmica e, por fim, a característica que mais distingue os equinodermos dos demais animais marinhos é o facto de possuírem um exclusivo sistema de canais coelómicos e apêndices superficiais compondo o sistema hidrovascular ou ambulacrário (Smith *et al.*, 2018); (Ruppert *et al.*, 1996).

Atualmente, estima-se que existiram cerca de 13.000 espécies de equinodermos, 7.000 das quais correspondem à classe *Asteroidea* Estas subdividem-se em cinco classes (Smith *et al.*, 2018) (**Figura 1**):

1. INTRODUÇÃO TEÓRICA

- *Crinoidea* (lírios-do-mar) - alimentam-se de plâncton e de detritos colhidos pelos seus tentáculos e dirigidos à boca, pelos cílios;
- *Echinoidea* (ouriços-do-mar) - corpo arredondado sem braços coberto por espinhos delgados e móveis;
- *Ophiuroidea* (estrelas-do-mar comumente apelidadas de serpentes-do-mar) - não possuem ânus e alimentam-se de detritos, pequenos crustáceos e moluscos;
- *Holothuroidea* (pepinos-do-mar) - movem-se como lesmas no fundo do mar;
- *Asteroidea* (estrelas-do-mar) - inclui cerca de 1.500 espécies, tipicamente pentâmeras e os seus braços são projetados a partir de um disco central.



Figura 1: As cinco classes do filo Echinodermata. Imagem adaptada de <http://ppcczoologia.blogspot.com/2014/11/filo-echinodermata.html>.

Existem algumas características que tornam os equinodermos um interessante alvo de estudo, entre eles: a capacidade regenerativa apresentada nas espécies *Ophiuroidea*, *Asteroidea*, *Holothuroidea* e *Crinoidea* (Carnevali *et al.*, 2001) e, por outro lado, a elevada atividade antimicrobiana encontrada em compostos bioativos presentes nos equinodermos. Elevada atividade antimicrobiana foi encontrada, por exemplo, em órgãos gastrointestinais e em ovos da estrela-do-mar *Asterias rubens* (Haug *et al.*, 2002) e, também, em ovos do pepino do mar *Cucumaria frondosa* (Haug *et al.*, 2002).

1.3 CLASSE ASTEROIDEA: SUPERFÍCIE ORAL, ABORAL E ESTRUTURA INTERNA

As estrelas-do-mar foram assim denominadas por possuírem cinco braços, o que faz lembrar a forma de uma estrela. Estas predadoras carnívoras contêm um endosqueleto subepidérmico de carbonato de cálcio (calcita) que compreende uma série de ossículos produzidos pela mesoderme (Aparecida dos Santos, 2010).

O ânus encontra-se na superfície aboral (**Figura 2a**) e nas proximidades da madreporita (placa porosa responsável por fazer a comunicação entre o sistema ambulacrário e o meio externo) e a boca encontra-se no centro da superfície oral (**Figura 2b**). O sulco ambulacrar (**Figura 2b**) contém duas ou quatro fileiras de projeções tubulares chamadas pés ambulacrários (órgãos locomotores) que fazem parte do sistema hidrovacular (**Figura 2c**). Este sistema hidrovacular é composto por um sistema de canais e apêndices que derivam do celoma e auxiliam na locomoção. O sistema hidrovacular é revestido por um epitélio ciliado, o celoma e, preenchido por fluído celómico, semelhante à água do mar, que tem, em circulação, proteínas, vários morfotipos celulares e elevado teor em potássio (Castro *et al.*, 2003). As pápulas são pequenas evaginações respiratórias que se encontram na superfície aboral e que se projetam da cavidade do corpo e, ao redor destas, encontram-se as pedicelárias em forma de pinça, que mantêm a superfície do corpo limpa e, auxiliam na captura de alimento. Este inclui ostras, moluscos, crustáceos, vermes tubícolas e outros equinodermes que serão digeridos com o auxílio de enzimas por digestão externa. (Fish *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2003).

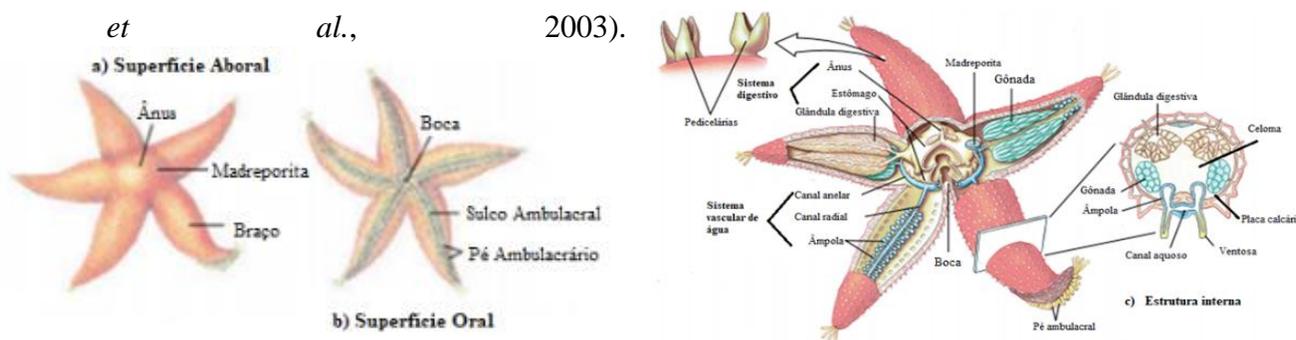


Figura 2: Representação das superfícies aborais (a) e orais (b) de *Asterias vulgaris*. Estrutura interna (c) e secção transversal do braço com o respetivo sistema hidrovacular. Imagem adaptada de Castro *et al.*, 2003.

1.4 *MARTHASTERIAS GLACIALIS*

Segundo Caroli Linnaei (Linnae, 1758), a espécie *Marthasterias glacialis* (Linnaeus, 1978) (**Figura 3**), pertence ao/à:

Reino: Animalia

Filo: Equinodermata

Sub-filo: Asterozoa

Classe: *Asteroidea*

Super-ordem: *Forcipulatacea*

Ordem: Forcipulatida

Família: Asteriidae

Género: *Marthasterias*

Espécie: *Marthasterias glacialis*



Figura 3: *Marthasterias glacialis*. Imagem adaptada de <http://www.european-marine-life.org/30/marthasterias-glacialis.php>

A superfície dorsal desta espécie é óssea, coberta por espinhos e calcificada, o que lhe confere alguma proteção contra os predadores. Podem apresentar diversas cores que, por um lado, as protegem contra-ataques de possíveis agressores e, por outro, as camuflam da restante vida marinha (Ruppert *et al.*, 1996; Sartore, 2015). Quando chegam à forma adulta atingem, em média, um diâmetro de trinta a quarenta centímetros podendo chegar até aos oitenta centímetros (Fish *et al.*, 2011).

A *M. glacialis* encontra-se distribuída por todo o nordeste da Europa e é, essencialmente, uma espécie sub-litoral. É na proximidade das rochas que encontra presas como mexilhões (**Figura 4**) ou, em profundidade que encontra ouriços do mar, moluscos bivalves, crustáceos, peixes e outras estrelas-do-mar, das quais se irá alimentar (Fish *et al.*, 2011). Na **Figura 4** está ilustrado o processo de digestão externa de *M. glacialis* onde, com o auxílio dos seus pés ambulacrários força a abertura da concha do mexilhão e projeta o seu estômago para o exterior, libertando

uma série de enzimas digestivas sobre o alimento que será, em seguida, absorvido (Fish *et al.*, 2011).



Figura 4: *Marthasterias glacialis* alimentando-se de mexilhão (imagem original).

O processo regenerativo de *M. glacialis* é complexo e lento, podendo variar entre quinze a vinte semanas para regenerar completamente uma ponta do braço perdida ou, até vários meses no caso de um braço autotomizado (Fish *et al.*, 2011).

No final da década de 1940, várias espécies de estrelas do mar foram estudadas pela primeira vez devido à presença de glicosídeos esteroides, uma classe de metabolitos secundários que se encontra distribuído pelo corpo das estrelas do mar (Dong *et al.*, 2011).

M. glacialis tem vindo a despertar cada vez mais interesse pelos seus processos regenerativos, mas também pelos compostos com propriedades antimicrobianas, presentes nos seus órgãos (Dini *et al.*, 1983; Laires, 2012; Stabili *et al.*, 1994).

1.5 COMPOSTOS COM POSSÍVEL ATIVIDADE ANTIMICROBIANA: COMPOSTOS BIOATIVOS, ASTEROSAPONINAS E PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS

Os Equinodermos possuem várias moléculas bioativas, entre elas saponinas. Estes compostos naturais foram inicialmente descobertos em plantas e, posteriormente, encontradas em diferentes organismos marinhos, como nas estrelas-do-mar, nos pepinos-do-mar e em esponjas (Andersson *et al.*, 1989; Claereboudt *et al.*, 2019; Iorizzi *et al.*, 2001).

Nas estrelas do mar foram identificados diferentes tipos de saponinas que, por apresentarem uma conformação estrutural diversificada, foram agrupadas em três grupos distintos: glicosídeos esteroides sulfatados (penta ou hexaglicosídeos) denominadas "asterosaponinas"; glicosídeos cíclicos esteróides encontrados em estrelas-do-mar do género *Echinaster* e, glicosídeos de poli-hidroxiesteroides, um esterol poli-hidroxlado com uma ou duas unidades de ose (Andersson *et al.*, 1989; Riccio *et al.*, 1986).

As asterosaponinas, têm características estruturais comuns que incluem a fração aglicona ($\Delta^{9(11)}$ - $3\beta,6\alpha$ -dioxigenado-23-oxosteroidal), uma componente oligossacarídea composta por cinco a seis unidades de oses ligadas ao C₆, um grupo sulfato no C₃ e, frequentemente, uma função oxo em C₂₃, na cadeia lateral da aglicona (**Figura 5**) (Demeyer *et al.*, 2014). Existem semelhanças entre os grupos oligossacarídeos das asterosaponinas: as ligações interglicosídeas são invariáveis e, a posição da unidade ramificada está localizada na segunda unidade do monossacarídeo a partir da aglicona. Os monossacarídeos encontram-se sempre na forma piranose com configuração β -anomérica (α para L-arabinose). Os mais comuns são β -D-fucopiranose, β -D-quinovopiranose, β -D-xilopiranose, β -D-galactopiranose e β -D-glucopiranose; já a 6-desoxi-xilo-hex-4-ulose (DXHU) e a α -L-arabinopiranose estão presentes com menos frequência. As asterosaponinas apresentam massas moleculares de cerca de 1500 Da (Riccio *et al.*, 1986).

Sabe-se que as asterosaponinas exibem várias atividades biológicas (Iorizzi *et al.*, 2001; Matranga, 2005) incluindo, efeitos citotóxicos (Hasaimoto *et al.*, 1960; Iorizzi *et al.*, 2001; Mackie *et al.*, 1976; Minale *et al.*, 1993; Rio *et al.*, 1965), hemolíticos (Mackie *et al.*, 1976; Rio *et al.*, 1965; Prokof *et al.*, 2003), anti-neoplásicos/anti-cancerígenos (Dubois *et al.*,

1988; Iorizzi *et al.*, 2001; Kicha *et al.*, 2010; Malyarenko *et al.*, 2014), anti-inflamatórios (Matranga, 2005), antibacterianos (Andersson *et al.*, 1989; Haug *et al.*, 2002; Iorizzi *et al.*, 2001; Stabili *et al.*, 1996), antivirais (Iorizzi *et al.*, 2001; Shimizu, 1969), analgésicos (Matranga, 2005) e antifúngicos (Abraham *et al.*, 2002; Matranga, 2005). Contudo, o conhecimento das suas funções biológicas no organismo de origem é, ainda, limitado. Para se conseguir perceber a função biológica destes compostos bioativos é necessário recolher informações sobre a sua distribuição corporal, em particular nas estrelas-do-mar, uma vez que se supõe que a sua atividade possa estar relacionada com a sua localização em determinado órgão/tecido (Prokof *et al.*, 2003; Popov *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2006).

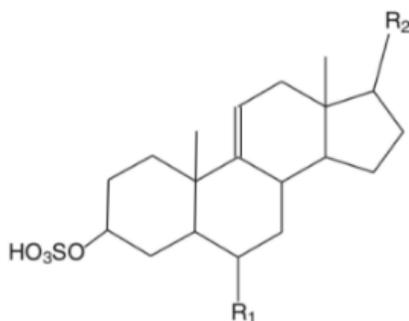


Figura 5: Aglicona da molécula de Asterosaponina, onde R1 corresponde à cadeia oligossacárida com 5 ou 6 resíduos glicosídicos e R2 à cadeia lateral alifática (Demeyer *et al.*, 2014).

Os glicosídeos cíclicos esteroides são desprovidos de grupo sulfato e incluem um $\Delta^{7-3\beta,6\beta}$ -núcleo esteroide desoxigenado e uma fração de trissacarídeo cíclico que liga o C₃ e átomos C₆ do esteróide. Estes são predominantes nas estrelas do mar e são responsáveis pela sua toxicidade (Ivanchina *et al.*, 2017; Kicha *et al.*, 2010; Malyarenko *et al.*, 2014).

Os glicosídeos de poli-hidroxiesteroides (**Figura 6**) apresentam as mais variadas estruturas e subdividem-se em, pelo menos, três subgrupos que incluem os glicosídeos que possuem agliconas esteroides compostas por C₂₇, C₂₈ e C₂₉. Estes compostos, que podem ser encontrados nas formas sulfatada e não sulfatada, ocorrem geralmente em pequenas quantidades e são apresentados por resíduos β -D-xilopiranosil e α -L-arabinofuranosil ou os seus derivados metilados ou sulfonados (Ivanchina *et al.*, 2017). Incluem frequentemente

esteroides altamente hidroxilados que contêm cinco a nove grupos hidroxilo (Riccio *et al.*, 1986).

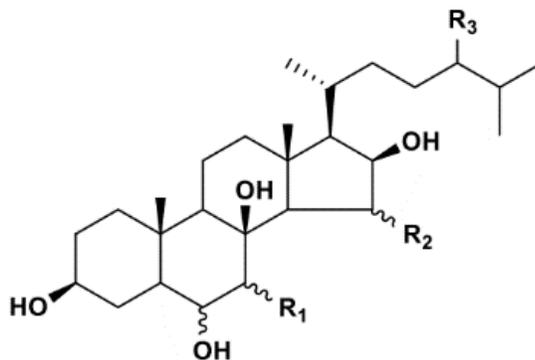


Figura 6: Estrutura molecular de glicosídeos de polihidroxiesteroides (Popov *et al.*, 2019).

Segundo Nalini *et al.*, 2018, foi identificada atividade antibacteriana para várias moléculas presentes em Equinodermos, nomeadamente, em tecidos contendo células em circulação (fluido celómico).

No estudo publicado por Popov *et al.* (2019), foram identificadas e quantificadas as asterosaponinas em diferentes órgãos/tecidos da estrela-do-mar *Lethasterias fusca*. Os esteroides polares sulfatados foram identificados nos tecidos: da parede do corpo da estrela-do-mar, gónadas, estômago, ceco pilórico e fluido celómico e foi notório que existe uma distribuição qualitativa e quantitativa variada de esteroides polares presentes nos diferentes tecidos analisados. Em *L. fusca*, 97% dos esteroides polares são encontrados no estômago e foram identificados, maioritariamente, como asterosaponinas e agliconas nativas de asterosaponinas (Popov *et al.*, 2019). Por outro lado, o fluido celómico foi o componente do corpo da estrela-do-mar *L. fusca* que apresentou menor concentração de asterosaponinas (Popov *et al.*, 2019). Estas diferenças na distribuição das asterosaponinas foi associada à sua função protetora, nomeadamente contra predadores, principal função biológica destes glicosídeos esteroides sulfatados (Popov *et al.*, 2019). Além disso, sugere-se que asterosaponinas possam estar envolvidas em processos de reprodução e em sinalização química interespecífica (Popov *et al.*, 2019).

1. INTRODUÇÃO TEÓRICA

Os péptidos antimicrobianos (AMP), que têm massas moleculares inferiores a 10 kDa (cerca de 100 aminoácidos), podem exibir atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* e fazem parte do sistema imunitário inato, onde participam na neutralização e eliminação de microrganismos patogénicos (Arizza *et al.*, 2016). Encontram-se distribuídos por todos os reinos, tanto dentro dos organismos unicelulares como multicelulares, o que sugere que desempenham um papel importante e essencial nestes organismos. Como os invertebrados dependem, exclusivamente, da imunidade inata para combater agentes infecciosos, acredita-se que os seus mecanismos imunológicos incluam moléculas com ação inibidora rápida do crescimento microbiano (Arizza *et al.*, 2016; Sperstad *et al.*, 2011).

Nos equinodermos, os AMP's foram identificados, por exemplo, no fluído celómico do pepino do mar *Cucumaria frondosa* (onde foi detetada atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas), no extrato de celomócitos de *Asterias rubens* e, também, em *Holothuria scabra*- que possui aglutinina, que permite aglutinar e matar bactérias gram-positivas e gram-negativas *in vivo* e *in vitro*. No caso específico de *Marthasterias glacialis*, foram identificados péptidos antimicrobianos nos seus ovos e na parede celular (Li *et al.*, 2010). Embora estas investigações preliminares envolvam algumas espécies de equinodermos, os resultados sugerem que estes merecem mais atenção uma vez que, podem ser fontes de identificação de novos compostos bioativos (Arizza *et al.*, 2016).

Segundo o estudo de Arizza *et al.* (2016), o sistema imunológico de equinodermos foi examinado (nomeadamente, o do ouriço-do-mar *Paracentrotus lividus* e do pepino-do-mar *Holothuria tubulosa*) e identificaram novos péptidos que demonstraram atividade contra bactérias com capacidade de produzir biofilme. Esta atividade pode inibir os patógenos responsáveis por doenças infecciosas em humanos e animais, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ou *Pseudomonas aeruginosa* (Arizza *et al.*, 2016). Deste modo, os AMP's são fortes candidatos no combate à formação do biofilme, pois são capazes de inibir o crescimento bacteriano.

1.6 RESISTÊNCIA A FÁRMACOS E NOVAS ALTERNATIVAS NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA

A descoberta dos antibióticos possibilitou o controle das infecções bacterianas, dando-nos qualidade de vida e de saúde. Os antibióticos podem atuar especificamente sobre bactérias gram positivas e/ou negativas e, normalmente, não afetam células e tecidos humanos (Skold, 2011). Estes agentes químicos são usados com tanta frequência que a sua eficiência se encontra ameaçada a longo prazo (Drlica *et al.*, 2011).

As doenças infecciosas causadas por bactérias encontram-se no topo da pirâmide das principais causas de morte a nível mundial (OMS, 2020). O amplo uso e abuso de antibióticos tem vindo a contribuir para o desenvolvimento de bactérias resistentes e multirresistentes a estes fármacos (Chen *et al.*, 2014). As bactérias multirresistentes (MDRO) referem-se à resistência a mais do que um agente antimicrobiano; bactérias extensivamente resistentes (XDR ou PDR) aludem à resistência a todos os agentes antimicrobianos, contudo, como teoricamente é pouco provável ser-se resistente a toda a classe de agentes antimicrobianos, existem outras designações como: “resistentes a quase todos os antimicrobianos disponíveis no mercado” ou “resistentes a todos os antimicrobianos que foram rotineiramente testados” (Magiorakos *et al.*, 2011; Kon *et al.*, 2016). Estima-se que a maioria das infecções hospitalares são causadas por bactérias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Micobacterium tuberculosis*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella spp* (Simões, 2016).

As bactérias multirresistentes são um grande desafio para o controle eficaz de infecções bacterianas e, esta ameaça impulsionou a criação e o desenvolvimento de estratégias alternativas para tratar doenças bacterianas como por exemplo: usando derivados de plantas com potencial antimicrobiano ou recorrendo a compostos bioativos marinhos provenientes de equinodermos (Chen *et al.*, 2014; Kon *et al.*, 2016). Metabolitos secundários de alcalóides, exo-polissacarídeos de bactérias marinhas e fenóis presentes nas esponjas podem tornar-se uma alternativa para a prevenção e controle da resistência microbiana. Estes podem biossintetizar uma grande variedade de metabolitos secundários com várias propriedades bioativas (nomeadamente, antibacterianas) (Bejenaru *et al.*, 2016).

2. MÉTODOS ANALÍTICOS

2.1 CROMATOGRAFIAS: LÍQUIDA ACOPLADA À ESPETROMETRIA DE MASSA (LC-MS) E EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)

A cromatografia (e, no caso particular desta tese de mestrado, a cromatografia líquida) é uma metodologia que tem sido aplicada, com sucesso, para a análise de compostos bioquímicos, orgânicos e inorgânicos e, para separação de proteínas e peptídeos com base na sua polaridade e na sua interação com a fase estacionária. A amostra é injetada numa coluna e percorre duas fases: uma móvel (solvente, que se move ao longo da coluna para transportar, diferencialmente, os compostos presentes na amostra) e uma estacionária (sendo a mais comum e altamente apolar a sílica modificada com cadeia de carbono n-octadecil C₁₈). (Herbert *et al.*, 2003; Silva, 2012).

As vantagens das cromatografias líquidas incluem a elevada especificidade; a possibilidade de uso de quantidades diminutas de amostra; a rapidez do ensaio e o facto de fornecer informação qualitativa e quantitativa quando acopladas a métodos de deteção adequados (Finoulst *et al.*, 2011).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) permite a separação de misturas não voláteis; a deteção de compostos em amostras complexas e a caracterização/identificação dos compostos nela presentes. Na separação em fase reversa, que foi a utilizada nesta tese de mestrado, a fase estacionária é apolar e no caso de se utilizar um gradiente, a polaridade da fase móvel vai aumentando ao longo da corrida cromatográfica, portanto, os compostos polares são eluídos em primeiro lugar e os mais apolares eluídos posteriormente (Herbert *et al.*, 2003; Westman-Brinkmalm *et al.*, 2009). Um sistema LC-MS contém uma interface que transfere, de forma eficiente, os componentes separados da coluna LC para a fonte de iões MS. Assim, e de um modo resumido, num LC-MS, a mistura de componentes é injetada no sistema cromatográfico líquido e os seus componentes são separados, devido a forças de interação diversas com a coluna cromatográfica (este processo “competitivo” depende da afinidade do analito com as fases móvel e estacionária). As moléculas eluídas são, sequencialmente, introduzidas num espectrómetro de massa, onde os espectros de massa são adquiridos para os componentes separados (Herbert *et al.*, 2003).

A extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) é, também, um tipo de cromatografia líquida (de baixa pressão) e está disponível comercialmente desde 1978 (Jardim, 2010). Visa a separação líquido-sólido e, nesta tese de mestrado, foi utilizado também um mecanismo de retenção de fase reversa, com o objetivo de simplificar e fracionar matrizes de amostra complexas e reduzir a supressão de iões, em aplicações de espectrometria de massa (Caldas *et al.*, 2011; Chemistry, 2019; Zdravkovic, 2017). Para que seja realizada com sucesso, deve ser tida em consideração a escolha do solvente para ativação dos cartuchos e para a eluição dos analitos, bem como o volume de amostra injetado (Caldas *et al.*, 2011).

Em SPE de fase reversa, a extração ocorre em quatro etapas: a primeira etapa consiste no condicionamento (**Figura 7, Ponto 1**) da fase estacionária com um pequeno volume de solvente orgânico miscível em água (exemplo: metanol e acetonitrilo), para humedecer esta fase, seguido de uma solução aquosa para ajustar as forças do solvente de eluição com as do solvente da amostra. Uma vez condicionada, a amostra flui ao longo da fase estacionária (**Figura 7, Ponto 2**). O tempo de interação da amostra com a fase estacionária deve ser suficiente para que o analito fique retido na resina cromatográfica. Segue-se a etapa de lavagem (**Figura 7, Ponto 3**), onde serão eliminados compostos que não possuem afinidade com a matriz cromatográfica. De seguida, é efetuada a eluição dos analitos retidos por adição de um pequeno volume de solvente à fase estacionária (**Figura 7, Ponto 4**) (Caldas *et al.*, 2011; Thurman *et al.*, 1998; Zdravkovic, 2017).

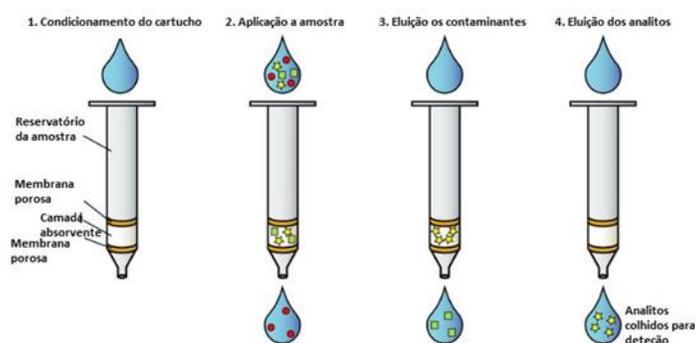


Figura 7: Procedimento experimental da extração em fase sólida. Imagem adaptada de Caldas *et al.*, 2011.

2.2 PRÍNCIPIOS BÁSICOS DA ESPETROMETRIA DE MASSA

A espectrometria de massa é uma metodologia analítica que detecta iões e os quantifica após separá-los de acordo com a sua razão massa/carga (m/z). Permite assim a determinação das massas do ião molecular e dos iões fragmento com elevada exatidão, apresenta elevada sensibilidade de deteção para compostos iónicos ou ionizáveis ao nível do atomol e zeptomol. Pode ser aplicada a uma grande variedade de amostras, independentemente da sua volatilidade e polaridade - desde que sejam ionizáveis. Combinada com outras técnicas de separação de alta resolução, qualifica-se para analisar amostras complexas (Dass, 2001). A configuração básica de um espectrómetro de massa inclui (Dass, 2001):

- Uma entrada para introdução da amostra, na fonte de ionização;
- Um sistema de vácuo (10^{-4} - 10^{-8} torr) que permite que os iões se movimentem livremente no espaço, sem colidir ou interagir com outras espécies;
- Uma fonte de ionização que converte as moléculas da amostra em iões em fase gasosa. Nesta tese foram utilizadas as fontes de ionização MALDI e ESI;
- Um analisador de massa que separa as espécies iónicas de acordo com o valor m/z . Nesta tese foram utilizados: o analisador de alta resolução- Orbitrap; de baixa resolução- Quadrupolo (Q) e dois analisadores com base no tempo de voo (TOF);
- Um detetor que mede a abundância dos iões;
- Um sistema eletrónico que controla a operação de várias unidades;
- Um sistema informático que regista, processa e armazena os dados.

O MALDI, ou seja, Ionização e Desadsorção a Laser Assistida por Matriz, é uma método de ionização suave que permite a desadsorção e ionização de moléculas do estado sólido para o estado gasoso, com pouca ou nenhuma fragmentação dos iões moleculares gerados (Dass, 2001; Herbert *et al.*, 2003; Shimadzu, 2020). Este método de ionização, por norma, subdivide-se em duas etapas. Na primeira, a matriz orgânica adicionada à amostra absorve a energia do laser incidente (luz ultravioleta), converte-a em energia térmica e, formam-se iões primários moleculares. Estes dispersam na fase gasosa, juntamente com as moléculas intactas, formando uma pluma densa na qual ocorre o segundo passo: a

transferência de carga dos iões da matriz para as moléculas do analito que, posteriormente, são acelerados por um campo elétrico e introduzidos no analisador de massa (Dass, 2001; Gross, 2010). Este método de ionização é, frequentemente, acoplado a um analisador TOF (*Time-of-Flight*) porém, é possível realizar experiências MS/MS (que também são conhecidas por MS em tandem ou MS²) quando se acoplam dois analisadores TOF (Gross, 2010). No TOF, os componentes ionizados e desadsorvidos são acelerados através de um campo elétrico, sob condições de vácuo e, separados de acordo com a lei de conservação de energia, pelo que, o seu tempo de voo varia de acordo com a razão m/z (Shimadzu, 2020). Esta abordagem permite a elucidação estrutural de compostos desconhecidos bem como das vias de fragmentação dos analitos e, conseqüentemente, a identificação de compostos com elevada especificidade molecular (Santos *et al.*, 2012; Santos, 2010).

O método de ionização por eletrospray (ESI) é o utilizado em LC-MS/MS. É um processo de ionização suave uma vez que não gera fragmentação dos iões moleculares. As amostras líquidas à pressão atmosférica são bombeadas através de um capilar e nebulizadas, para formar um spray fino de gotículas carregadas. O solvente destas gotículas é rapidamente evaporado e estas desagregadas, pela aplicação de calor e por interação com um fluxo de azoto e, cria-se uma carga elétrica na superfície das gotículas do analito que é ionizado e transferido para o espectrómetro de massa, sob condições de elevado vácuo. Esta metodologia pode ser operada em modo de aquisição positivo ou negativo (Crotti *et al.*, 2006; Diniz, 2011; Lanças, 2009).

O analisador de massa quadrupólo utiliza campos elétricos variáveis, gerados por quatro hastes metálicas paralelas (elétrodos). No centro do quadrupólo passam seletivamente iões de acordo com os seus valores m/z . O quadrupólo funciona como um filtro que permite que os iões com diferentes valores m/z cheguem com tempos diferentes ao detetor. Os iões podem sofrer fragmentação induzidas por colisão (CID) (Dass, 2001; Diniz, 2011).

O analisador de massa Orbitrap, que possui elevada exatidão de massa, é composto por um elétrodo oco (externo), onde é acoplado um elétrodo em forma de fuso (central) ambos sujeitos a tensões eletrostáticas. Os iões são injetados, tangencialmente, para o elétrodo central, presos em torno dele, e ejetados de acordo com os seus valores m/z (Kaklamanos *et al.*, 2015).

2. MÉTODOS ANALÍTICOS

Assim, o analisador de massa híbrido, Quadrupólo-Orbitrap combina a seleção de um precursor quadrupólo de alto desempenho com uma separação Orbitrap de alta resolução, permitindo alta velocidade na aquisição dos dados e determinação de massa exata (Donato *et al.*, 2020). Esta metodologia, utilizada em LC-MS/MS, tem aplicações qualitativas e quantitativas.

3. OBJETIVO DE ESTUDO

O objetivo deste projeto foi identificar, caracterizar e fazer uma quantificação relativa, através de LC-MS/MS, dos compostos presentes nos extratos obtidos para o disco central (estômago), as gónadas femininas e masculinas da estrela-do-mar da espécie *Marthasterias glacialis*. Além disso, pretendeu-se determinar a atividade antimicrobiana dos extratos obtidos para os vários tecidos estudados, a fim de estabelecer as suas concentrações mínimas inibitórias (CIM) e bactericidas (CBM) contra a bactéria gram negativa *Escherichia coli* DH5 α (estirpe K12).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste projeto de investigação, foram realizados os seguintes procedimentos experimentais:

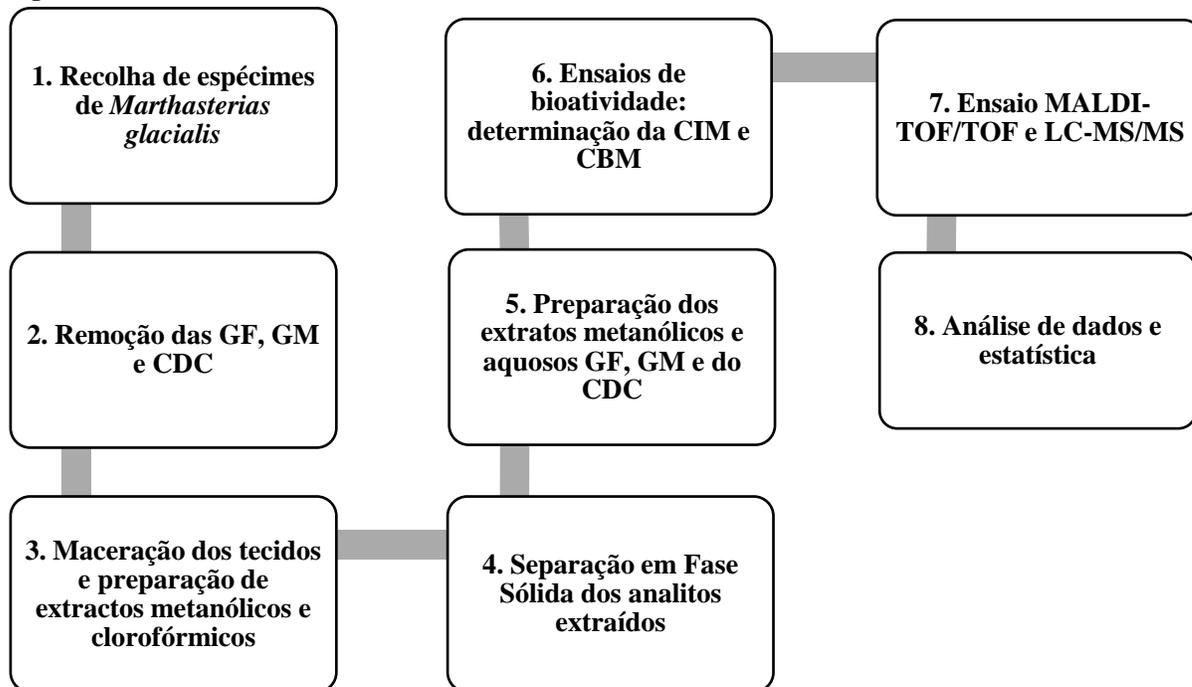


Figura 8: Fluxograma do trabalho experimental realizado. Procedimentos aplicados às amostras gónadas masculinas (GM), gónadas femininas (GF) e componentes do disco central (CDC) obtidos de *M. glacialis*. Onde: CIM-Concentração inibitória mínima; CBM-concentração bactericida mínima.

4.1 ESPÉCIE EM ESTUDO - *MARTHASTERIAS GLACIALIS*

M. glacialis foi a espécie utilizada neste estudo por ser facilmente encontrada na costa Atlântica portuguesa; de fácil manutenção em aquário sob condições controladas; por apresentar boas capacidades regenerativas e, ainda, por ser vista como um importante modelo para estudos de regeneração devido a ter 70% de homologia do seu genoma com o humano (Laires, 2012).

Entre janeiro de 2018 e março de 2020, foram recolhidas, durante a maré baixa, estrelas-do-mar da espécie *Marthasterias glacialis* na zona do Estoril, Cascais, Portugal (38°

.701850°N, 9.392015° W). Seguidamente, foram transportadas para o Aquário Vasco da Gama (Dafundo, Portugal), onde foram mantidas em tanques de circuito aberto com recirculação de água do mar a 15°C e 33‰. A alimentação foi feita *ad libitum*, com uma dieta à base de moluscos.

4.2 REMOÇÃO DAS GÓNADAS E DOS COMPONENTES DO DISCO CENTRAL

Para a recolha das amostras de Gónadas Masculinas (GM), Gónadas Femininas (GF) e Componentes do Disco Central (CDC) utilizaram-se 22 espécimes de *Marthasterias glacialis*. Estas foram anestesiadas através da sua imersão numa solução a 9% de MgCl₂ 6H₂O (BioXtra, USA), dissolvido em água do mar.

Com o auxílio de um bisturi e de uma tesoura cirúrgica, procedeu-se à remoção dos tecidos (**Figura 9**). As gónadas foram separadas quanto ao sexo (macho e fêmea), através de uma inspeção visual, como mostrado na **Figura 9 B**, onde as gónadas femininas apresentam uma coloração alaranjada e as gónadas masculinas uma coloração amarela esbranquiçada (Corral, 2000). O pool de cada tipo de tecido recolhido teve os respetivos pesos húmidos registados e, em seguida foram congelados por imersão em azoto líquido e armazenados a -20 °C.



Figura 9: Órgãos de *Marthasterias glacialis* utilizados no estudo. A- Componentes do disco central (CDC) e B- Gónadas masculinas (GM), apresentam coloração esbranquiçada e gónadas femininas (GF), apresentam coloração alaranjada (imagem original).

4.3 EXTRAÇÃO METANÓLICA DOS COMPONENTES PRESENTES NAS GÓNADAS MASCULINAS, FEMININAS E COMPONENTES DO DISCO CENTRAL

A preparação dos extratos dos vários tecidos foi realizada de acordo com o protocolo experimental adaptado de Popov *et al.* (2019). Os tecidos recolhidos- CDC, GM e GF, foram macerados no almofariz, na presença de azoto líquido, e submetidos ao processo de extração metanólica numa proporção 1:10 (m/v) (peso húmido de tecido/ volume de metanol). O processo de extração foi realizado à temperatura ambiente, durante 10 h sob agitação a 130 rpm, com trocas de solvente a cada 3,5 h. Este procedimento foi repetido três vezes e, após cada centrifugação o sobrenadante foi armazenado num recipiente. Ao fim das 10 h, o pool de sobrenadantes foi filtrado num sistema de vácuo, com papel de filtro qualitativo MN-615 125 mm (Macherey-Nagel, Alemanha). As amostras filtradas foram evaporadas, na hotte, sob um fluxo contínuo de azoto e a massa dos extratos metanólicos secos foi registada.

Para remover possíveis contaminações lipídicas, os extratos metanólicos foram submetidas a uma segunda extração com CHCl_3 : MeOH: H_2O (8:4:3) (v/v/v) para uma diluição final de trinta vezes em relação à massa dos extratos metanólicos secos. Posteriormente, os tubos com as amostras foram centrifugados a $2000 \times g$ por 10 min. Descartou-se o pellet e o sobrenadante foi evaporado sob um fluxo contínuo de azoto. Registou-se a massa de extrato CHCl_3 : MeOH: H_2O (8:4:3) (v/v/v) seco e procedeu-se a uma extração líquido-líquido com CHCl_3 : MeOH: H_2O (100:45:20) 1:1 (m/v). As amostras foram centrifugadas a $2000 \times g$ por 10 min a 4°C , promovendo a separação de fases, onde o metanol e a água constituem a fase superior e o clorofórmio a fase inferior (**Figura 10**). A fase metanólica foi retirada e evaporada no SpeedVac Savant SPD131DDA (Thermo Electron Co., Hopkinton, MA, USA), a uma temperatura de 30°C . A fase clorofórmica foi descartada. Foram registadas as massas de extrato seco para cada amostra, posteriormente dissolvidas em água.



Figura 10: Extrato CHCl_3 : MeOH: H_2O (100:45:20) após centrifugação onde é possível verificar que existe separação de fases. A fase superior do tubo (esbranquiçada) é composta por MeOH: H_2O e a inferior (translúcida) CHCl_3 (imagem original).

4.4 EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE) DAS GM, GF E CDC

Foram utilizados cartuchos SPE (Strataä-X 33 μm Polymeric Reversed Phase, 500 mg/6 mL, capacidade de retenção de 25 mg, Phenomenex) acoplados a um sistema de vácuo constante de 127 mm Hg. Os cartuchos SPE foram lavados com 6 mL de metanol 100% (Sigma-Aldrich, Alemanha) e com 6 mL de água. Posteriormente, foram carregados com 4-5 mL do extrato metanólico obtido para cada um dos tecidos/órgãos. Foi tido em consideração que, segundo as instruções do fabricante, a quantidade de extrato não podia ultrapassar a massa correspondente a 500 mg de tecido extraído. Após o carregamento dos extratos, os cartuchos de SPE foram incubados por um período de 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, e para cada extrato, foi realizada a lavagem com a adição de 6 mL de metanol 5%. Para a etapa de eluição, foram utilizados 9 mL de acetonitrilo 98% (Sigma-Aldrich, Alemanha) com ácido fórmico 2% (Sigma-Aldrich, Alemanha). Os analitos foram recolhidos e armazenados a 4 °C.

4.5 PREPARAÇÃO DO EXTRATO METANÓLICO E AQUOSO DAS GÓNADAS E DOS COMPONENTES DO DISCO CENTRAL

Começou por se fazer um estudo para determinar a concentração de ácido fórmico e de metanol não inibidora do crescimento de *Escherichia coli*. Deste modo, tendo em conta o critério acima referido, utilizou-se 4% de ácido fórmico e 20% de metanol nas solubilizações abaixo descritas.

Os analitos extraídos das gónadas femininas (GF), masculinas (GM) e componentes do disco central (CDC) eluídos do SPE foram secos num SpeedVac (Thermo Scientific, USA). As suas massas foram registadas e, posteriormente, foram solubilizados em ácido fórmico a 4%. De seguida, foram homogeneizados no vórtex e centrifugados a 4°C, 10.000 × g por 5 min. Os sobrenadantes aquosos foram guardados a 4°C. Ao precipitado adicionaram-se pequenos volumes de metanol 20% (precipitado metanólico), homogeneizou-se e armazenou-se 24 h a 4°C. As suspensões obtidas foram centrifugadas a 10.000 × g, por 5 min a 4°C, retirou-se o sobrenadante, secou-se e armazenou-se a 4°C. O sedimento foi descartado.

Deste modo, para os ensaios de bioatividade, foram secos no SpeedVac 100 µL de cada tipo de extrato: aquoso e metanólico. Registou-se a massa do extrato seco e solubilizou-se em 100 µL de água (extrato aquoso- A) e 100 µL metanol 20% (extrato metanólico-M). Armazenou-se a 4 °C para futuros ensaios. O extrato metanólico de CDC não solubilizou em metanol 20% pelo que, não foi utilizado nos restantes ensaios desta tese.

4.6 ENSAIOS DE BIOATIVIDADE: DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Para a realização destes ensaios utilizou-se a estirpe *Escherichia coli* DH5α (MAX Efficiency™ DH5α Competent Cells, Invitrogen™). Os isolados de *E. coli* foram cultivados em meio de cultura Luria-Bertani (LB – Miller's) e incubados (INNOVA 44 New Brunswick™ Scientific) sob agitação a 180 rpm e 37 °C, durante 24 h. A densidade ótica celular foi analisada através de um espectrofotómetro para obter uma turbidez equivalente a 0,5 standard na escala de McFarland ($\approx 1,5 \times 10^8$ UFC/mL), sendo posteriormente diluída 1:10.000 (v/v) para o inóculo de teste atingir $1,5 \times 10^4$ UFC/mL.

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços sob condições estéreis, sendo executadas 3 réplicas biológicas para cada extrato, para um volume final, que inclui o meio de cultura LB-Miller; o extrato em estudo e o inóculo de 200 µL a $1,5 \times 10^4$ UFC/mL. Cada ensaio foi realizado com concentrações diferentes dos extratos. Para a determinação da

concentração inibitória mínima, utilizaram-se concentrações crescentes dos extratos. Assim, para A-CDC foi utilizada uma faixa de concentração entre 1,5 – 5,0 µg/µL; para A-GF utilizou-se entre 2,5 – 100 µg/µL de amostra; 0,36 – 5,59 µg/µL de amostra M-GF; 0,5 – 5 µg/µL de A- GM e 0,36 – 2,5 µg/µL de M-GM.

O controlo negativo foi composto por meio de cultura nutritivo LB – Miller's. O volume de extrato em teste variou entre 0,1 µL – 1 µL segundo o tipo de extrato. O controlo positivo foi composto por 190 µL de meio nutritivo LB – Miller's e 10 µL de suspensão bacteriana de *E. coli* ($1,5 \times 10^4$ UFC/mL). A incubação foi efetuada a 37 °C, 180 rpm, por 24 h.

A densidade ótica (DO) foi medida a 600 nm, num espectrofotómetro (Biotek™ ELx808, USA), para os tempos 0 h e 24 h. A inibição foi calculada usando a seguinte fórmula (Madureira *et al.*, 2015):

$$\% \text{ Inibição} = \frac{DO \text{ controlo negativo} - DO \text{ teste extrato}}{DO \text{ controlo negativo}} \times 100$$

Onde *DO controlo negativo* representa a densidade ótica obtida após 24h de incubação das amostras controlo (sem adição de suspensão bacteriana) e *DO teste extrato* representa a densidade ótica após 24h de incubação de bactérias sob a presença de extratos antimicrobianos.

Para os ensaios que apresentaram percentagem de inibição maior que 93%, considerados como os CIM, foram retirados 20 µL da suspensão teste e plaqueados em placas de Petri com meio de cultura LB-Agar. A placa foi incubada a 37 °C, por 24 h e as concentrações dos extratos que não apresentaram crescimento por inspeção visual foram consideradas bactericidas.

4.7 ANÁLISE POR ESPETROMETRIA DE MASSA MALDI-TOF/TOF

Foi utilizado como matriz o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (Sigma-Aldrich, Alemanha) na concentração de 5 mg/mL dissolvido em 50% acetonitrilo (ACN) com 5% ácido fórmico (AF) (v/v). Foi aplicado 1 µL de cada amostra e 0,5 µL da solução de matriz, numa placa MALDI (Applied Biosystems, USA).

Os espectros de massa foram adquiridos no equipamento ABSciex TOF/TOF modelo 5800 (AB Sciex, Espanha) com refletor, em modo de íão positivo e negativo, e utilizando CalMix 5 (Protea Biosciences, USA) como padrão de calibração. Os espectros MS foram recolhidos com 1500 disparos de laser num intervalo m/z de 800–3000, sendo processados e interpretados utilizando o software mMass versão 5.4.1.

4.8 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (LC-MS/MS)

Os dois extratos metanólicos: gónadas masculinas (M-GM) e gónadas femininas (M-GF); e os três extratos aquosos: gónadas masculinas (A-GM); gónadas femininas (A-GF) e componentes do disco central (A-CDC); os dois brancos (aquoso e metanólico) e o padrão interno (IS) composto por 5 mM 3-Nitro-L-tirosina, foram solubilizados com 0.1% (v/v) de ácido fórmico.

A preparação das amostras analisadas por LC-MS/MS encontra-se descrita na **Tabela 1**. Os volumes dos extratos variaram consoante a sua concentração nas soluções stock. A todas as amostras, foi adicionado o padrão interno numa concentração final de 0,042 mM.

Tabela 1: Preparação das amostras para ensaio LC-MS/MS. Onde: X- não adicionado; IS-3-nitro -L-tirosina M- Metanólico, A- Aquoso e B-Branco.

Amostra	Vextrato (µL)	VH ₂ O (µL)	VMeOH 20% (µL)	V IS (µL)	Volume final (µL)
M- GM	15	60	x	0,63	75
M- GF	15	60	x	0,63	75
A- GM	50	50	x	0,84	100
A- CDC	50	50	x	0,84	100
A-GF	25	50	x	0,63	75
B- Aquoso	x	100	x	x	100
B- Metanólico	x	60	15	x	75
3-Nitro-L-tirosina	x	99,16	x	0,84	100

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a análise LC-MS/MS foi utilizado 1 μ L de cada amostra, branco e padrão interno. A corrida cromatográfica foi executada em modo gradiente com um fluxo de 0,4 μ L/min usando uma pré-coluna Waters XBridge BEH C₁₈, VanGuard Cartridge, 2.1x5 mm, 3.5 μ m. A coluna cromatográfica de fase reversa Waters XBridge column C₁₈ (2.1x150 mm, 3.5 μ m tamanho da partícula) foi mantida a 30 °C. A composição da fase móvel encontra-se descrita na **Tabela 2**. Os dados foram adquiridos em modo de ionização positivo e negativo num espectrômetro de massa Q Exactive Focus (Thermo Scientific, USA) acoplado a um UHPLC Dionex Ultimate 3000, utilizando o software Xcalibur v.4.0.27.19 (Thermo Scientific, USA). Para cada amostra foram efetuadas 2 aquisições (**Figura 11, Ponto 2**), (i) método MS, R = 70000; intervalos m/z 75-1125 e 200-1500 e (ii) método MS/MS, após cada aquisição MS são selecionados para fragmentação os 3 iões moleculares de maior intensidade e 3 energias de colisão normalizadas (NCE = 20, 40, 60). A calibração externa foi realizada usando solução de calibração LTQ ESI Positive Ion (Thermo Scientific, USA) e calibração interna usando Lock Mass (m/z 112,98550).

Tabela 2: Sistema de gradiente utilizado na cromatografia de fase reversa acoplada a MS.

Tempo (min)	0.1 % ácido fórmico em água (v/v)	0.1 % ácido fórmico em acetonitrilo (v/v)
1	99	1
13	1	99
15	1	99
16	99	1
20	99	1

O software utilizado para o pré-processamento de dados foi o Compound Discoverer 3.1.1.12 e o *workflow* encontra-se esquematizado na **Figura 11**.

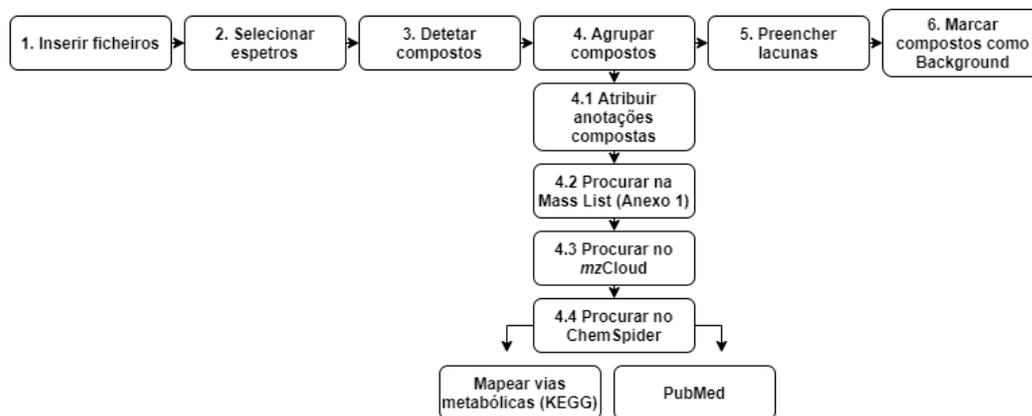


Figura 11: *Workflow* utilizado no pré-processamento dos dados LC-MS/MS no software Compound Discoverer 3.1.1.12 (imagem original).

As amostras foram selecionadas como fatores categóricos e, por isso, agrupadas por tipo de extração: A para aquosa ou M para metanólica e, por nível: amostra GF; GM e CDC. No software Compound Discoverer 3.1.1.12 foi estabelecida a intensidade de pico mínima de 500.000 para deteção dos picos cromatográficos, para evitar cromatogramas com muito ruído de fundo (**Figura 11, Ponto 3**). As tolerâncias da intensidade para o modo positivo e negativo foram, respectivamente de 20% e 30%. Os compostos identificados devem ter na sua composição elementar pelo menos carbono e hidrogénio, sendo a fórmula molecular máxima $C_{90}H_{190}N_{10}O_{18}P_3S_5$. Foram considerados como possíveis aductos: $[2M+ACN+H]^+$; $[2M+ACN+Na]^+$; $[2M+FA-H]^-$; $[2M+H]^+$; $[2M+K]^+$; $[2M+Na]^+$; $[2M-H]^-$; $[M+2H]^+$; $[M+3H]^+$; $[M+ACN+2H]^+$; $[M+ACN+H]^+$; $[M+ACN+Na]^+$; $[M+Cl]^-$; $[M+FA-H]^-$; $[M+H]^+$; $[M+H+K]^+$; $[M+H+MeOH]^+$; $[M+H+Na]^+$; $[M+H-H_2O]^+$; $[M+K]^+$; $[M+Na]^+$; $[M-2H]^-$; $[M-2H+K]^-$; $[M-H]^-$ e $[M-H-H_2O]^-$.

Os compostos foram identificados segundo o fluxo de trabalho apresentado na **Figura 11 (Ponto 4.1)**, nas bases de dados estipuladas para a pesquisa. Neste caso, e segundo a ordem de preferência (que interfere com a escolha do nome do composto/anotação): Mass List (**Ponto 4.2**- onde constam as fórmulas moleculares de 286 asterosaponinas identificadas na literatura e compiladas no **Anexo 1**); *mzCloud* (que faz a busca em todas as classes de compostos e procura identificações utilizando o algoritmo “Confidence” e, para além disso, através do algoritmo “Confidence Forward” procura compostos similares -**Figura 11, Ponto**

4.3) e ChemSpider (**Figura 11, Ponto 4.4-** que busca segundo a fórmula molecular ou massa e pesquisa também no KEGG e no PubMed). A tolerância entre a massa medida e a massa teórica, calculada a partir da fórmula molecular, foi de 3 ppm. Relativamente à ativação do estado energético (que se refere à tolerância dada à energia de ativação de íões usada para gerar o espectro de fragmentação) para o *mzCloud*, foi de 20% para o modo positivo e de 30% para o modo negativo (**Figura 11, Ponto 4.4**).

Na secção preencher lacunas (**Figura 11, Ponto 5**), o limite mínimo de sinal-ruído utilizado para centróides foi de 1,5. A ferramenta “Marcar compostos como Background” (**Figura 11, Ponto 6**), compara as áreas dos picos dos compostos (para a mesma classe de compostos, massa molecular e tempo de retenção) detetados nas amostras e nos brancos respetivos. Assim, o software rotula como “Background”/compostos presentes no ruído de fundo aqueles cujas áreas não respeitem os limites de máximos amostra/branco= 10 e de branco/amostra= 0, ou seja, para ser considerada uma identificação válida e não “Background”, os compostos têm que ter uma área de pico 10 vezes superior na amostra relativamente ao branco.

Todos os compostos sem designação ou sem qualquer tipo de identificação foram eliminados. Para as bases de dados *mzCloud* e ChemSpider, foram excluídos todos os compostos que não apresentaram espectros MS e MS² ou que tinham espectros e/ou cromatogramas com fraca identificação e muito ruído de fundo. Como critérios de aceitação para os compostos que apresentassem correspondência total com a Mass List (ou seja, em que a fórmula molecular e as anotações da estrutura correspondem ao melhor composto disponível), foram aplicadas as seguintes exigências:

- cromatogramas sem ruído de fundo;
- espectros MS² com uma boa série isotópica/boa fragmentação;
- se o composto não tiver espectro MS²: aceitar identificação se apresentar o ião fragmento *m/z* 96,96 ou se apresentar uma boa série isotópica/boa fragmentação. Isto porque o pico *m/z* 96.96 (padrão de fragmentação comum em asterosaponinas), é característico do ião sulfato SO₄²⁻, notoriamente visível em MS² em modo negativo (modo de ionização preferencial para asterosaponinas).

O módulo “Procurar no *mzCloud*” faz uma pesquisa na base de dados *mzCloud* utilizando a massa molecular ou a fórmula prevista do composto desconhecido, quando disponíveis. Esta ferramenta assume uma identificação do composto quando encontra espectros de fragmentação MS/MS correspondentes e semelhantes. O módulo “Procurar no ChemSpider” faz uma pesquisa em diversas bases de dados de MS utilizando a massa molecular ou a fórmula prevista do composto desconhecido, quando disponíveis. Esta ferramenta procura identificações de compostos apenas com base na sua massa ou na sua fórmula molecular. Dentro do ChemSpider, selecionaram-se as bases de dados KEGG e PubMed. Como o módulo “Procurar no ChemSpider” (**Figura 11, Ponto 4.4**) não faz identificação dos compostos tendo em conta o seu padrão de fragmentação e, com vista a reduzir eventuais falsos positivos, as identificações foram filtradas com correspondência total nesta base de dados para área máxima $\geq 1 \times 10^8$.

Após o processamento dos dados MS e MS², os valores *m/z* dos compostos filtrados, os respetivos tempos de retenção e áreas dos picos cromatográficos foram exportados para um documento Excel. As áreas de cada composto foram normalizadas através da sua divisão pela área do padrão interno na mesma corrida cromatográfica.

Para completar a gama de valores *m/z* dos compostos identificados, tanto para o modo negativo como para o positivo, juntaram-se, da corrida *m/z* 75-1125, todos os compostos pertencentes ao intervalo *m/z* 75-200 com os compostos da corrida *m/z* 200-1500. Posteriormente, ordenámos os compostos quanto à fórmula molecular e aplicámos os seguintes critérios para evitar duplicação de compostos detetados em ambos os modos de aquisição:

- quando houver igual número de isómeros em modo positivo e negativo, são mantidos para análise posterior apenas os isómeros do modo de aquisição em que houve valores mais elevados de área normalizada;
- se o número de isómeros for diferente em modo positivo e negativo, são mantidas as áreas do modo de aquisição em que houve maior número de isómeros.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS PRESENTES NO DISCO CENTRAL, GÓNADAS MASCULINAS E FEMININAS

Neste estudo foram utilizados 22 espécimes de *M. glacialis*. Para cada animal foram recolhidas as 5 gónadas e os tecidos do disco central. As massas dos tecidos e as dos extratos metanólicos secos encontram-se registadas na **Tabela 3**.

Estes extratos metanólicos foram ressuspendidos numa primeira solução clorofórmica de CHCl₃:MeOH:H₂O (8:4:3). Seguidamente, foram filtrados, evaporados, secos e, posteriormente, submetidos a uma extração líquido-líquido com uma segunda solução clorofórmica CHCl₃:MeOH:H₂O (100:45:20). As massas destes últimos extratos secos estão apresentadas na **Tabela 3**. De seguida, estes extratos, foram ressuspendidos em água e, posteriormente submetidos a cromatografia por SPE. Os analitos do SPE recolhidos para cada tecido foram secos e as massas registadas na **Tabela 3**. Primeiro, estes extratos foram solubilizados em 4% de ácido fórmico numa concentração final de: 90,4 µg/µL para GM; 1433,1 µg/µL para GF e 106,7 µg/µL para CDC. De seguida, a parte insolúvel dos extratos dos vários tecidos estudados foi sedimentada por centrifugação, recolhida e as suas massas registadas.

Tabela 3: Massa dos tecidos, massas dos extratos e rendimento final da extração.

	Gónadas		CDC
	Masculinas	Femininas	
Massa tecido (g)	129,21	271,58	33,48
Massa extrato metanólico (8:4:3) (g)	15,81	47,79	14,21
Massa extrato líquido-líquido (100:45:20) (g)	4,76	13,44	1,09
Extrato SPE (mg)	42,30	1043,30	28,30
Rendimento final (%)	0,03	0,38	0,08

Onde: SPE- Extração em fase sólida e CDC- componentes do disco central.

O rendimento final, calculado entre as massas dos extratos SPE relativamente à massa dos tecidos, encontra-se detalhado na **Tabela 3**. Para a extração das GF, o rendimento final

é cerca de treze vezes superior ao das GM e o do CDC é cerca de três vezes superior ao das GM. Os resultados reportados em Popov *et al.*, 2019, onde foram utilizados cinco espécimes da estrela do mar *Lethasterias fusca*, referem um rendimento final de 0,08% para as gónadas (sem distinção de sexo) e 0,06% para o estômago. Os rendimentos finais de CDC e GM são da mesma ordem de grandeza dos rendimentos obtidos por Popov *et al.*, 2019.

5.2 SCREENING PRELIMINAR POR MALDI-TOF/TOF E ANÁLISE POR LC-MS/MS, PARA CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE CDC, GF E GM

Foi realizado um *screening* preliminar dos compostos, presentes nos extratos dos tecidos/órgãos estudados por espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF, em modo positivo e negativo. Este tinha como objetivo fazer uma comparação dos perfis MS dos vários extratos metanólicos e aquosos, verificando se as diferenças na sua composição justificariam estudá-los separadamente. Para além disso, serviu também para comprovar se realmente tinha ocorrido extração, ou seja, se os extratos possuíam asterosaponinas. Os valores m/z detetados para os iões moleculares estão compilados no **Anexo 2** (espetros MS).

Como podemos perceber pelo **Anexo 2**, os ensaios de MALDI-TOF/TOF mostraram-nos que foram detetadas várias asterosaponinas (apesar de não terem sido todas identificadas, posteriormente, por LC-MS). Para além disso, através dos dados fornecidos por MALDI-TOF/TOF, verificou-se que existiam diferenças nas composições dos extratos metanólicos e aquosos. Após este *screening* preliminar de compostos, realizou-se uma análise mais detalhada por LC-MS/MS, para caracterização dos extratos. Para os dois tipos de extratos (aquoso e metanólico) e para os tecidos/órgãos GF, GM e CDC, foram realizadas corridas cromatográficas para dois intervalos m/z , 75-1125 e 200-1500, nos dois modos de ionização. As restrições do equipamento não permitem uma corrida cromatográfica no intervalo m/z 75-1500. Os resultados obtidos encontram-se compilados na **Tabela 4**.

Tabela 4: Compostos identificados por LC-MS/MS em modo positivo e negativo para dois intervalos m/z .

m/z	Condições de aquisição			
	200-1500		75-1125	
Modo de aquisição	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
Compostos detetados	10902	15850	6605	11402
Background	326	1270	379	1349
Checked	10449	14392	6112	9784
Background+Checked	10775	15662	6491	11133
Compostos filtrados, para analisar	127	188	114	269
CCT- mzcloud	3	23	13	42
CCT- ChemSpider e mzcloud	1	2	8	18
CCT- ChemSpider	55	146	102	239
CCT- Mass List (Anexo 1)	69	20	6	5
Padrão interno	1	1	1	1

Onde: Background: Compostos presentes no branco e que foram eliminados; Checked: Compostos eliminados; Background+Checked: Total de compostos eliminados; CCT: Com correspondência total; Padrão Interno: *3-nitro-L-tirosina*.

Como referido no subcapítulo 4.8, os “compostos filtrados, para analisar” excluem os compostos designados por “Checked”, ou seja: compostos sem qualquer tipo de identificação; compostos que não tinham espectros MS, MS² ou que tivessem espectros e/ou cromatogramas com fraca identificação e baixo sinal e, que também não apresentam compostos com repetição de isômeros (segundo os critérios explicados anteriormente).

Para o intervalo m/z 75-1125, e como seria de esperar, as identificações de aterosaponinas com a Mass List são muito mais reduzidas face à faixa de m/z 200-1500 uma vez que as suas massas moleculares rondam os 1200-1500 Da. Assim, para completar os range m/z juntou-se, da corrida m/z 75-1125 os compostos pertencentes no intervalo m/z 75-200 com os compostos da corrida m/z 200-1500, tanto para o modo negativo como para o positivo. Deste modo, foi criada uma lista única, para cada modo de aquisição, tipo de extrato e amostra, conforme explicado no subcapítulo 4.8.

(Hidroximetileno) glicina ($C_3H_5NO_3$) foi detetado apenas em GM. Neste extrato aquoso, para GM, foram detetados três isómeros da asterosaponina Ruberosídeo B ($C_{57}H_{94}O_{27}S$) e, nos restantes tecidos/órgãos apenas foram detetados dois isómeros desta asterosaponina.

Quanto ao extrato metanólico, foram identificados 425 compostos em comum entre GF e GM, enquanto que 5 compostos foram detetados exclusivamente para GM e 2 para GF (**Figura 12**).

Deste modo, através dos Diagramas de Venn presentes na **Figura 12**, torna-se perceptível que existem algumas diferenças entre as composições dos tecidos/órgãos e entre o tipo de extrato. Isto corrobora a ideia apresentada em Popov *et al.*, 2019 de que, tais diferenças possam estar relacionadas com uma função biológica específica desses compostos nos diferentes órgãos da *M. glacialis*.

Os extratos e tecidos/órgãos são compostos por diversos metabolitos entre eles, asterosaponinas e compostos com bioatividades reportadas na literatura. Assim, estes foram analisados quanto à presença de compostos com propriedades bioativas como apresentado na **Tabela 5**. Em todos os extratos e tecidos analisados foram detetados fármacos e, compostos com as seguintes propriedades bioativas: anticancerígenas, antivirais, antifúngicas, antiparasitárias, analgésicas, estimulantes, anti-inflamatórias e citostáticas.

A L-(+)-Valina (**Tabela 5**) (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6287>) é um L-aminoácido conhecido por promover o crescimento muscular e a reparação dos tecidos, pelo que, pode auxiliar nos processos de regeneração da estrela-do-mar- quando esta perde membros. Para além disso, tem a função de nutracêutico.

No futuro, será pertinente estudar a estrela-do-mar *M. glacialis*, como bioacumuladora de resíduos de fármacos uma vez que, foi detetado que esta possui Aceclidina, Oxetacaína, Antramicina, Elacitarabina, Ácido tranexâmico, Olodaterol e Vigabatrina, princípios ativos de vários fármacos (**Tabela 5**).

Tabela 5: Compostos que apresentam propriedades bioativas, excluindo os compostos com propriedades antibacterianas, descritas na literatura.

Compostos	Fórmula Molecular	Propriedades bioativas	Fonte
(22E) -Colesta-4,6,8 (14), 22-tetraen-3-ona	C ₂₇ H ₃₈ O	Constituinte químico da ascomiceta <i>D. concentrica</i>	(Quang <i>et al.</i> , 2002)
1- (beta-D-Arabinofuranosil) -4- (hexadecilamino) -2 (1H) - pirimidinona	C ₂₅ H ₄₅ N ₃ O ₅	Atividade anticancerígena	1
2-Amino-9- (2-desoxipentofuranosil) -7,9-dihidro-3H-purina-6,8-diona	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	Atividade anticancerígena; Antiviral contra células Vero, infetadas com HSV-1	1
4- (Palmitoilamino) -1-pentofuranosil-2 (1H) - pirimidinona	C ₂₅ H ₄₃ N ₃ O ₆	Atividade antiviral contra o vírus <i>Vaccinia IHD</i>	1
Acamprosato	C ₅ H ₁₁ NO ₄ S	Possíveis propriedades antivirais nomeadamente, contra SARS-CoV-2	1
Aceclidina	C ₉ H ₁₅ NO ₂	Fármaco usado no tratamento de glaucoma	1
Ácido tranexâmico	C ₈ H ₁₅ NO ₂	Fármaco para tratar/prevenir a perda de sangue e para angioedema hereditário	(Saúde, 1995)
Antramicina	C ₁₆ H ₁₇ N ₃ O ₄	Fármaco antineoplásico isolado de <i>Streptomyces refuineus var.</i>	1
Arabinosilhipoxantina	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	Atividade antiparasitária contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
Creatina	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	Possíveis propriedades antivirais nomeadamente, contra SARS-CoV-2	1
Elacitarabina	C ₂₇ H ₄₅ N ₃ O ₆	Pró-fármaco usado para tratar a leucemia, em estado avançado	1
DMNB	C ₉ H ₉ NO ₅	Inibe o ataque de insetos/artrópodes	1
Glicobismina A	C ₃₇ H ₃₄ N ₂ O ₆	Atividade antifúngica contra <i>P. jirovecii</i>	(Queener <i>et al.</i> , 1991)
Itoprida	C ₂₀ H ₂₆ N ₂ O ₄	Inibidor da proliferação de <i>P. falciparum</i>	1
L-(+)-Valina	C ₅ H ₁₁ NO ₂	Estimulante que promove o crescimento muscular e a reparação dos tecidos; atividade antibacteriana contra várias estirpes e antifúngica contra <i>C. parapsilosis</i>	1
Mesalazina	C ₇ H ₇ NO ₃	Anti-inflamatório associado a doenças inflamatórias intestinais	2
N- (2-Hidroxipropil) metacrilamida	C ₇ H ₁₃ NO ₂	Atividade anticancerígena; Polímero responsável por aumentar a eficácia terapêutica e limitar os efeitos colaterais	(Tucker and Sumerlin, 2014)
NOAC	C ₂₇ H ₄₉ N ₃ O ₅	Nucleósido de arabinose com propriedades citostáticas (em mamíferos) e virostáticas	(Suspiro, 2011)
Olodaterol	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₅	Fármaco usado para o tratamento da doença pulmonar obstrutiva crônica e falta de ar	1
Oxetacafina	C ₂₈ H ₄₁ N ₃ O ₃	Fármaco- Analgésico oral	1
Pregabalina	C ₈ H ₁₇ NO ₂	Propriedades analgésicas, anti-stress e para tratamento de convulsões	1
Retaspimicina	C ₃₁ H ₄₅ N ₃ O ₈	Atividade anti proliferativa; antineoplásica e, possível atividade antiviral contra SARS-CoV-2	1
Vigabatrina	C ₆ H ₁₁ NO ₂	Fármaco usado em doentes epiléticos	(Henriques-souza, 2007)
Minutosídeo A	C ₃₂ H ₅₄ O ₉	Possível atividade antifúngica contra <i>Cladosporium cucumerinum</i> e <i>Aspergillus flavus</i>	1

Onde: 1-PubChem; 2-ChemSpider; DMNB- *6-nitroveratraldeído*; NOAC- *N (4) - Octadecil-1-arabinofuranosilcitosina* e [Minutosídeo A](#)- asterosaponina.

No Subcapítulo 5.4, os extratos e tecidos são analisados quanto à presença de asterosaponinas e de compostos com propriedades antibacterianas.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS E DOS VÁRIOS TECIDOS/ÓRGÃOS ESTUDADOS QUANTO À PRESENÇA DE ASTEROSAPONINAS E DE COMPOSTOS COM PROPRIEDADES ANTIMICROBIANAS E ANTIBACTERIANAS

Com o objetivo de identificar nos tecidos GM, GF e CDC de *M. glacialis*, compostos bioativos, em particular com atividade antimicrobiana e antibacteriana, pesquisou-se nas bases de dados online do ChemSpider e PubChem informações sobre a sua atividade. Assim, foram identificados 10 compostos com estas propriedades, presentes em todos os tecidos e nos dois extratos analisados (**Tabela 6**).

Quando a estrela-do-mar *M. glacialis* sofre lesões e perde membros, os seus órgãos ficam expostos a possíveis contaminações. Assim, estes 10 compostos (**Tabela 6**) presentes nos órgãos e tecidos de *M. glacialis*, que possuem atividades antimicrobianas e antibacterianas reportadas, poderão conferir-lhe proteção contra bactérias patogênicas e, auxiliar no combate a eventuais infecções. Ao mesmo tempo, e como as estrelas-do-mar realizam digestão externa, sabe-se que as propriedades antibacterianas e tóxicas das asterosaponinas, auxiliam a imobilizar ou matar bactérias e outros agentes patogênicos presentes nos alimentos (Popov *et al.*, 2019).

Tabela 6: Compostos com propriedades antimicrobianas e antibacterianas identificados nos vários tecidos, de acordo com as bases de dados ChemSpider (1) e PubChem (2)

Nome dos compostos	Fórmula molecular	Massa molecular (u)	Propriedades bioativas	Base de dados
DL-Cicloserina	C ₃ H ₆ N ₂ O ₂	102,04	Antimicrobiano; Antibiótico; agente anti-tuberculose	1
L-(+)-Valina	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117,08	Atividade antibacteriana contra <i>E. coli</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e <i>P. aeruginosa</i>	2
FG7175000	C ₉ H ₇ NO	145,05	Metabolito xenobiótico bacteriano	1
EDDA	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄	176,08	Metabolito xenobiótico bacteriano	2
Ácido Cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	192,03	Antibacteriano; anticoagulante	1
N-2-Acetilguanina	C ₇ H ₇ N ₅ O ₂	193,06	Ligação de afinidade à guanina presente em <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Clostridium difficile</i>	2
Decilubiquinona	C ₁₉ H ₃₀ O ₄	322,21	Atividade antimicrobiana inespecífica contra <i>Mycobacterium smegmatis</i> ; atividade térmiticida contra <i>Coptotermes formosanus</i>	2
Hexamidina	C ₂₀ H ₂₆ N ₄ O ₂	354,21	Antiséptico	1
PD-124816	C ₁₇ H ₁₈ F ₂ N ₄ O ₃	364,13	CIM inespecífico contra <i>E. coli</i>	2
Desoximicina	C ₂₁ H ₄₁ N ₇ O ₁₁	567,29	Associado à resposta anti-inflamatória; Antibacteriano- agente antitubercular	1

Onde: FG7175000- 2-*Quinolinol*; EDDA- *Ácido etilenodiamina-N, N'-diacético* e PD-124816- *Ácido 5-amino-7- (3-aminopirrolidin-1-il) -1-ciclopropil-6,8-difluoro-4-oxoquinolina-3-carboxílico*; CIM- Concentração inibitória mínima.

A identificação de asterosaponinas teve ênfase neste trabalho uma vez que são compostos específicos das estrelas do mar com atividade antibacteriana reportada (Andersson *et al.*, 1989); (Iorizzi *et al.*, 2001). Para os extratos aquosos e metanólicos (**Figura 13**) e para os três órgãos/tecidos estudados, a proporção de asterosaponinas face ao total de compostos e a proporção de compostos com atividade antimicrobiana e antibacteriana face ao total analisado ronda os 18% e os 2%, respetivamente.

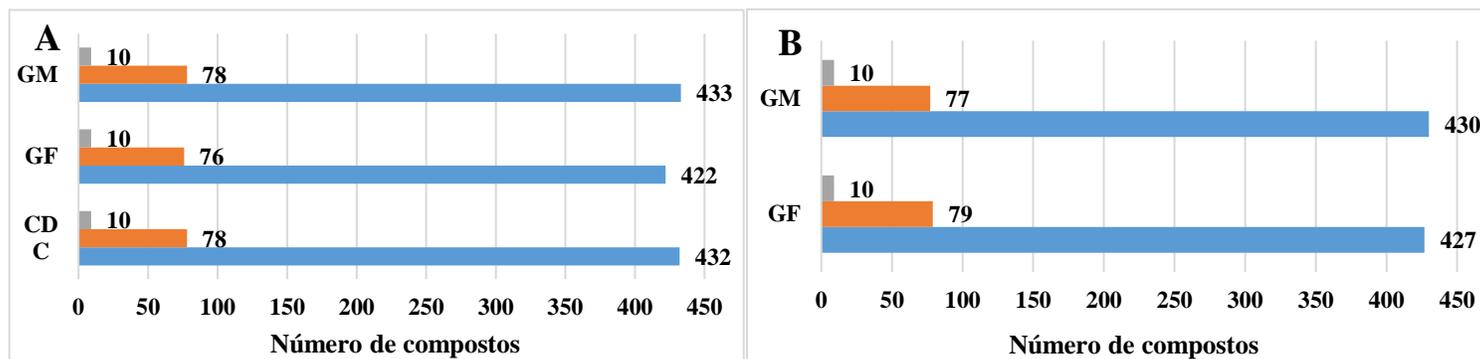


Figura 13: Total: de compostos identificados; asterosaponinas e compostos com atividade antimicrobiana e antibacteriana reportada. Onde A: extrato aquoso; B: extrato metanólico; barra cinzenta: total de compostos com atividade antimicrobiana e antibacteriana; barra laranja: total de asterosaponinas com correspondência total na Mass List (Anexo 1) e barra azul: total de compostos identificados.

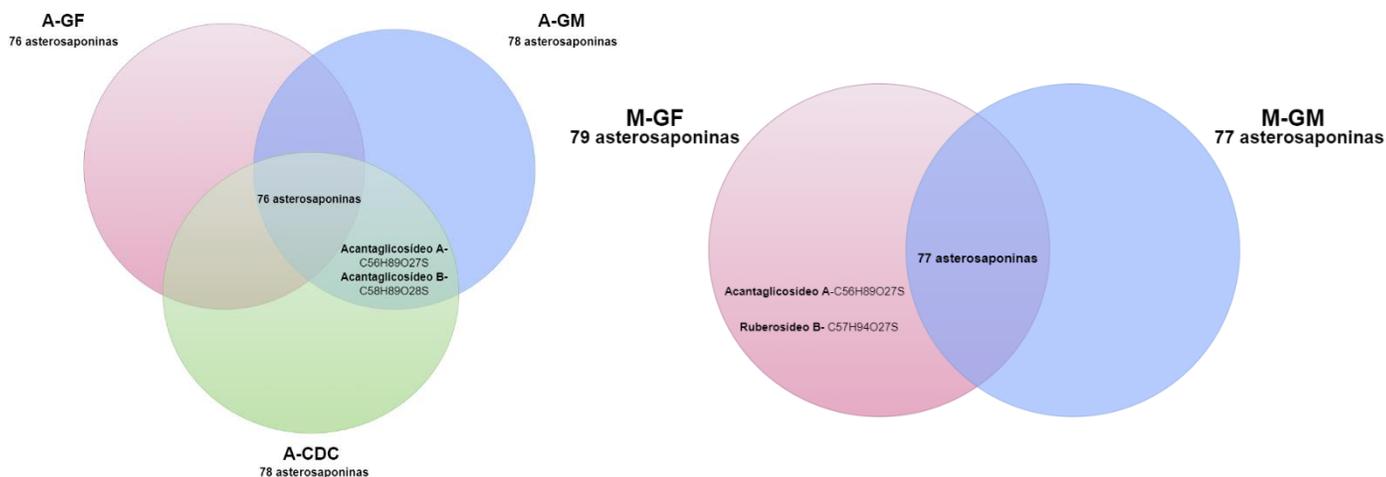


Figura 14: Diagrama de Venn representativo das asterosaponinas e compostos com atividade antimicrobiana e antibacteriana reportada, identificados em cada órgão/tecido. Onde, o diagrama à esquerda se refere ao extrato aquoso e o diagrama à direita ao extrato metanólico; respectivo número de asterosaponinas analisadas. As asterosaponinas listadas referem-se a asterosaponinas encontradas, em exclusivo, num dado extrato ou tecido.

Como podemos interpretar da **Figura 14**, existem nos extratos aquosos, 76 asterosaponinas comuns a GF, GM e CDC; as asterosaponinas Acantaglicosídeo A (C₅₆H₈₉O₂₇S) e B (C₅₈H₈₉O₂₈S) foram detetadas apenas em GM e CDC. Quanto aos extratos metanólicos, existem 77 asterosaponinas em comum entre os órgãos GF e GM e a

asterosaponina Acantaglicosídeo A encontra-se, em exclusivo, nas GF. Neste extrato metanólico, para GF, foram detetados três isómeros da asterosaponina Ruberosídeo B e, para GM apenas foram detetados dois isómeros desta asterosaponina.

Como referido em Popov *et al.* (2019), estas diferenças na distribuição das asterosaponinas (**Figura 14**) estão associadas à função protetora (principal função biológica destes glicosídeos esteroides sulfatados) nomeadamente, contra predadores e, para além disso, acredita-se que possam estar envolvidas em processos de reprodução e de sinalização química celular.

No estudo publicado por Popov *et al.* (2019), foi realizada a identificação, quantificação e distribuição de compostos esteroides polares e de asterosaponinas em diferentes órgãos/tecidos da estrela-do-mar *Lethasterias fusca*. A maior quantidade de esteroides polares foi identificada no estômago, seguido do ceco pilórico, gónadas (sem distinção de género), superfície externa do corpo e no fluído celómico da estrela *L. fusca*. Em concordância com esse estudo, o nosso também detetou a presença de asterosaponinas em todos os órgãos estudados (Popov *et al.*, 2019).

As asterosaponinas identificadas em *L. fusca* foram comparadas com as asterosaponinas encontradas nos órgãos/tecidos extraídos de *M. glacialis* e, foi possível identificar catorze asterosaponinas em comum.

Investigações realizadas anteriormente demonstraram que, as asterosaponinas se encontram distribuídas pelos diversos órgãos das estrelas-do-mar mas que, cada órgão possui uma combinação específica. Num estudo realizado com a estrela *P. pectinifera*, o número de asterosaponinas encontradas foi maior na parede externa do corpo (Kicha *et al.*, 2001); em *A. rubens*, as concentrações mais elevadas de asterosaponinas também foram medidas na parede externa do corpo e nas gónadas (Demeyer *et al.*, 2014); (Demeyer *et al.*, 2015); para a estrela-do-mar *L. polaris*, verificou-se que o conteúdo de asterosaponinas no estômago era superior ao da superfície externa do corpo e do ceco pilórico (Harvey *et al.*, 1987). Deste modo, esta variabilidade elevada observada entre espécies, pode estar associada à biogénese dos compostos presentes em cada órgão ou a questões fisiológicas dos diferentes animais (Popov *et al.*, 2019).

Assim, a comparação do conteúdo das asterosaponinas individuais, em diferentes órgãos da estrela-do-mar, pode sugerir diferentes funções biológicas destes metabolitos, o que nos leva a crer que possa estar relacionado com as propriedades tóxicas, protetoras ou antimicrobianas destes compostos.

No Subcapítulo 5.6, as asterosaponinas serão quantificadas com o objetivo de estabelecer uma correlação com o potencial antimicrobiano e antibacteriano demonstrado no Subcapítulo 5.5.

5.5 ENSAIOS DE BIOATIVIDADE: CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Para os ensaios de bioatividade, 100 μL do extrato aquoso e de metanólico de cada órgão testado (GF, GM e CDC) foram secos no SpeedVac. Registou-se a massa dos extratos secos e, posteriormente, solubilizou-se em 100 μL de água (extrato aquoso) e em 100 μL metanol 20% (extrato metanólico). Assim, os extratos metanólicos, de cada órgão em estudo, foram preparados para uma concentração final de 3,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para GM e 55,9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ GF. O CDC não solubilizou em metanol 20% pelo que, não foi tido em consideração nos ensaios seguintes. Quanto ao extrato aquoso, obteve-se uma concentração final de 24,8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para as GM; 410,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para as GF e de 36,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para o CDC.

A CIM corresponde à concentração mínima de um agente antimicrobiano para a qual já não se observa crescimento do microrganismo (Hinton, 2001). Nesta tese mestrado, a CIM foi determinada através da leitura da densidade ótica e, foi considerada que a concentração inibitória mínima corresponde às concentrações com inibição igual ou superior a 93%. Os resultados de CIM obtidos neste estudo encontram-se descritos na **Tabela 7**. A amostra GM, tanto para o extrato aquoso (A-GM) como para o metanólico (M-GM), apresentou a menor CIM contra *E. coli* e a amostra A-GF é a que possui maior valor de CIM, necessitando de uma concentração de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para inibir o crescimento da estirpe *E. coli* em 99%. Tanto para os extratos aquosos como metanólicos, todos os órgãos apresentaram um potencial de inibição contra *E. coli* igual ou superior a 93%, para as concentrações de 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ A-CDC; 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ A-GF; 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ A-GM; 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ M-GF e 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ M-GM (**Tabela 7**).

Tabela 7: Compilação dos resultados da concentração inibitória mínima (CIM), respectivas médias de inibições das três réplicas biológicas e desvio padrão (SD) ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) (%) e concentração bactericida mínima (CBM).

AMOSTRAS	A-GF	M-GF	A-GM	M-GM	A-CDC
CIM ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	5	4	2,5	2,5	4
Média das inibições \pm SD (%)	99 \pm 1	95 \pm 5	93 \pm 7	100 \pm 0	100 \pm 0
CBM ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)			5	2,5	

Onde: A- extrato aquoso; M- extrato metanólico; GM- gónadas masculinas; GF- gónadas femininas; CDC- componentes do disco central.

Segundo a análise da concentração bactericida mínima (CBM), as amostras M-GM e A-GM apresentaram atividade bactericida para a concentração 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, respetivamente (**Tabela 7**). Quanto aos restantes tecidos/órgãos solubilizados em extrato aquoso e metanólico, todos demonstraram atividade bacteriostática para as concentrações de CIM apresentadas na **Tabela 7**. Deste modo, os resultados deste estudo mostram-nos que os extratos aquosos e metanólicos dos órgãos e tecidos GF, GM e CDC da estrela-do-mar *M. glacialis* possuem compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana demonstrada contra a estirpe bacteriana gram-negativa *E. coli*.

Uma vez que a estrela-do-mar se pode reproduzir sexuadamente cremos que as gónadas ao expelirem os seus gâmetas para a água do mar possam estar sujeitas à ação de predadores e à entrada de patógenos pelo que, necessitam de mecanismos de proteção. Mecanismos esses que podem estar implicados na atividade antibacteriana demonstrada contra *E. coli* (Ruppert *et al.*, 1996).

A atividade antibacteriana demonstrada contra *E. coli*, por parte do CDC, pode estar associada à digestão externa realizada por *M. glacialis*. Como referido anteriormente, na hora de se alimentar, o estômago da estrela-do-mar é projetado para o exterior e, com o auxílio dos pés ambulacrários, a estrela-do-mar exerce pressão crescente sobre os bivalves, abrindo as suas conchas. Após a alimentação, o estômago é recolhido por contração e relaxamento dos músculos do corpo (Ruppert *et al.*, 1996). Deste modo, a estrela-do-mar durante o processo de digestão externa está sujeita à ação de predadores e à entrada de patógenos e, por

isso, cremos que necessite de mecanismos de proteção para se proteger e que podem estar implicados na atividade antibacteriana testada contra *E. coli* (Ruppert *et al.*, 1996).

Segundo dados bibliográficos, a atividade antibacteriana encontrada em compostos da estrela-do-mar *Stellaster equestris* foi testada em isolados clínicos de várias estirpes bacterianas gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e gram-negativas (*E. coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio cholerae*), através do método de difusão em disco (Prabhu *et al.*, 2013). Foi preparada uma solução stock e diluída, em série, para obter os intervalos de concentração de 25%, 50%, 75% e 100%. Neste artigo, o extrato metanólico bruto mostrou uma alo de inibição máximo de $9,7 \pm 0,3$ mm contra *E. coli* e *V. parahaemolyticus*, para a concentração de solução stock máxima testada, ou seja, de 100%. O extrato etanólico bruto apresentou atividade antimicrobiana contra *E. coli* (100%), *K. pneumoniae* (75%), *S. typhi* (100%) e *V. cholerae* (100%) (Prabhu *et al.*, 2013). Não houve crescimento bacteriano de *K. oxytoca* na concentração de 100% pelo que, esta demonstra atividade bactericida (Prabhu *et al.*, 2013). Assim, o resultado deste estudo indica que o extrato bruto e as frações metanólicas e etanólicas da estrela do mar *S. equestris* têm atividades antimicrobianas notórias contra estirpes bacterianas importantes em medicina humana (Prabhu *et al.*, 2013).

No subcapítulo 5.6 os compostos presentes nos dois extratos e nos três órgãos/tecidos, serão quantificados, através de LC-MS/MS, para que seja possível inferir sobre as concentrações inibitórias e bactericidas mínimas detetadas para a estrela-do-mar *M. glacialis*.

5.6 CORRELAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DOS COMPOSTOS PRESENTES NOS VÁRIOS EXTRATOS E TECIDOS E CORRELAÇÃO COM O SEU POTENCIAL ANTIBACTERIANO

Com o intuito de caracterizar a composição dos órgãos GF, GM e CDC utilizados neste estudo, tanto os extratos aquosos como os metanólicos, foram submetidos a LC-MS/MS. A área cromatográfica normalizada dos picos identificados foi utilizada para estimar a sua quantidade relativa nos vários extratos analisados. Esta área normalizada, que depende da quantidade dos compostos e da sua capacidade de ionização, corresponde à razão entre a área do pico cromatográfico do composto e a área do padrão interno *3-nitro-L-tirosina* na

mesma corrida cromatográfica. Por estes motivos, não é possível fazer para cada extrato a correlação entre as quantidades dos diferentes metabolitos, uma vez que a área normalizada depende da capacidade de ionização de cada composto. Porém, especificamente para as asterosaponinas (**Tabela 8**) é possível fazer essa comparação pois para estes compostos o principal responsável pela sua ionização é seu característico íon sulfato (SO_4^{2-}), principal responsável pela sua capacidade de ionização em modo negativo.

O ensaio de bioatividade foi efetuado antes de termos os resultados de LC-MS pelo que, foram testados os dois extratos- aquoso e metanólico. No **Anexo 3** encontram-se listados todos os compostos identificados e os seus respetivos valores de área normalizada.

Com o objetivo de caracterizar a composição de cada órgão compilou-se no **Anexo 3** a quantificação relativa dos compostos identificados no extrato aquoso com os do metanólico, para os órgãos GF e GM. Para cada composto selecionou-se o maior valor de área normalizada. Assim, e como demonstrado no Subcapítulo 5.3, foram identificadas diferenças ao nível dos extratos e dos tecidos analisados.

Através das bases de dados PubChem e ChemSpider, foram analisadas, quanto à possibilidade de apresentarem propriedades antimicrobianas, todas as 79 asterosaponinas que tiveram correspondência total com a Mass List (**Anexo 1**). A asterosaponina Minutosídeo A ($\text{C}_{32}\text{H}_{53}\text{O}_{12}$) apresenta atividade antifúngica reportada na PubChem (**Tabela 5**). Em comparação com as restantes asterosaponinas, esta não se encontra em elevada abundância nos órgãos estudados [A-GF (com área normalizada de 0,07), seguido de M-GF (0,005); A-GM (0,002); A-CDC (0,0005) e M-GM (0,0002)].

Como foi referido anteriormente, as asterosaponinas são compostos característicos das estrelas-do-mar e têm atividades antibacterianas reportadas. Assim, das 79 asterosaponinas detetadas por LC-MS/MS destacam-se as da **Tabela 8** porque são as que apresentaram maior abundância nos vários extratos, o que, e dependendo dos valores de CIM e CBM apresentados no Subcapítulo 5.5, pode estar relacionado com a sua atividade funcional em determinado tecido/órgão (Andersson *et al.*, 1989); (Iorizzi *et al.*, 2001). Através desta tabela podemos verificar que os níveis de esteroides polares sulfatados nos extratos dos diferentes órgãos são quantitativamente diferentes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo a **Tabela 8**, podemos perceber que para as asterosaponinas destacadas, os valores de área normalizada mais elevados estão associados às GF, em específico ao extrato aquoso (com a exceção das asterosaponinas goniopectenosídeo B ($C_{57}H_{93}O_{27}S$), pectinosídeo F ($C_{62}H_{101}O_{33}S$) e versicosídeo A, forbesídeo A ($C_{62}H_{102}O_{33}S$), que se encontram em maior abundância em A-CDC).

Tabela 8: Lista das 15 asterosaponinas mais abundantes, encontradas nos dois tipos de extrato (A e M) e nos tecidos/órgãos (GM, GF, CDC), e respetivo somatório dos valores de área normalizada.

Nome das Asterosaponinas	Fórmula molecular	A-GM	M-GM	A-GF	M-GF	A-CDC
Asterosapinina I Ovariana (Co-Aris I; forbesídeo C)	$C_{57}H_{93}O_{28}S$	0,64	0,0004	9,17	0,89	4,94
Asterosaponina 1, forbesídeo C	$C_{57}H_{94}O_{28}S$	1,28	0,11	101,52	1,83	4,05
dHe-dHe-Qui(-Qui)-He-AG II	$C_{57}H_{89}O_{28}S$	0,0003	0,002	0,34	0,03	0,11
Glicosídeo B, forbesídeo B	$C_{56}H_{92}O_{28}S$	0,75	0,01	62,47	0,01	11,07
Goniopectenosídeo B	$C_{57}H_{93}O_{27}S$	0,01	0,08	0,30	0,05	1,82
Não Identificado	$C_{57}H_{94}O_{29}S$	0,32	0,002	19,93	0,0002	0,30
Não Identificado	$C_{57}H_{92}O_{28}S$	0,20	0,01	4,42	0,01	0,46
Não Identificado	$C_{57}H_{90}O_{27}S$	0,02	0,002	3,94	0,002	0,38
Pectinosídeo F	$C_{62}H_{101}O_{33}S$	0,001	0,0004	0,01	0,002	2,20
Regularosídeo B	$C_{56}H_{92}O_{27}S$	0,01	0,0002	2,16	0,06	0,65
Ruberosídeo B	$C_{57}H_{94}O_{27}S$	0,01	0,0001	3,24	0,003	1,26
Ruberosídeo G	$C_{57}H_{92}O_{27}S$	0,24	0,02	28,31	0,0005	12,14
Sulfato de 17-hidroxipregnenolona	$C_{21}H_{32}O_6S$	14,53	2,53	177,54	20,11	6,28
Tenuispinosídeo C	$C_{56}H_{91}O_{29}S$	0,57	0,001	27,01	2,41	1,76
Versicosídeo A, forbesídeo A	$C_{62}H_{102}O_{33}S$	0,06	0,003	0,89	0,01	18,23
Somatório das áreas normalizadas destas asterosaponinas		18,65	2,77	441,23	25,41	65,64

Onde: Verde- asterosaponina mais abundante, em comparação com os restantes tecidos/órgãos; A- extrato aquoso; M- extrato metanólico; GM- gónadas masculinas; GF- gónadas femininas; CDC- componentes do disco central.

O facto das asterosaponinas serem encontradas, com diferentes valores de área normalizada (**Tabela 8**), nos diferentes órgãos (e extratos) pode ser indicativo de uma função biológica bastante específica destas nesse tecido/órgão de *M. glacialis*. Por exemplo, a

asterosaponina mais abundante nos dois extratos dos órgãos GF e GM foi o sulfato de 17-hidroxipregnenolona ($C_{21}H_{32}O_6S$), contudo, apresentou valores de área normalizada muito diferentes nesses órgãos (valores que variaram entre 2,5 e 177,5). No extrato M-GM, que apresentou o menor valor de CIM ($2,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) e atividade bactericida ($2,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), esta asterosaponina foi a que se encontrou em maior abundância (2,5), porém, quando comparada com os restantes tecidos/órgãos, foi a que apresentou menor valor de área cromatográfica normalizada. Através do somatório das áreas normalizadas das asterosaponinas mais abundantes, presente na **Tabela 8**, podemos perceber que o extrato M-GM apresenta o menor somatório (2,77) em comparação com os restantes tecidos/órgãos estudados. O mesmo acontece com A-GM que apresenta também o menor valor de CIM ($2,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) e atividade bactericida ($5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) e cujo somatório das abundâncias das asterosaponinas foi o segundo mais reduzido (18,65) em comparação com os restantes tecidos/órgãos estudados. Neste caso, leva-nos a crer que são outros compostos, que não as asterosaponinas, os responsáveis pelos seus valores de CIM e CBM contra *E. coli*.

O estudo liderado por Popov demonstrou que a distribuição qualitativa e quantitativa de esteroides polares em *Lethasterias fusca* é diferente nos órgãos estudados e que, o teor máximo (97%) de todos os esteroides polares foi observado no estômago, seguindo-se nas gónadas e no fluído celómico (Popov *et al.*, 2019). À semelhança de Popov, também os nossos órgãos e extratos analisados são qualitativamente diferentes e, no que diz respeito às asterosaponinas, quantitativamente diferentes.

Os extratos são constituídos por vários metabolitos, alguns com atividade antimicrobiana e, por isso, não podemos afirmar que a atividade antimicrobiana observada se deva, exclusivamente, à ação das asterosaponinas. Para além dos 10 compostos detetados com propriedades antimicrobianas e antibacterianas descritas (**Tabela 6**), destacam-se 24 compostos que se encontram descritos na literatura como apresentando diversas propriedades bioativas (entre elas: antivirais, anticancerígenas, antifúngicas, antiparasitárias, estimulantes, anti-inflamatórias, citostáticas, analgésicas e princípios ativos de fármacos) (**Tabela 5**).

Segundo a **Tabela 9**, a maioria dos compostos com propriedades antimicrobianas e antibacterianas encontrados com maior abundância estão associados ao CDC. Mais uma vez, e como referido no Subcapítulo 5.5, as estrelas-do-mar realizam digestão externa e, por isso,

o estômago pode estar sujeito à ação de predadores e à entrada de patógenos. Deste modo, os componentes do disco central necessitam de mecanismos de proteção que cremos que possam estar implicados na atividade antibacteriana testada contra *E. coli*.

Os metabolitos ácido cítrico, L-(+)-valina e EDDA encontram-se, em maior abundância, em A-GM e, os metabolitos DL-cicloserina, PD-124816 e desoximicina encontram-se com maior abundância em A-GF (**Tabela 9**). Como explicado no Subcapítulo 5.5 e, uma vez que as estrelas-do-mar se podem reproduzir sexuadamente, cremos que as gónadas necessitam de mecanismos de proteção e tais mecanismos podem estar implicados na atividade antibacteriana demonstrada contra *E. coli*.

Tabela 9: Compostos com propriedades antibacterianas e antimicrobianas e respetivos valores de área cromatográfica normalizada.

Nome dos compostos	Fórmula Molecular	A-GM	M-GM	A-GF	M-GF	A-CDC
Ácido Cítrico	C ₆ H ₈ O ₇	6,86E+00	6,49E-04	5,24E-01	3,32E-02	6,28E-01
Decilubiquinona	C ₁₉ H ₃₀ O ₄	2,23E-03	6,77E-04	5,68E-02	2,95E-03	7,79E-01
Desoximicina	C ₂₁ H ₄₁ N ₇ O ₁₁	1,03E-01	1,31E-04	1,16E+00	1,63E-01	5,70E-02
DL-Cicloserina	C ₃ H ₆ N ₂ O ₂	1,14E-01	1,73E-03	1,44E-01	8,46E-02	4,12E-02
EDDA	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄	6,79E-01	6,94E-04	2,63E-01	1,35E-01	6,36E-02
FG7175000	C ₉ H ₇ NO	3,71E-02	4,39E-04	1,63E-03	1,29E-04	1,36E-01
Hexamidina	C ₂₀ H ₂₆ N ₄ O ₂	4,81E-02	3,64E-03	7,52E-01	1,51E-02	1,48E+00
L-(+)-Valina	C ₅ H ₁₁ NO ₂	8,31E-01	3,73E-03	5,22E-02	2,69E-02	3,16E-01
N-2-Acetilguanina	C ₇ H ₇ N ₅ O ₂	1,64E-01	X	2,07E-03	X	3,38E-01
PD-124816	C ₁₇ H ₁₈ F ₂ N ₄ O ₃	5,42E-04	1,29E-04	3,86E-01	3,73E-03	2,24E-03

Onde: **Verde**- composto encontrado em maior abundância quando comparado com os restantes tecidos; X- composto não identificado em determinado órgão; FG7175000- 2-Quinolinol; EDDA- Ácido etilenodiamina-N, N'-diacético; PD-124816- Ácido 5-amino-7-(3-aminopirrolidin-1-il) -1-ciclopropil-6,8-difluoro-4-oxoquinolina-3-carboxílico.

Relativamente aos compostos com maior valor de área cromatográfica normalizada (sublinhados a verde), são encontrados com abundância muito superior quando feita a comparação desse mesmo composto nos diferentes órgãos estudados. Por exemplo: PD-124816, L-(+)-valina, decilubiquinona e ácido cítrico apresentam valores que rondam as 98, 17, 13 e 11 vezes superiores, respetivamente, face ao segundo valor mais abundante desse composto (detetado noutra tecido/órgão).

Segundo a base de dados PubChem, o composto PD-124816 encontrado em A-GF e com uma abundância cerca de 98 vezes superior aos restantes tecidos, apresenta CIM inespecífico contra *E. coli*. L-(+)-valina, encontrado com maior abundância em A-GM, quando comparado com os restantes tecidos que também apresenta atividade antibacteriana contra *E. coli*. Assim, estes compostos poderão estar implicados na atividade antibacteriana reportada neste projeto, contra a bactéria gram negativa *E. coli*.

Deste modo, os metabolitos mencionados no decorrer do Capítulo 5, as asterosaponinas e os compostos com atividade antibacteriana e outras propriedades bioativas descritas, podem contribuir para a inibição da bactéria gram negativa *E. coli* e, o facto das asterosaponinas serem encontradas, com diferentes valores de área normalizada nos diferentes órgãos analisados pode estar relacionado com o seu papel biológico (por exemplo: função protetora- nomeadamente, contra predadores e/ou patógenos ou, em processos de reprodução ou de sinalização química celular) em *M. glacialis*.

Assim, e de um modo resumido, podemos correlacionar o potencial antibacteriano de cada órgão com a composição e concentração relativa das substâncias nele presentes. Desta forma e, através da comparação de asterosaponinas e metabolitos presentes nos diferentes órgãos da *M. glacialis*, acreditamos que estes podem ter diferentes funções biológicas, incluindo propriedades tóxicas (misturas complexas de saponinas responsáveis por toxicidade e que podem desempenhar um papel defensivo devido à ação do seu sistema membranotrópico), protetoras ou antimicrobianas (Maier, 2008).

6. CONCLUSÃO

O potencial dos equinodermos como fonte de moléculas bioativas tem vindo a ser investigado e algumas das suas propriedades já foram testadas, em particular, quanto ao seu potencial anticancerígeno e antimicrobiano (Claereboudt *et al.*, 2019; Matranga, 2005).

Este trabalho experimental teve como objetivo a identificação, caracterização e quantificação relativa, através de LC-MS/MS, dos compostos presentes no disco central (estômago), nas gónadas femininas e masculinas da estrela-do-mar *Marthasterias glacialis*. Para além disso, pretendeu-se determinar a atividade antimicrobiana para os extratos aquoso e metanólico dos vários órgãos estudados, a fim de estabelecer as suas concentrações inibitórias (CIM) e bactericidas (CBM) mínimas, contra a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*.

Tendo por base a complexidade dos extractos obtidos para tecidos/órgãos testados recorreu-se aos processos de extração metanólica e clorofórmica e às técnicas de SPE, MALDI-TOF/TOF e LC-MS/MS, para a identificação e caracterização dos compostos constituintes. O SPE permitiu a retenção de compostos de interesse, enquanto outras substâncias indesejadas foram eluídas e descartadas (apesar de não ter sido feita uma avaliação da composição dos extratos antes e após a análise por SPE).

Da análise de LC-MS/MS, detetaram-se 433 compostos, referentes à amostra A-GM; 432 A-CDC; 430 M-GM; 427 M-GF e 422 para a amostra A-GF. Não foram identificadas diferenças significativas entre os extratos e os tecidos/órgãos estudados no que diz respeito ao total de compostos identificados, à proporção de compostos com atividade antimicrobiana e à proporção de asterosaponinas face ao total de compostos identificados.

Relativamente aos ensaios de concentração inibitória mínima, tanto para A-GM como M-GM, a CIM apresentou o menor valor (2,5 µg/µL) ou seja, e em comparação com as restantes amostras, necessita de uma menor concentração de amostra para inibir o crescimento de *E. coli*. Para as restantes, as CIM foram de 4 µg/µL para A-CDC e M-GF e 5 µg/µL para A-GF. Nestas concentrações, todas as amostras, apresentaram um potencial de inibição contra *E. coli*, igual ou superior a 93%. Segundo o ensaio de concentração bactericida mínima, as amostras A-GM e M-GM apresentaram atividade bactericida para a

as concentrações de 5,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, respetivamente. Os restantes tecidos solubilizados, demonstraram atividade bacteriostática para as seguintes concentrações: 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para A-GM; 4,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para o M-GF e A-CDC e 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para o A-GF.

A fim de elucidar eventuais diferenças de composição, foram realizados os ensaios de LC-MS/MS para identificação e caracterização dos componentes presentes nos extratos, nomeadamente, para asterosaponinas e compostos bioativos que podem ser responsáveis pelo potencial antimicrobiano demonstrado. O facto das asterosaponinas apresentarem diferentes valores de área normalizada nos vários extratos e órgãos, pode ser indicativo de uma função biológica específica destas num dado órgão de *M. glacialis*.

Para além das várias asterosaponinas (que são específicas das estrelas-do-mar e têm atividades antibacterianas reportadas) e dos 10 compostos com atividade antibacteriana descrita, destacam-se ainda 24 compostos com diversas propriedades bioativas relacionadas (fármacos; compostos com propriedades anticancerígenas, antivirais, antifúngicas, antiparasitárias, analgésicos, estimulantes, anti-inflamatórias e citostáticas). Assim, os compostos com atividade antibacteriana descrita, as asterosaponinas e os metabolitos detetados nesta tese, podem estar envolvidos na atividade antibacteriana contra a bactéria *E. coli* (Andersson *et al.*, 1989; Iorizzi *et al.*, 2001). Através da comparação das asterosaponinas e dos metabolitos presentes nos diferentes tecidos/órgãos da *M. glacialis*, acreditamos que estes compostos poderão ter diferentes funções biológicas (por exemplo: em processos de reprodução ou de sinalização química celular) e, possivelmente propriedades tóxicas, protetoras (nomeadamente, contra predadores e/ou patógenos) e/ou antimicrobianas.

Futuramente, com vista a enaltecer a robustez deste projeto experimental seria interessante realizar a quantificação absoluta, por LC-MS/MS, das asterosaponinas e dos compostos com propriedades bioativas relacionadas, para as amostras GM, GF e CDC. Para além disso, seria interessante abranger mais órgãos e/ou tecidos da estrela-do-mar *Marthasterias glacialis*, nomeadamente, o ceco pilórico. Será vantajoso realizar os ensaios de CIM e CBM utilizando outras estirpes bacterianas, gram-positivas e gram-negativas. Por fim, será interessante estudar a estrela-do-mar *M. glacialis* como bioacumuladora de resíduos de fármacos uma vez que foram detetado vários princípios ativos nos seus órgãos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, T. J., Nagarajan, J. and Shanmugam, S. A. (2002) ‘Antimicrobial substances of potential biomedical importance from holothurian species’, *Indian Journal of Marine Sciences*, 31(2), pp. 161–164.
- Andersson, L. *et al.* (1989) ‘Biological activity of saponins and saponin-like compounds from starfish and brittle-stars’, *Toxicon*, August, pp. 179–188.
- Aparecida dos Santos, I. (2010) *Equinóides Expostos a Diferentes Salinidades E Sua Caracterização Histológica*. Universidade Federal do Paraná.
- Arizza, V. and Schillaci, D. (2016) *Echinoderm Antimicrobial Peptides: The Ancient Arms of the Deuterostome Innate Immune System, Lessons in Immunity: From Single-cell Organisms to Mammals*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-803252-7.00012-6.
- Beaver, H. H.; Caster, K. E.; Durham, J. W. ; Fay, R. O.; Fell, H. B.; Kesling, R. V.; Macurda, D. B.; Moore, R. C.; Ubaghs, Georges; Wanner, J. (1967) ‘Echinodermata- General Characters’, in Card, L. of C. C. (ed.) *Treatise on Invertebrate paleontology*. The Univer, p. Part S: 1-59.
- Bejenaru, G. *et al.* (2016) *Chapter 17: Marine natural products in fighting microbial infections*. Edited by L. Versteeg-buschman. India: Sara Tenney. doi: : <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803642-6.00017-4>.
- Caldas, S. *et al.* (2011) ‘Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas’, *Quimica Nova*, 34(9), pp. 1604–1617. doi: 10.1590/S0100-40422011000900021.
- Carnevali, C. and Bonasoro, F. (2001) ‘Introduction to the biology of regeneration in echinoderms.’, *Microscopy research and technique*, 55(6), pp. 365–368. doi: 10.1002/jemt.1184.
- Carvalho, F. *et al.* (2018) ‘Sources and biological activities of marine sulfated steroids’, *Society of Endocrinology*, (January), pp. 1–27. doi: 10.1165/rcmb.2011-0115OC.
- Castro, P. and Huber, M. (2003) *Marine Biology*. 4th edn, *Marine Biology*. 4th edn. Chemistry- LibreTexts (2019) *Solid Phase Extraction (SPE)*. Available at: [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_\(Analytical_Chemistry\)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Active_Learning/Contextual_Modules/Sample_Preparation/03_Solid-Phase_Extraction](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Analytical_Sciences_Digital_Library/Active_Learning/Contextual_Modules/Sample_Preparation/03_Solid-Phase_Extraction).
- Chen, C. *et al.* (2014) ‘Metal nanobullets for multidrug resistant bacteria and biofilms’, *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 78, pp. 88–104. doi: 10.1016/j.addr.2014.08.004.
- Claereboudt, E. *et al.* (2019) ‘Triterpenoids in echinoderms: Fundamental differences in diversity and biosynthetic pathways’, *Marine Drugs*, 17(6). doi: 10.3390/md17060352.
- Corral, L. (2000) ‘Estrutura fina do espermatozóide de *Mellita quinquesperforata* Leske (Echinodermata) do litoral norte do Brasil’, *Revista brasileira de zoologia*, pp. 741–745.
- Crotti, A. E. M. *et al.* (2006) ‘Electrospray ionization mass spectrometry: Chemical processes involved in the ion formation from low molecular weight organic compounds’, *Quimica Nova*, 29(2), pp. 287–292. doi: 10.1590/s0100-40422006000200020.

D., F. J. and Fish, S. (2011) *A student's guide to the seashore*. 3rd edn. Aberystwyth: Cambridge University Press. doi: <https://doi.org/10.1017/CBO9781139035125>.

Dass, C. (2001) *Principles and Practice of Biological Mass Spectrometry* Desiderio, Dominic; Nibbering, Nico. Edited by N. Desiderio, Dominic; Nibbering. Memphis, Tennessee: Wiley-Interscience.

Demeyer, M. *et al.* (2014) 'Molecular diversity and body distribution of saponins in the sea star *Asterias rubens* by mass spectrometry', *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*. Elsevier Inc., 168, pp. 1–11. doi: 10.1016/j.cbpb.2013.10.004.

Demeyer, M. *et al.* (2015) *Inter- and intra-organ spatial distributions of sea star saponins by MALDI imaging*, *Anal Bioanal Chem*. doi: 10.1007/s00216-015-9044-0.

Dini, A. *et al.* (1983) 'Starfish saponins-XI. Isolation and partial characterization of the saponins from the starfish *Marthasterias glacialis*', *Comp. Biochem. Physiol*, 76(4), pp. 839–844.

Diniz, M. E. R. (2011) *Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas*. Available at: <https://repositorio.ufmg.br/handle/1843/SFSA-8LQSYX>.

Donato, P., Arena, P. and Mondello, L. (2020) *Theoretical and practical aspects of LC-MS analysis, Hyphenations of Capillary Chromatography with Mass Spectrometry*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/b978-0-12-809638-3.00008-9.

Dong, G. *et al.* (2011) 'Chemical constituents and bioactivities of starfish.', *Chemistry & biodiversity*, 8(5), pp. 740–91. doi: 10.1002/cbdv.200900344.

Drlica, K. and Perlin, D. (2011) *Antibiotic Resistance Understanding and Responding to an emerging crisis*, *Journal of Chemical Information and Modeling*. Edited by A. Goebel. Tim Moore. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

Dubois, M. *et al.* (1988) 'Structures of Two New Oligoglycoside Sulfates, Pectinosides E and F, and Biological Activities of the Six New Pectinosides', *Biologically Active Glycosides from Asteroidea*, XVI, pp. 845–850.

Finoulst, I. *et al.* (2011) 'Sample Preparation Techniques for the Untargeted LC-MS-Based Discovery of Peptides in Complex Biological Matrices', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011. doi: 10.1155/2011/245291.

Gross, J. (2010) *Mass Spectrometry*. Heidelberg: Springer Heidelberg. doi: 10.1007/978-3-642-10711-5.

Harvey, C., Garneau, F.-X. and Himmelman, J. H. (1987) 'Chemodetection of the predatory seastar *Leptasterias polaris* by the whelk *Buccinum undatum*', *Marine Ecology Progress Series*, 40(1/2), pp. 79–86. Available at: <https://www.jstor.org/stable/24825702?seq=1>.

Hasaimoto, Yoshiro; Yasumoto, T. (1960) 'Confirmation of saponin as a toxic principle of starfish', *ulletino f the Japanese Society of Scientific Fisheries*. Tokyo, 26(11), pp. 1132–1138.

Haug, T. *et al.* (2002) 'Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea)', *Journal of Invertebrate Pathology*, 81(94–102). doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(02\)00153-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(02)00153-2).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Henriques-souza, A. M. D. M. (2007) 'Avaliação clínica e eletrencefalográfica em 13 pacientes', *Arq Neuropsiquiatr*, 65(1), pp. 144–149.
- Herbert, C. and Johnstone, A. (2003) *Mass Spectrometry Basis*. CRC PRESS.
- Hinton, M. (2001) 'Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de', *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 53(4), pp. 531–537.
- Iorizzi, M., Marino, S. and Zollo, F. (2001) 'Steroidal Oligoglycosides from the Asteroidea', *Current Organic Chemistry*, 5(9), pp. 951–973.
- Ivanchina, N. *et al.* (2017) 'A New Steroidal Glycoside Granuloside C from the Starfish *Choriaster granulatus*, Unexpectedly Combining Structural Features of Polar Steroids from Several Different Marine Invertebrate Phyla', *Natural Product Communications*, 12(10), pp. 1585–1588. doi: 10.1177/1934578X1701201015.
- Jardim, I. (2010) *Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas*, *Scientia Chromatographica*.
- Kaklamanos, G., Aprea, E. and Theodoridis, G. (2015) *Mass Spectrometry: Principles and Instrumentation*. 1st edn, *Encyclopedia of Food and Health*. 1st edn. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/B978-0-12-384947-2.00447-5.
- Kicha, A. *et al.* (2010) 'Two new asterosaponins, archasterosides A and B, from the Vietnamese starfish *Archaster typicus* and their anticancer properties', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Elsevier Ltd, 20(12), pp. 3826–3830. doi: 10.1016/j.bmcl.2010.04.005.
- Kicha, A. A. *et al.* (2001) 'The distribution of free sterols, polyhydroxysteroids and steroid glycosides in various body components of the starfish *Patiria (s Asterina) pectinifera*', *Comparative Biochemistry and Physiology*, 128(1), pp. 43–52.
- Kon, K. and Rai, M. (2016) *Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches*. Elsevier, *Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches*. Elsevier. Edited by L. H. W. Versteeg-buschman. Sara Tenney. doi: 10.1016/C2015-0-00104-6.
- Laires, R. D. A. D. S. (2012) *Characterization of the coelomic fluid of the starfish *Marthasterias glacialis* in a wound-healing phase*, *Instituto Superior Tecnico*. Instituto Superior Tecnico.
- Lanças, F. M. (2009) 'A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente "compatíveis"?', *Scientia Chromatographica*, 5(1), pp. 27–46. Available at: <http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/sc.2013.005>.
- Li, C., Haug, T. and Stensvåg, K. (2010) 'Antimicrobial peptides in echinoderms', *Invertebrate Survival Journal*, 7(1), pp. 132–140.
- Linnae, C. (1758) *Systema Naturae*. Edited by L. Salvii. Available at: <https://www.biodiversitylibrary.org/page/726886#page/3/mode/1up>.
- Linnaeus (1778) *Marthasterias glacialis*. Available at: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=123803> (Accessed: 30 September 2019).
- Mackie, A., Owen, J. and Singh, T. (1976) 'Studies on the distribution, biosynthesis and function of steroidal saponins in Echinoderms', *Comp. Bl, ~chem Phts lol*, 56B, pp. 9–14.
- Madureira, A. R. *et al.* (2015) 'Production of antimicrobial chitosan nanoparticles

against food pathogens’, *Journal of Food Engineering*. Elsevier Ltd, 167, pp. 210–216. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2015.06.010.

Magiorakos, A. *et al.* (2011) ‘Bacteria : an International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance’, *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, (18), pp. 268–281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

Maier, M. (2008) ‘Biological activities of sulfated glycosides from Echinoderms’, *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier B.V., 35, pp. 311–354. doi: 10.1016/S1572-5995(08)80008-7.

Malyarenko, T. V *et al.* (2014) ‘Asteroaponins from the Far Eastern starfish *Leptasterias ochotensis* and their anticancer activity’, *Steroids*. Elsevier Inc., 87, pp. 119–127. doi: 10.1016/j.steroids.2014.05.027.

Matranga, V. (2005) *Echinodermata, Journal of Chemical Information and Modeling*. Edited by W. E. G. Muller. Italy: Springer. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

Minale, L., Riccio, R. and Zollo, F. (1993) *Steroidal Oligoglycosides and Polyhydroxysteroids from Echinoderms, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Napoli.

Muller, W. E. G. (2005) ‘Marine Molecular Biotechnology Echinodermata’, in Matranga, M. (ed.) *Springer*. Palermo: Springer. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

Nalini, S. *et al.* (2018) ‘Antibacterial macro molecules from marine organisms’, *International Journal of Biological Macromolecules*. Elsevier B.V., 115, pp. 696–710. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.110.

OMS (2020) *Resistencia a los antimicrobianos, GINEBRA*. doi: 9789243509761.

Popov, Roman *et al.* (2019) ‘Structural Characterization of Polar Steroid Compounds of the Far Eastern Starfish *Lethasterias fusca* by Nanoflow Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry’, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* Journal of The American Society for Mass Spectrometry, 30, pp. 743–764. doi: 10.1007/s13361-019-02136-3. Popov, R. S. *et al.* (2019) ‘The Distribution of Asteroaponins, Polyhydroxysteroids and Related Glycosides in Different Body Components of the Far Eastern Starfish *Lethasterias fusca*’, *Marine Drugs*, 17(9), pp. 1–14. doi: 10.3390/md17090523.

Prabhu, K. and Subramanian, B. (2013) ‘Antibacterial activity of starfish *Stellaster equestris* from Southeast Coast of India’, *Journal of Coastal Life Medicine*, 1(3), pp. 210–216. doi: :10.12980/JCLM.1.20133D338.

Prokof, N. *et al.* (2003) ‘Biological activities of steroid glycosides from starfish’, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 134(August 2002), pp. 695–701. doi: 10.1016/S1096-4959(03)00029-0.

Quang, D. N. *et al.* (2002) ‘Chemical constituents of the ascomycete *Daldinia concentrica*’, *Journal of Natural Products*, 65(12), pp. 1869–1874. doi: 10.1021/np020301h.

Queener, S. F. *et al.* (1991) ‘In vitro activities of acridone alkaloids against *Pneumocystis carinii*’, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(2), pp. 377–379. doi: 10.1128/AAC.35.2.377.

Riccio, R., Iorizzi, M. and Minale, L. (1986) ‘Starfish saponins XXX. Isolation of sixteen steroidal glycosides and three polyhydroxysteroids from the mediterranean starfish

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Coscinasterias tenuispina', *Bull. SOC. Chim. Belg*, pp. 869–893. doi: <https://doi.org/10.1002/bscb.19860950912>.

Rio, G. and Niorelli, R. (1965) 'Echinoderm toxins-i. some biochemical and physiological properties of toxins from several species of asteroidea*', *Toslon*, 3, pp. 147–155.

Ruppert, E. and Barnes, R. (1996) 'Equinodermos', in Roca (ed.) *Zoologia dos Invertebrados*. 7th edn. Brazil, pp. 898–967.

Santos, C; Lima, N. (2010) *A espectrometria de massa pela técnica de MALDI-TOF ICMS na identificação microbiana*. Évora. Available at: <http://hdl.handle.net/1822/34026>.

Santos, C. *et al.* (2012) 'A utilização da técnica de MALDI-TOF MS na identificação de fitopatógenos e no diagnóstico de doenças de plantas', *RAPP: Revisão Anual de Patologia de Plantas*.

Sartore, J. (2015) *Starfish*, *National Geographic*. Available at: <https://www.nationalgeographic.com/animals/invertebrates/group/starfish/> (Accessed: 30 September 2019).

Saúde, M. da (1995) 'Coordenação geral de sangue e hemoderivados', pp. 1–16.

Shimadzu (2020) *Principles of MALDI-TOF Mass Spectrometry*. Available at: <https://www.shimadzu.eu/lifescience/maldi/principl1#:~:text=MALDI is the abbreviation for,converts it to heat energy.> (Accessed: 8 March 2020).

Shimizu, Y. (1969) 'Antiviral Substances in Starfish', *Experientia*, pp. 1188–1189.

Silva, P. D. (2012) *Determinação de compostos fenólicos por HPLC*. Universidade da Beira Interior.

Simões, C. (2016) *Infeções Hospitalares Bacterianas no Século XXI*. Universidade Fernando Pessoa.

Skold, M. (2011) *Antibiotics and Antibiotic Resistance*. New Jersey and Canada: Wiley: A John Wiley & SONS, Inc.

Smith, L. C. *et al.* (2018) 'Echinodermata: The Complex Immune System in Echinoderms', *Invertebrate Immunity*, pp. 260–301. doi: 10.1007/978-3-319-76768-0_13.

Sperstad, S. V. *et al.* (2011) 'Antimicrobial peptides from marine invertebrates: Challenges and perspectives in marine antimicrobial peptide discovery', *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc., 29(5), pp. 519–530. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.021.

Stabili, L. and Pagliara, P. (1994) 'Antibacterial protection in Marthasterias glacialis eggs : characterization of lysozyme-like activity', *Comp. Biochem. Physiol*, 109(4), pp. 709–713.

Stabili, L., Pagliara, P. and Roch, P. (1996) 'Antibacterial activity in the coelomocytes of the sea urchin Paracentrotus lividus', *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 113(3), pp. 639–644. doi: 10.1016/0305-0491(95)02080-2.

Tang, H. *et al.* (2006) 'Asterosaponins from the starfish Culcita novaeguineae and their bioactivities', 77, pp. 28–34. doi: 10.1016/j.fitote.2005.07.009.

Thurman, M. and Mills, M. (1998) *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*. Available at: <https://www.wiley.com/en-us/Solid+Phase+Extraction%3A+Principles+and+Practice-p-9780471614227>.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Tucker, B. S. and Sumerlin, B. S. (2014) ‘Poly(N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide)-based nanotherapeutics’, *Polymer Chemistry*, 5(5), pp. 1566–1572. doi: 10.1039/c3py01279d.

Westman-Brinkmalm, A. *et al.* (2009) *Mass Spectrometry- Instrumentation, Interpretation, and applications*. Edited by WILEY. New Jersey.

Zdravkovic, S. (2017) ‘Solid-phase extraction has several advantages over liquid/liquid extraction for extractables and leachables studies’, *Pharmaceutical Technology*, 41(5), pp. 54–60. Available at: <http://www.pharmtech.com/solid-phase-extraction-preparation-aqueous-sample-matrices-gas-chromatographic-analysis-extractable?pageID=2>.

8. ANEXOS

Anexo 1: Mass list com a fórmula molecular de 286 asterosaponinas conhecidas.

Nome da Asterosaponina	Fórmula Molecular
-	C ₂₇ H ₄₅ O ₈ S
-	C ₃₂ H ₅₅ O ₁₂ S
-	C ₃₃ H ₅₅ O ₁₃ S
24-O-hexosil-5 α -colestano-3 β ,6,7,8,15 α ,16 β ,24-heptaol	C ₃₃ H ₅₈ O ₁₂
24-O-hexosil-5 α -colestano-3 β ,6,8,15,16 β ,24-hexaol 3-O-sulfato	C ₃₃ H ₅₇ O ₁₄ S
24-O-hexosil-5 α -colestano-3 β ,6,8,15,24-pentaol 3-O-sulfato	C ₃₃ H ₅₇ O ₁₃ S
24-O-hexosil-5 α -colestano-3 β ,6,8,15 β ,24-pentaol	C ₃₃ H ₅₈ O ₁₀
24-O-metilsulfopentasil-5 α -colestano-3 β ,6,8,15,24-pentaol	C ₃₃ H ₅₇ O ₁₂ S
24-O-metilsulfopentasil-5 α -colestano-3 β ,6,8,15,24-pentaol	C ₃₃ H ₅₇ O ₁₂ S
24-O-pentasil-5 α -cholest-22-ene-3 β ,6,8,15,16 β ,24-hexaol 3-O-sulfato	C ₃₂ H ₅₃ O ₁₃ S
24-O-pentasil-5 α -cholest-22-ene-3 β ,6,8,15,24-pentaol 3-O-sulfato	C ₃₂ H ₅₃ O ₁₂ S
24-O-pentasil-5 α -colestano-3 β ,6,8,15,16 β ,24-hexaol 3-O-sulfato	C ₃₂ H ₅₅ O ₁₃ S
24-O-pentasil-5 α -colestano-3 β ,6,8,15,24-pentaol 3-O-sulfato	C ₃₂ H ₅₅ O ₁₂ S
24-O-pentasil-5 α -colestano-3 β ,6,8,15 α ,16 β ,24-hexaol	C ₃₂ H ₅₆ O ₁₀
24-O-sulfohexosil-5 α -cholest-20(22)-ene-3 β ,6,8,15,24-pentaol	C ₃₃ H ₅₅ O ₁₃ S
24-O-sulfohexosil-5 α -colestano-3 β ,6,8,15,16 β ,24-hexaol	C ₃₃ H ₅₇ O ₁₄ S
24-O-sulfopentasil-5 α -cholest-22-ene-3 β ,6,8,15,24-pentaol	C ₃₂ H ₅₃ O ₁₂ S
24-O-sulfopentasil-5 α -colestano-3 β ,6,8,15,16 β ,24-hexaol	C ₃₂ H ₅₅ O ₁₃ S
24-O-sulfopentasil-5 α -colestano-3 β ,6,8,15,24-pentaol	C ₃₂ H ₅₅ O ₁₂ S
24-O-sulfopentasil-5 α -colestano-3 β ,6,8,15,24-pentaol	C ₃₂ H ₅₅ O ₁₂ S
26-O-sulfohexosil-27-nor-5 α -ergost-20(22)-ene-3 β ,6,8,15,26-pentaol	C ₃₃ H ₅₅ O ₁₃ S
26-O-sulfohexosil-27-nor-5 α -ergost-20(22)-ene-3 β ,6,8,15,26-pentaol	C ₃₃ H ₅₅ O ₁₃ S
26-O-sulfohexosil-27-nor-5 α -ergost-22-ene-3 β ,6,8,15,16 β ,26-hexaol	C ₃₃ H ₅₅ O ₁₄ S
26-O-sulfohexosil-27-nor-5 α -ergost-22-ene-3 β ,6,8,15,16 β ,26-hexaol	C ₃₃ H ₅₅ O ₁₄ S
26-O-sulfohexosil-5 α -ergost-22-ene-3 β ,6,8,15,16 β ,26-hexaol	C ₃₄ H ₅₇ O ₁₄ S
26-O-sulfohexosil-5 α -ergost-22-ene-3 β ,6,8,15,16 β ,26-hexaol	C ₃₄ H ₅₇ O ₁₄ S
26-O-sulfohexosil-5 α -ergost-22-ene-3 β ,6,8,15,26-pentaol	C ₃₄ H ₅₇ O ₁₃ S
26-O-sulfohexosil-5 α -ergost-22-ene-3 β ,6,8,15,26-pentaol	C ₃₄ H ₅₇ O ₁₃ S
28-O-[sulfohexosil-hexosil]-5 α -ergost-22-ene-3 β ,6,8,15,28-pentaol	C ₄₀ H ₆₇ O ₁₈ S
28-O-pentasil-5 α -ergost-22-ene-3 β ,6,8,15,16 β ,28-hexaol 3-O-sulfato	C ₃₃ H ₅₅ O ₁₃ S
28-O-pentasil-5 α -ergostano-3 β ,6,8,15,16 β ,28-hexaol	C ₃₃ H ₅₈ O ₁₀
28-O-sulfohexosil-5 α -ergost-20(22)-ene-3 β ,6,8,15,16 β ,28-hexaol	C ₃₄ H ₅₇ O ₁₄ S
28-O-sulfohexosil-5 α -ergost-20(22)-ene-3 β ,6,8,15,16 β ,28-hexaol	C ₃₄ H ₅₇ O ₁₄ S
28-O-sulfohexosil-5 α -ergost-20(22)-ene-3 β ,6,8,15,28-pentaol	C ₃₄ H ₅₇ O ₁₃ S
28-O-sulfohexosil-5 α -ergost-22-ene-3 β ,6,8,15,16 β ,28-hexaol	C ₃₄ H ₅₇ O ₁₄ S
28-O-sulfohexosil-5 α -ergost-22-ene-3 β ,6,8,15,16 β ,28-hexaol	C ₃₄ H ₅₇ O ₁₄ S

Nome da Asterosaponina	Fórmula Molecular
28-O-sulfohexosil-5 α -ergost-22-ene-3 β ,6,8,15,28-pentaol	C ₃₄ H ₅₇ O ₁₃ S
28-O-sulfohexosil-5 α -ergost-22-ene-3 β ,6,8,15,28-pentaol	C ₃₄ H ₅₇ O ₁₃ S
28-O-sulfohexosil-5 α -ergostano-3 β ,6,8,15,16 β ,28-hexaol	C ₃₄ H ₅₉ O ₁₄ S
28-O-sulfohexosil-5 α -ergostano-3 β ,6,8,15,16 β ,28-hexaol	C ₃₄ H ₅₉ O ₁₄ S
28-O-sulfohexosil-5 α -ergostano-3 β ,6,8,15,28-pentaol	C ₃₄ H ₅₉ O ₁₃ S
28-O-sulfopentosyl-5 α -ergost-20(22)-ene-3 β ,6,8,15,16 β ,28-hexaol	C ₃₃ H ₅₅ O ₁₃ S
28-O-sulfopentosil-5 α -ergost-20(22)-ene-3 β ,6,8,15,28-pentaol	C ₃₃ H ₅₅ O ₁₂ S
28-O-sulfopentosil-5 α -ergost-20(22)-ene-3 β ,6,8,15,28-pentaol	C ₃₃ H ₅₅ O ₁₂ S
29-O-sulfohexosil-5 α -estigmast-22-eno-3 β , 6,8,15,16 β , 29-hexaol	C ₃₅ H ₅₉ O ₁₄ S
29-O-sulfohexosil-5 α -estigmast-22-eno-3 β , 6,8,15,16 β , 29-hexaol	C ₃₅ H ₅₉ O ₁₄ S
29-O-sulfohexosil-5 α -estigmast-22-eno-3 β , 6,8,15,16 β , 29-hexaol	C ₃₅ H ₅₉ O ₁₄ S
29-O-sulfohexosil-5 α -estigmast-22-eno-3 β , 6,8,15,16 β , 29-hexaol	C ₃₅ H ₅₉ O ₁₄ S
29-O-sulfohexosil-5 α -estigmast-22-eno-3 β , 6,8,15,16 β , 29-hexaol	C ₃₅ H ₅₉ O ₁₄ S
29-O-sulfohexosil-5 α -estigmastano-3 β , 6,7,8,15,16 β , 29-heptaol	C ₃₅ H ₆₁ O ₁₅ S
29-O-sulfohexosil-5 α -estigmastano-3 β , 6,8,15,16 β , 29-hexaol	C ₃₅ H ₆₁ O ₁₄ S
29-O-sulfohexosil-5 α -estigmastano-3 β , 6,8,15,16 β , 29-hexaol	C ₃₅ H ₆₁ O ₁₄ S
29-O-sulfohexosil-5 α -estigmastano-3 β , 6,8,15,16 β , 29-hexaol	C ₃₅ H ₆₁ O ₁₄ S
29-O-sulfohexosil-5 α -estigmastano-3 β , 6,8,15,29-pentaol	C ₃₅ H ₆₁ O ₁₃ S
29-O-sulfopentosil-5 α -estigmastano-3 β , 6,8,15,16 β , 29-hexaol	C ₃₄ H ₅₉ O ₁₃ S
3-O-pentosil-24-O-metilsulfopentosil-5 α -colestano-3 β ,6,8,15,24-pentaol	C ₃₈ H ₆₅ O ₁₆ S
3-O-pentosil-24-O-metilsulfopentosil-5 α -colestano-3 β ,6,8,15,24-pentaol	C ₃₈ H ₆₅ O ₁₆ S
3-O-pentosil-24-O-sulfohexosil-5 α -colestano-3 β ,6,8,15,24-pentaol	C ₃₈ H ₆₅ O ₁₇ S
3-O-pentosil-24-O-sulfopentosil-5 α -colestano-3 β ,6,8,15,24-pentaol	C ₃₇ H ₆₃ O ₁₆ S
3-O-pentosil-24-O-sulfopentosil-5 α -colestano-3 β ,6,8,15,24-pentaol	C ₃₇ H ₆₃ O ₁₆ S
3-O-pentosil-26-O-sulfohexosil-27-nor-5 α -ergost-22-ene-3 β ,6,8,15,26-pentaol	C ₃₈ H ₆₃ O ₁₇ S
3-O-pentosyl-26-O-sulfohexosil-5 α -ergost-22-ene-3 β ,6,8,15,26-pentaol	C ₃₉ H ₆₅ O ₁₇ S
3-O-pentosyl-28-O-sulfohexosil-5 α -ergost-22-ene-3 β ,6,8,15,28-pentaol	C ₃₉ H ₆₅ O ₁₇ S
3-O-pentosyl-28-O-sulfohexosil-5 α -ergost-22-ene-3 β ,6,8,15,28-pentaol	C ₃₉ H ₆₅ O ₁₇ S
3-O-pentosil-28-O-sulfohexosil-5 α -ergostano-3 β ,6,8,15,28-pentaol	C ₃₉ H ₆₇ O ₁₇ S
3-O-pentosil-28-O-sulfopentosil-5 α -ergost-20(22)-ene-3 β ,6,8,15,28-pentaol	C ₃₈ H ₆₃ O ₁₆ S
3-O-pentosil-5 α -colestano-3 β ,6,7,8,15,16 β ,26-heptaol 26-O-sulfato	C ₃₂ H ₅₅ O ₁₄ S
3-O-pentosil-5 α -colestano-3 β ,6,8,15,26-pentaol 26-O-sulfato	C ₃₂ H ₅₅ O ₁₂ S
3-O-pentosil-5 α -colestano-3 β ,6,8,15,26-pentaol 26-O-sulfato	C ₃₂ H ₅₅ O ₁₂ S
3-O-pentosil-5 α -ergost-20(22)-ene-3 β ,6,8,15,28-pentaol 28-O-sulfato	C ₃₃ H ₅₅ O ₁₂ S
3-O-pentosil-5 α -ergost-22-ene-3 β ,6,8,15,26-pentaol 26-O-sulfato	C ₃₃ H ₅₅ O ₁₂ S
3-O-pentosil-5 α -ergostano-3 β ,6,8,15,26-pentaol 26-O-sulfato	C ₃₃ H ₅₇ O ₁₂ S
3-O-sulfo-24,25-dihidromartasterona (AG XVII)	C ₂₇ H ₄₃ O ₆ S
3-O-sulfoasterona (AG II)	C ₂₁ H ₃₁ O ₆ S

Nome da Asterosaponina	Fórmula Molecular
3-O-sulfopentasil-24-O-pentasil-5 α -colestano-3 β , 6,8,15,24-pentaol	C ₃₇ H ₆₃ O ₁₆ S
3-O-sulfotornasterol A (AG V)	C ₂₇ H ₄₃ O ₇ S
5 α -colestano-3 β ,4,6,7,8,15 α ,16 β ,26-octaol 6-O-sulfato	C ₂₇ H ₄₇ O ₁₁ S
5 α -colestano-3 β ,4 β ,6 α ,7 α ,8,15 α ,16 β ,26-octaol	C ₂₇ H ₄₈ O ₈
5 α -colestano-3 β ,4 β ,6 α ,7 α ,8,15 β ,16 β ,26-octaol	C ₂₇ H ₄₈ O ₈
5 α -colestano-3 β ,6,7,8,15 α ,16 β ,26-heptaol 6-O-sulfato	C ₂₇ H ₄₇ O ₁₀ S
5 α -colestano-3 β ,6,8,15,16 β ,24-hexaol 3-O-sulfato	C ₂₇ H ₄₇ O ₉ S
5 α -colestano-3 β ,6,8,15,24-pentaol 24-O-sulfato	C ₂₇ H ₄₇ O ₈ S
5 α -colestano-3 β ,6,8,15 α ,16 β ,26-hexaol 6-O-sulfato	C ₂₇ H ₄₇ O ₉ S
5 α -colestano-3 β ,6,8,15 β ,16 β ,26-hexaol 6-O-sulfato	C ₂₇ H ₄₇ O ₉ S
5 α -colestano-3 β ,6 α ,7 α ,8,15 α ,16 β ,26-heptaol	C ₂₇ H ₄₈ O ₇
5 α -colestano-3 β ,6 α ,7 α ,8,15 β ,16 β ,26-heptaol	C ₂₇ H ₄₈ O ₇
5 α -colestano-3 β ,6 α ,8,15 β ,16 β ,26-hexaol	C ₂₇ H ₄₈ O ₆
5 α -ergost-22-ene-3 β ,6,7,8,15 α ,16 β ,26-heptaol 6-O-sulfato	C ₂₈ H ₄₇ O ₁₀ S
5 α -ergost-22-ene-3 β ,6,8,15,16 β ,26-hexaol 6-O-sulfato	C ₂₈ H ₄₇ O ₉ S
Acantaglicosídeo A	C ₅₆ H ₈₉ O ₂₇ S
Acantaglicosídeo B	C ₅₆ H ₈₉ O ₂₈ S
Acantaglicosídeo C	C ₅₆ H ₉₁ O ₂₈ S
Acantaglicosídeo D	C ₅₆ H ₈₉ O ₂₈ S
Acantaglicosídeo F	C ₆₃ H ₁₀₃ O ₃₂ S
AG I	C ₂₁ H ₃₃ O ₆ S
AG VII	C ₂₇ H ₄₃ O ₈ S
AG VIII	C ₂₇ H ₄₁ O ₈ S
Anasterosídeo A	C ₆₂ H ₁₀₁ O ₃₂ S
Anasterosídeo B	C ₅₆ H ₈₉ O ₃₂ S
Arcasterosídeo A	C ₅₉ H ₉₇ O ₂₈ S
Arcasterosídeo B	C ₅₇ H ₉₅ O ₂₇ S
Asteriidosídeo B	C ₆₃ H ₁₀₄ O ₃₁ S
Asteriidosídeo C	C ₆₂ H ₁₀₂ O ₃₁ S
Asterosaponina 1, forbesídeo C	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₈ S
Asterosídeo A	C ₅₆ H ₉₁ O ₂₈ S
Asterosídeo B	C ₅₅ H ₈₉ O ₂₈ S
Asterosídeo C	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₈ S
Asterosídeo D	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₇ S
Co-aris II	C ₅₇ H ₈₉ O ₂₇ S
Co-ARIS III / Asterosaponina 4c	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₇ S
Coscinasterosídeo B	C ₃₂ H ₅₅ O ₁₂ S
Minutosídeo dessulfatado A	C ₃₂ H ₅₄ O ₉
dHex-AG I	C ₂₇ H ₄₃ O ₁₀ S
dHex-AG I	C ₂₇ H ₄₃ O ₁₀ S

Nome da Asterosaponina	Fórmula Molecular
dHex-AG II	C ₂₇ H ₄₁ O ₁₀ S
dHex-dHex-Glc(-Qui)-(C7H9NO4)-AG V	C ₅₈ H ₉₂ NO ₂₈ S
dHex-dHex-Glc(-Qui)-Hex-AG V	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₉ S
dHex-dHex-Glc(-Qui)-Hex-AG XIII	C ₅₈ H ₉₅ O ₂₉ S
dHex-dHex-Glc(-Qui)-Hex-AG XXII	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₈ S
dHex-dHex-Glc(-Qui)-Qui-AG II	C ₅₁ H ₈₁ O ₂₇ S
dHex-dHex-Glc(-Qui)-Qui-AG VI	C ₅₇ H ₉₃ O ₃₀ S
dHex-dHex-Glc(-Qui)-Qui-AG VII	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₉ S
dHex-dHex-Glc(-Qui)-Qui-AG X	C ₅₆ H ₉₁ O ₂₈ S
dHex-dHex-Glc(-Qui)-Qui-AG XIII	C ₅₈ H ₉₅ O ₂₈ S
dHex-dHex-Glc(-Qui)-Qui-AG XIII	C ₅₈ H ₉₅ O ₂₈ S
dHex-dHex-Glc(-Qui)-Qui-AG XIV	C ₅₈ H ₉₅ O ₃₀ S
dHex-dHex-Glc(-Qui)-Qui-AG XVII	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₇ S
dHex-dHex-Glc(-Qui)-Qui-AG XX	C ₅₇ H ₉₅ O ₂₇ S
dHex-dHex-Hex-Xyl(-Qui)-Qui-AG V	C ₆₂ H ₁₀₁ O ₃₂ S
dHex-dHex-Hex-Xyl(-Qui)-Qui-AG XXII	C ₆₂ H ₁₀₁ O ₃₁ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-(C6H6O3)-AG V	C ₅₇ H ₈₉ O ₂₆ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-(C6H6O3)-AG V	C ₅₇ H ₈₉ O ₂₆ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-(C6H9NO3)-AG III	C ₅₇ H ₉₄ NO ₂₇ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-(C7H9NO4)-AG II	C ₅₂ H ₈₀ NO ₂₆ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-(C7H9NO4)-AG II	C ₅₂ H ₈₀ NO ₂₆ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-(C7H9NO4)-AG V	C ₅₈ H ₉₂ NO ₂₇ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-(C7H9NO4)-AG V	C ₅₈ H ₉₂ NO ₂₇ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-DXU-AG II	C ₅₁ H ₈₁ O ₂₇ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-DXU-AG II	C ₅₁ H ₈₁ O ₂₇ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-DXU-AG V	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₈ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-DXU-AG VI	C ₅₇ H ₉₃ O ₃₀ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-DXU-AG VII	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₉ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-DXU-AG VIII	C ₅₇ H ₉₁ O ₂₉ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-DXU-AG XIII	C ₅₈ H ₉₅ O ₂₈ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-DXU-AG XIX	C ₅₇ H ₉₁ O ₂₇ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-DXU-AG XVII	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₇ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-DXU-AG XVIII	C ₅₇ H ₉₅ O ₂₇ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-Hex-AG IV	C ₅₃ H ₈₅ O ₂₈ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-Hex-AG V	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₈ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-Hex-AG XII	C ₅₇ H ₈₉ O ₂₈ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-Hex-AG XX	C ₅₇ H ₉₅ O ₂₇ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-Hex-AG XXI	C ₅₇ H ₉₁ O ₂₇ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-Hex-AG XXII	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₇ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-Qui-AG I	C ₅₁ H ₈₃ O ₂₆ S

Nome da Asterosaponina	Fórmula Molecular
dHex-dHex-Qui(-Qui)-Qui-AG II	C ₅₁ H ₈₁ O ₂₆ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-Qui-AG II	C ₅₁ H ₈₁ O ₂₆ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-Qui-AG V	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₇ S
dHex-dHex-Qui(-Qui)-Qui-AG XVII	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₆ S
dHex-Hex-Glc(-Qui)-Qui-AG V	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₉ S
dHex-Hex-Qui(-Qui)-Hex-AG XX	C ₅₇ H ₉₅ O ₂₈ S
dHex-Hex-Qui(-Qui)-Hex-AG XXII	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₈ S
dHex-Hex-Qui(-Qui)-Qui-AG II	C ₅₁ H ₈₁ O ₂₇ S
dHex-Hex-Xyl(-Qui)-Hex-AG V	C ₅₆ H ₉₁ O ₂₉ S
dHex-Hex-Xyl(-Qui)-Hex-AG XX	C ₅₆ H ₉₃ O ₂₈ S
dHex-Hex-Xyl(-Qui)-Qui-AG II	C ₅₀ H ₇₉ O ₂₇ S
dHex-Pent-Qui(-Qui)-Hex-AG XX	C ₅₆ H ₉₃ O ₂₇ S
dHex-Pent-Qui(-Qui)-Hex-AG XXI	C ₅₆ H ₈₉ O ₂₇ S
dHex-Pent-Qui(-Qui)-Hex-AG XXII	C ₅₆ H ₉₁ O ₂₇ S
dHex-Pent-Qui(-Qui)-Qui-AG I	C ₅₀ H ₈₁ O ₂₆ S
dHex-Pent-Qui(-Qui)-Qui-AG I	C ₅₀ H ₈₁ O ₂₆ S
dHex-Pent-Qui(-Qui)-Qui-AG II	C ₅₀ H ₇₈ O ₂₆ S
dHex-Pent-Qui(-Qui)-Qui-AG XI	C ₅₆ H ₉₃ O ₂₇ S
dHex-Pent-Xyl(-Qui)-Qui-AG I	C ₄₉ H ₇₉ O ₂₆ S
dHex-Pent-Xyl(-Qui)-Qui-AG II	C ₄₉ H ₇₇ O ₂₆ S
dHex-Pent-Xyl(-Qui)-Qui-AG IX	C ₅₅ H ₈₉ O ₂₇ S
dHex-Pent-Xyl(-Qui)-Qui-AG X	C ₅₄ H ₈₇ O ₂₇ S
dHex-Pent-Xyl(-Qui)-Qui-AG XI	C ₅₅ H ₉₁ O ₂₇ S
dHex-Pent-Xyl(-Qui)-Qui-AG XV	C ₅₆ H ₉₃ O ₂₇ S
dHex-Pent-Xyl(-Qui)-Qui-AG XVIII	C ₅₅ H ₉₁ O ₂₆ S
Distolasterosídeo D1	C ₃₇ H ₆₄ O ₁₃
Distolasterosídeo D2	C ₃₇ H ₆₂ O ₁₃
Forbesídeo E	C ₂₇ H ₄₂ O ₁₃ S ₂
Forbesídeo F	C ₅₁ H ₈₃ O ₂₄ S
Forbesídeo G	C ₄₅ H ₇₃ O ₂₀ S
Forbesídeo H	C ₄₄ H ₇₁ O ₁₉ S
Fuc-Gal-Xyl(-Qui)-Qui-AG V (thornasterosídeo A)	C ₅₆ H ₉₁ O ₂₈ S
Fuc-Gal-Xyl(-Qui)-Qui-AG XVII (lethasteriosídeo A)	C ₅₆ H ₉₁ O ₂₇ S
Fuc-Gal-Xyl(-Qui)-Qui-AG XVIII (lethasteriosídeo B)	C ₅₆ H ₉₃ O ₂₇ S
Fuc-Qui-Glc(-Qui)-Qui-AG V (luidiaquinosídeo)	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₈ S
Fuscasídeo B	C ₃₇ H ₆₄ O ₁₃
Gal-Fuc-Gal-Xyl(-Qui)-Qui-AG XVII (anasterosídeo A)	C ₆₂ H ₁₀₁ O ₃₂ S
Glicosídeo B, forbesídeo B	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₈ S
Goniopectenosídeo A	C ₅₇ H ₉₁ O ₂₈ S
Goniopectenosídeo B	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₇ S

Nome da Asterosaponina	Fórmula Molecular
Henricosídeo A	C ₅₆ H ₉₁ O ₂₈ S
Hex-AG I	C ₂₇ H ₄₃ O ₁₁ S
Hex-AG I	C ₂₇ H ₄₃ O ₁₁ S
Hex-dHex-dHex-Glc(-Qui)-Qui-AG V	C ₆₃ H ₁₀₃ O ₃₃ S
Hex-dHex-dHex-Glc(-Qui)-Qui-AG XXII	C ₆₃ H ₁₀₃ O ₃₂ S
Hex-dHex-dHex-Qui(-Qui)-Qui-AG V	C ₆₃ H ₁₀₃ O ₃₂ S
Hex-dHex-dHex-Qui(-Qui)-Qui-AG XVII	C ₆₃ H ₁₀₃ O ₃₁ S
Hex-dHex-dHex-Xyl(-Qui)-Qui-AG V	C ₆₂ H ₁₀₁ O ₃₂ S
Hex-dHex-dHex-Xyl(-Qui)-Qui-AG XVII	C ₆₂ H ₁₀₁ O ₃₁ S
Hex-dHex-dHex-Xyl(-Qui)-Qui-AG XX	C ₆₂ H ₁₀₃ O ₃₁ S
Hex-dHex-dHex-Xyl(-Qui)-Qui-AG XXII	C ₆₂ H ₁₀₁ O ₃₁ S
Hex-dHex-Hex-Xyl(-Qui)-Hex-AG V	C ₆₂ H ₁₀₁ O ₃₄ S
Hex-dHex-Hex-Xyl(-Qui)-Hex-AG XIII	C ₆₃ H ₁₀₃ O ₃₄ S
Hex-dHex-Hex-Xyl(-Qui)-Hex-AG XVII	C ₆₂ H ₁₀₁ O ₃₃ S
Hex-dHex-Hex-Xyl(-Qui)-Qui-AG I	C ₅₆ H ₉₁ O ₃₂ S
Hex-dHex-Hex-Xyl(-Qui)-Qui-AG II	C ₅₆ H ₈₉ O ₃₂ S
Hex-dHex-Hex-Xyl(-Qui)-Qui-AG V	C ₆₂ H ₁₀₁ O ₃₃ S
Hex-dHex-Hex-Xyl(-Qui)-Qui-AG VII	C ₆₂ H ₁₀₁ O ₃₄ S
Hex-dHex-Hex-Xyl(-Qui)-Qui-AG VIII	C ₆₂ H ₉₉ O ₃₄ S
Hex-dHex-Hex-Xyl(-Qui)-Qui-AG X	C ₆₁ H ₉₉ O ₃₃ S
Hex-dHex-Hex-Xyl(-Qui)-Qui-AG XIII	C ₆₃ H ₁₀₃ O ₃₃ S
Hex-dHex-Hex-Xyl(-Qui)-Qui-AG XVI	C ₆₄ H ₁₀₅ O ₃₃ S
Hex-dHex-Hex-Xyl(-Qui)-Qui-AG XX	C ₆₂ H ₁₀₃ O ₃₂ S
Hex-dHex-Hex-Xyl(-Qui)-Qui-AG XXIII	C ₆₃ H ₁₀₃ O ₃₂ S
Hex-dHex-Pent-Xyl(-Qui)-Qui-AG IX	C ₆₁ H ₉₉ O ₃₂ S
Hex-dHex-Pent-Xyl(-Qui)-Qui-AG XIII	C ₆₂ H ₁₀₁ O ₃₂ S
Hex-dHex-Pent-Xyl(-Qui)-Qui-AG XV	C ₆₂ H ₁₀₃ O ₃₂ S
Hex-dHex-Pent-Xyl(-Qui)-Qui-AG XX	C ₆₁ H ₁₀₁ O ₃₁ S
Laevigatosídeo	C ₅₆ H ₉₁ O ₂₇ S
Luidiaglicosídeo C	C ₅₇ H ₉₁ O ₂₇ S
Luidiaglicosídeo D	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₇ S
Maculatosídeo (luidiaglicosídeo B)	C ₅₆ H ₉ O ₂₇ S
Marthasterosídeo A1	C ₆₂ H ₁₀₁ O ₃₂ S
Marthasterosídeo A2 (luidiaglicosídeo A)	C ₆₂ H ₁₀₁ O ₃₁ S
Marthasterosídeo B	C ₅₇ H ₉₁ O ₂₇ S
Marthasterosídeo C	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₇ S
Minutosídeo A	C ₃₂ H ₅₃ O ₁₂ S
Mixodermosida A	C ₅₀ H ₈₁ O ₂₄ S
Não Identificado	C ₅₆ H ₉₄ O ₂₆ S
Não Identificado	C ₅₇ H ₉₀ O ₂₇ S

Nome da Asterosaponina	Fórmula Molecular
Não Identificado	C ₅₇ H ₉₂ O ₂₈ S
Não Identificado	C ₅₈ H ₉₆ O ₂₈ S
Não Identificado	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₉ S
Ofidianoside B	C ₅₅ H ₈₉ O ₂₈ S
Ofidianoside C	C ₅₄ H ₈₇ O ₂₇ S
Ofidianoside F	C ₅₅ H ₈₉ O ₂₇ S
Asterosaponina I ovariana (Co-Aris I; forbesídeo C)	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₈ S
<i>Asterosaponina I ovariana-4 (Co-Aris III)</i>	C ₅₆ H ₉₁ O ₂₇ S
Patiriosídeo A	C ₆₂ H ₁₀₁ O ₃₂ S
Patiriosídeo B	C ₆₃ H ₁₀₃ O ₃₃ S
Petinosídeo A	C ₅₇ H ₉₃ O ₂₈ S
Petinosídeo B	C ₆₃ H ₁₀₃ O ₃₃ S
Petinosídeo C	C ₆₄ H ₁₀₅ O ₃₂ S
Petinosídeo E	C ₆₂ H ₁₀₁ O ₃₂ S
Petinosídeo F	C ₆₂ H ₁₀₁ O ₃₃ S
Petinosídeo G	C ₆₂ H ₁₀₁ O ₃₂ S
Protoreasterosídeo	C ₅₆ H ₉₁ O ₂₇ S
Picnopodiosídeo A	C ₃₂ H ₅₆ O ₉
Picnopodiosídeo C	C ₃₃ H ₅₇ O ₁₃ S
Qui-Glc-Qui-AG I	C ₃₉ H ₆₃ O ₁₉ S
Qui-Glc-Qui-AG II	C ₃₉ H ₆₁ O ₁₉ S
Qui-Glc-Qui-AG V	C ₄₅ H ₇₃ O ₂₀ S
Qui-Qui-Qui-AG I	C ₃₉ H ₆₃ O ₁₈ S
Qui-Qui-Qui-AG I	C ₃₉ H ₆₃ O ₁₈ S
Qui-Xyl-Qui-AG I	C ₃₈ H ₆₁ O ₁₈ S
Qui-Xyl-Qui-AG I	C ₃₈ H ₆₁ O ₁₈ S
Regularosídeo A	C ₅₈ H ₉₅ O ₂₈ S
Regularosídeo B	C ₅₆ H ₉₁ O ₂₇ S
Regularosídeo B	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₇ S
Ruberosídeo A	C ₅₇ H ₉₆ O ₂₇ S
Ruberosídeo B	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₇ S
Ruberosídeo C	C ₆₂ H ₁₀₄ O ₃₁ S
Ruberosídeo D	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₆ S
Ruberosídeo E	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₆ S
Ruberosídeo F	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₈ S
Ruberosídeo G	C ₅₇ H ₉₂ O ₂₇ S
Saponina I	C ₅₅ H ₈₉ O ₂₇ S
Saponina A	C ₅₆ H ₉₄ O ₂₆ S
Saponina B	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₇ S
Saponina C	C ₅₈ H ₉₆ O ₂₈ S

Nome da Asterosaponina	Fórmula Molecular
Solasterosídeo A	$C_{56}H_{91}O_{26}S$
Solasterosídeo A	$C_{56}H_{92}O_{26}S$
Tenuispinosídeo A	$C_{56}H_{91}O_{28}S$
Tenuispinosídeo B	$C_{56}H_{91}O_{27}S$
Tenuispinosídeo C	$C_{56}H_{91}O_{29}S$
Tornasterosídeo A	$C_{56}H_{91}O_{28}S$
Versicosídeo A, forbesídeo A	$C_{62}H_{101}O_{33}S$
Versicosídeo A, forbesídeo A	$C_{62}H_{102}O_{33}S$
Versicosídeo B	$C_{63}H_{103}O_{33}S$
Versicosídeo C (tornasterosídeo B)	$C_{57}H_{93}O_{28}S$

Anexo 2: m/z dos iões moleculares detetados pelo MALDI-TOF/TOF.

<i>m/z</i>	Modo de Aquisição							
	Negativo					Positivo		
	A-GM	A-GF	A-CDC	M-GF	M-GM	A-GM	A-GF	M-GM
929,5				X				
933,5	X							X
945,5	X							X
947,5	X	X		X				X
963,5	X	X		X				X
965,5	X							X
975,5	X	X		X				X
981,5	X							
983,5	X							
991,3	X							
993,5	X	X		X				X
995,5	X							
997,5	X							
1011,5	X							X
1013,5	X							X
1025,5	X							X
1027,5	X							
1041,5	X							X
1075,5								X
1079,6	X		X	X				X
1081,5				X				X
1093,6		X	X	X				X
1095,6	X							
1097,6								X
1107,5				X				
1111,6								X
1113,6	X	X						
1121,6		X						X
1123,6			X					
1125,6				X				
1127,5								
1139,6			X					X
1141,6	X							
1143,6	X		X	X				X
1149,6								X
1157,6	X	X		X				X
1159,6	X	X						
1162,3								
1165,5				X			X	
1169,6	X							
1171,6	X							X
1173,6	X							
1185,6	X							X

<i>m/z</i>	Modo de Aquisição							
	Negativo					Positivo		
	A-GM	A-GF	A-CDC	M-GF	M-GM	A-GM	A-GF	M-GM
1187,6	X			X				
1211,6					X			
1215,6	X							
1219,6				X				
1221,6		X		X	X			
1223,6	X			X	X			
1225,6	X	X		X	X			
1227,7			X		X			
1229,7	X				X			
1239,7	X	X	X	X				
1241,7	X			X	X			
1243,7	X	X	X	X				
1245,7	X							
1247,6		X						
1253,6		X	X					
1255,6			X					
1257,7	X		X		X			
1259,7	X							
1267,6		X		X				
1269,6		X	X		X			
1271,6					X			
1273,7	X			X				
1285,5							X	
1285,7	X	X		X	X			
1286,7			X					
1289,7	X							
1295,6		X	X	X				
1297,6					X			
1299,5							X	
1301,5							X	
1301,7	X	X		X	X			
1302,5							X	
1305,7			X					
1313,6		X		X	X			
1314,7	X		X					
1315,5							X	
1317,5							X	
1315,7			X					
1319,5							X	
1323,6				X				
1329,5							X	

m/z	Modo de Aquisição							
	Negativo					Positivo		
	A-GM	A-GF	A-CDC	M-GF	M-GM	A-GM	A-GF	M-GM
1329,7		X		X				
1331,5							X	
1333,6						X		X
1333,7	X							
1342,7	X		X					
1343,6		X		X				
1345,4							X	
1371,7			X		X			
1372,7	X							
1387,7	X		X		X			
1403,7					X			
1405,7	X		X					
1415,7			X					
1419,7					X			
1430,6								X
1447,2					X			
2003								X
2345,2								X
2575,3								X
3622,8								X
3644,7								X
3661,8						X		
3671,2								X

Onde: “X”: valor *m/z* detetado; A- extrato aquoso; M- extrato metanólico; GM- gónadas masculinas; GF- gónadas femininas; CDC- componentes do disco central.

Anexo 3: Quantificação dos compostos detetados nos órgãos GM; GF e CDC do extrato aquoso e GF e GM do extrato metanólico.

Nome do composto	Fórmula	Massa Molecular	RT [min]	A-GM	M-GM	A-GF	M-GF	CDC
(-)-Vindolina	C25 H32 N2 O6	456,23	12,55	7,71E-02		1,57E+00		2,45E+00
(1,4,8,11-tetraazaciclotetradecan-1-ilmetil) ácido fosfónico	C11 H27 N4 O3 P	294,18	11,84	1,02E-03		1,11E-02		2,87E-01
(2 - {[3 α , 5 β , 12 α]-3,7,12-Trihidroxi-24-oxocolan-24-il} amino} etil) ácido fosfónico	C26 H46 N O7 P	515,30	11,32	5,82E-03		2,23E-01		3,00E-01
(22E)-Colesta-4,6,8 (14), 22-tetraen-3-ona	C27 H38 O	378,29	9,65	1,07E-01		3,40E+00		2,38E-01
(22E)-Colesta-4,6,8 (14), 22-tetraen-3-ona	C27 H38 O	378,29	9,38	1,47E-01		1,91E+00		1,30E-01
(2R)-2,3-Bis (heptanoiloxi) propil 2- (trimetilamônio) etil fosfato	C22 H44 N O8 P	481,28	11,77	1,01E-02		2,15E-01		1,79E-01
(2R)-3- (Hexadeciloxi) -2-metoxipropil 2- (trimetilamônio) etil fosfato	C25 H54 N O6 P	495,37	14,26	1,26E-01		3,40E+00		3,33E-02
(2R)-3-Hidroxi-2 - [(9E, 12E)-9,12-octadecadienoiloxi] propil 2- (trimetilamonio) etil fosfato	C26 H50 N O7 P	519,33	12,65	4,22E-03		1,86E-01		1,22E-01
(2S)-1-Hidroxi-3- (fosfonooxi) -2-propanil D-alaninato	C6 H14 N O7 P	243,05	1,00	7,53E-03		2,58E-02		1,43E-01
(2S)-3-Hidroxi-2 - [(9E)-9-octadecenoiloxi] propil 2- (trimetilamonio) etil fosfato	C26 H52 N O7 P	521,35	13,34	1,36E-01		4,53E+00		3,37E-03
(2 β ,3 β ,9 ξ ,17 ξ ,22R)-2,3,14,20,22- Pentahidroxi Ergosta-7-en-6-ona	C28 H46 O6	478,33	9,53	2,48E-04		1,05E-03		5,07E-02
(3beta)-6- Acetato de nitrocolest-5-en-3-il	C29 H47 N O4	473,35	13,01		2,42E-04	8,04E-02		1,33E-01
(3beta,17E)-17-[[3-Acetato de - (1-pirrolidinil) propil] imino} androst-5-en-3-il	C28 H44 N2 O2	440,34	14,21	1,08E-03		3,84E-02		1,13E+00
(3beta,17E)-17-[[3-Acetato de - (1-pirrolidinil) propil] imino} androst-5-en-3-il	C28 H44 N2 O2	440,34	14,05	2,52E-03		x	1,21E-03	5,09E-01
(4S)-5-Oxo-4- (trifluorometil) -L-prolina	C20 H22 O6	358,14	9,64	3,39E-03		9,44E-03		5,27E-04
(4S)-5-Oxo-4- (trifluorometil) -L-prolina	C6 H6 F3 N O3	197,03	1,67	4,51E+00		1,67E-01		1,64E-01
(E)-N- (Hidroximetilen) glicina	C3 H5 N O3	103,03	1,10	1,88E-01		3,64E+00		3,07E-01
(E)-N- (Hidroximetilen) glicina	C3 H5 N O3	103,03	1,10	1,12E+01	x	x	x	x
(Nitroimino) dimetanol	C2 H6 N2 O4	122,03	0,82	2,29E+00		5,39E+00		1,23E+00
(RS)-3,5-DHPG	C8 H9 N O4	183,05	1,89	1,16E-01		2,86E-01		5,70E-03
(S)-(-)-5-Fluorowillardiina	C7 H8 F N3 O4	217,05	1,24	1,75E+00		3,17E+00		9,41E-01
{(2R)-2 - [(1R)-1,2-Dihidroxi-etil] -4-hidroxi-5-oxo-2,5-dihidro-3-furanil} oxidanil	C6 H7 O6	175,02	2,66	4,24E-01		3,93E-01		1,81E-02
1- (3-Azido-2,3-didesoxipentofuranosil) -5-metil-2,4 (1H, 3H) -pirimidinadiona	C10 H13 N5 O4	267,10	2,87	2,54E+00		2,86E+00		2,07E+00
1- (3-Azido-2,3-didesoxipentofuranosil) -5-metil-2,4 (1H, 3H) -pirimidinadiona	C10 H13 N5 O4	267,10	2,87	x	7,86E-02	x	x	x

Nome do composto	Fórmula	Massa Molecular	RT [min]	A-GM	M-GM	A-GF	M-GF	CDC
1- (beta-D-Arabinofuranosil) -4- (hexadecilamino) -2 (1H) -pirimidinona	C25 H45 N3 O5	467,34	12,74	1,74E-02		6,13E-01		2,32E+00
1- (beta-D-Arabinofuranosil) -4- (hexadecilamino) -2 (1H) -pirimidinona	C25 H45 N3 O5	467,34	15,01		2,59E-02	1,74E-01		8,37E-01
1- [3- (2,6-Dihidroxi-3-isobutiril-4-metoxi-5-metilbenzil) -2,4,6-trihidroxi-5- (2-hidroxi-5-isobutiril-4,6-dimetoxi- 3-metilbenzil) fenil] -2-metil-1-propanona	C37 H46 O12	682,30	15,12	6,50E-04		1,32E-01		7,07E-01
1,1'-pentano-1,5-diildiguanidina	C7 H18 N6	186,16	1,15	3,04E-03		1,37E-03		2,64E-01
1,3-Bis (fosfonooxi) -2-propanil estearato	C21 H44 O10 P2	518,24	11,78	6,86E-03		2,43E-01		1,54E-02
1,4,20-pregnatrien-3-ona	C21 H28 O	296,21	8,18	2,18E-02		2,33E-01		8,92E-02
1,4'-Bipiperidina	C10 H20 N2	168,16	6,78	1,92E-03		1,03E-01		2,57E-04
1,4-Butandiyllbis (di ciclohexilfosfina)	C28 H52 P2	450,35	14,63	8,03E-03		8,81E-02		6,88E-01
1-[(2-Hidroxiethoxi)metil]-1H-1,2,4-triazole-5-carboxamida	C6 H10 N4 O3	186,08	10,70	1,28E+00		1,81E+00		4,68E-01
11-Hidroxi-δ(9)-THC	C21 H30 O3	330,22	9,16		1,38E-04	2,70E-02		7,15E-04
16α-Hidroxiestrona	C18 H22 O3	286,16	10,58	1,17E-03		7,36E-03		2,48E-04
18-Norpregn-4-eno-3,20-diona, 13- (2-propinil) -	C23 H30 O2	338,22	9,17	9,39E-03		1,79E-01		1,39E-03
1-Hexadecanamina	C16 H35 N	241,28	12,37	1,32E-02		3,77E-01		6,50E-01
1-Hidroxi-3- (octadeciloxi) -2-propanil 2- (trimetilamonio) etil fosfato	C26 H56 N O6 P	509,38	14,79	7,44E-03		2,78E-01		2,78E-01
1-Nitro-2- (2-nitroetoxi) etano	C4 H8 N2 O5	164,04	0,80	6,20E-02		1,34E-01		3,98E-02
1-pentofuranosil-2,4 (1H, 3H) -pirimidinadiona	C9 H12 N2 O6	244,07	1,89	3,55E-02		1,83E+00		9,91E-02
1-Pentofuranosil-4- (estearoilamino) -2 (1H) -pirimidinona	C27 H47 N3 O6	509,35	14,27	4,74E-03		4,38E-01		2,12E-01
1-Pentofuranosil-4- (estearoilamino) -2 (1H) -pirimidinona	C27 H47 N3 O6	509,35	13,65	7,10E-03		3,80E-01		1,67E+00
1-Pentofuranosil-4- (estearoilamino) -2 (1H) -pirimidinona	C27 H47 N3 O6	509,35	13,88	1,15E-02		3,70E-01		8,72E-01
1-Pentofuranosil-4- (estearoilamino) -2 (1H) -pirimidinona	C27 H47 N3 O6	509,35	12,26	1,62E-03		5,44E-02	x	6,37E-02
1-tetradecil-sn-glicero-3-fosfocolina	C22 H48 N O6 P	453,32	12,04	1,13E-02		2,31E-01		8,24E-01
1-tetradecil-sn-glicero-3-fosfocolina	C22 H48 N O6 P	453,32	14,21	1,50E-03		5,02E-02		8,93E-01
1-tridecanamina	C13 H29 N	199,23	11,01	4,08E-02		1,46E-01		1,71E-01
2 - [(5E, 8E, 11E, 14E) -5,8,11,14-Icosatetraenoiloxi] -3- (estearoiloxi) propil 2- (trimetilamonio) etil fosfato	C46 H84 N O8 P	809,59	16,68		3,03E-01		9,40E-01	1,05E-02
2- (1- (3-dimetilaminopropil) -5-metoxiindol-3-il) -3- (1H-indol-3-il) maleimida	C26 H26 N4 O3	442,20	9,44	4,21E-03		8,35E-01		4,27E-01

Nome do composto	Fórmula	Massa Molecular	RT [min]	A-GM	M-GM	A-GF	M-GF	CDC
2- (Aminooxi) fenol	C6 H7 N O2	125,05	4,12	1,63E+00		4,51E-01		1,15E-02
2- (Aminooxi) fenol	C6 H7 N O2	125,05	2,66	3,49E-01		1,17E-01		1,61E-01
2- (Dimetilamino) tiazol-5-carboxaldeído	C4 H11 N O3 S	153,05	0,95	7,23E-02		1,11E-01		6,78E-03
2- (Hidroximetil) -1-metil-3,4,5-piperidinetriol	C6 H8 N2 O S	156,04	5,02	7,00E-01		9,01E-03		5,02E-02
2- [12-Hidroxi-3- (2-hidroxi-2-propanil) -6a, 12b-dimetil-8,11-dioxo-1,2,3,4a, 5,6,6a, 8,11,12 , 12a, 12b-dodecahidropirano [3,2-a] xanten-9-il] -4-metil-3-hexanil acetato	C30 H44 O8	532,31	9,21	3,51E-03		9,48E-03		8,85E-01
2- [2- (Tetradeciloxi) etoxi] etanol	C18 H38 O3	302,28	16,03		1,49E-03	5,51E-02		1,54E-01
2-(Hydroxymethyl)-1-methyl-3,4,5-piperidinetriol	C7 H15 N O4	177,10	0,91	5,06E-01			1,77E-02	4,06E-01
2,2' - (1,2-Etanodildiimino) bis [4,6-bis (2-metil-2-propanil) fenol]	C30 H48 N2 O2	468,37	14,90	7,36E-05		1,26E-02		2,27E-01
2,2,5,5-Tetrametil-3-pirrolina-3-carboxamida	C9 H16 N2 O	168,13	1,04	1,71E+00		5,59E+00		3,28E-01
2,2'-Metilenbis [4- metil-6- (2-metil -2-propanil) fenol]	C23 H32 O2	340,24	8,71	2,12E-02		1,89E-01		1,08E-01
2,3-bis [(9E, 12E) -9,12-octadecadienoiloxi] propil 2- (trimetilamonio) etil fosfato	C44 H80 N O8 P	781,56	17,31		5,05E-01	4,27E-01		1,60E-02
2,3-Dihidroxi-2-metilpropil 4- (4-amino-6,7,8-trimetoxi-2-quinazolinil) -1-piperazincarboxilato	C20 H29 N5 O7	451,21	6,18	5,49E-05		2,09E-03		1,36E-01
2,5-Bis (terc-butylperoxi) -2,5-dimetilhexano	C16 H34 O4	290,25	13,16		4,51E-03	7,19E-02		2,02E-01
2,5-DMMA	C12 H19 N O2	209,14	5,51	8,49E-05		3,39E-04		9,77E-03
24-O-pentosyl-5?-cholestane-3?,6,8,15,16?,24-heaol 3-O-sulfate	C32 H55 O13 S	679,34	10,41	4,96E-04		6,48E-03		5,94E-04
2-Amino-1-ciclohexil-1,2,5-tridesoxi-5- (4-morfolinil) -L-arabinitol	C15 H30 N2 O3	286,22	8,01	5,88E-03		5,52E-02		1,97E-01
2-amino-3-piridinol	C5 H6 N2 O	110,05	1,19	7,60E-02		1,10E+00		1,18E-01
2-Amino-7-metil-9-pentofuranosil-7,9-di-hidro-3H-purina-6,8-diona	C11 H15 N5 O6	313,10	2,88	2,12E+00		2,26E+00		1,72E+00
2-Amino-9- (2-desoxipentofuranosil) -7,9-di-hidro-3H-purina-6,8-diona	C10 H13 N5 O5	283,09	3,51	3,95E-02		7,11E-01		2,03E-01
2-Aminoetil-2,3-di- hidroxipropilidrogen -fosfato	C5 H14 N O6 P	215,06	0,91	5,12E-01		2,91E-01		9,54E-01
2-Heptadecil-1H-imidazol	C20 H38 N2	306,30	7,72	2,90E-05		2,22E-04		1,32E-01
2-hexadecilpiridina	C21 H37 N	303,29	12,42	1,69E-01		4,73E+00		5,81E-03
2-Iodohexadecanal	C16 H31 I O	366,14	5,14		8,99E-03	3,38E-02		1,38E-01
2-Metil-2-propanil -4- (4-hidroxifenil) -1-piperazincarboxilato	C15 H22 N2 O3	278,16	5,48	1,19E-04		2,80E-04		2,09E-02

Nome do composto	Fórmula	Massa Molecular	RT [min]	A-GM	M-GM	A-GF	M-GF	CDC
2-piridinilmetil [(2S)-1-[[[(2S, 3S, 5S)-3-hidroxi-1,6-dif enil-5-[[[(3-piridinilmetoxi) carbonil] amino]-2-hexanil] amino]-3-metil-1-oxo-2-butanyl] carbamato	C37 H43 N5 O6	653,32	15,12	6,09E-04		6,01E-02		2,12E-01
2-pirrolidona	C4 H7 N O	85,05	2,27	3,02E-01		1,21E-01		4,12E-02
2-Quinolinol (FG7175000)	C9 H7 N O	145,05	5,97	3,71E-02		1,63E-03		1,36E-01
3-[(2,2-Dimetilpropanoil) oxil]-4-(trimetilamônio) butanoato	C12 H23 N O4	245,16	6,46		2,16E-02	1,82E-01		7,11E-03
3-[(2,6-didesoxi-4-O-hexopiranosilhexopiranosil) oxil]-5,14-dihidroxi-19-oxocard-20(22)-enolida	C35 H52 O14	696,34	8,66	2,49E-03		6,06E-03		5,45E-01
3-(2-Tioxi-2,3-dihidro-1H-imidazol-4-il)-2-(trimetilamônio) propanoato	C9 H15 N3 O2 S	229,09	0,99	3,28E-02		1,88E-01		1,11E-03
3-(2-Tioxi-2,3-dihidro-1H-imidazol-4-il)-2-(trimetilamônio) propanoato	C9 H15 N3 O2 S	229,09	1,03	1,50E-02		1,83E-01		1,56E-01
3-[8-[(Dimetilamino) metil]-6,7,8,9-tetra-hidropirido [1,2-a] indol-3-il]-4-(1-metil-1H-indol-3-il)-1H-pirrole-2,5-diona	C28 H28 N4 O2	452,22	9,44	1,66E-03		1,07E+00		1,19E-02
3,6,9,12,15,18,21-H eptaoxatritriaconta n-1-ol	C26 H54 O8	494,38	14,58	6,10E-03		5,74E-02		5,74E-01
3,6-anidro-1-O-[2-(dodecanoiloxi) etil]-2,4,5-tris-O-(2-hidroxi)etil hexitol	C26 H50 O10	522,34	14,50	1,01E-03		1,24E-01		9,80E-01
3,7,11,15-Tetrametilhexadecil di-hidrogenofosfato	C20 H43 O4 P	378,29	9,99	5,28E-02		2,33E+00		3,03E-01
3-metiladenina	C6 H7 N5	149,07	1,13	2,20E-02		6,41E-04		9,77E-02
3-O-pentossil-5?-Colestano-3?, 6,7,8,15,16?, 26-heptaol 26-O-sulfato	C32 H55 O14 S	695,33	15,12	3,24E-04		1,39E-02		3,45E-02
3-O-sulfo-24,25-dihidromarthasterona (AG VII)	C27 H43 O6 S	495,28	6,17	4,39E-03		1,20E-03		1,92E-02
4-[[[4-Amino-6-(ciclohexilmetoxi)-5-nitroso-2-pirimidinil] amino]-N-(2,3-dihidroxi)propil] benzenossulfonamida	C20 H28 N6 O6 S	480,18	8,51	6,11E-04		3,30E+00		6,62E-01
4-[[[4-Amino-6-(ciclohexilmetoxi)-5-nitroso-2-pirimidinil] amino]-N-(2,3-dihidroxi)propil] benzenossulfonamida	C20 H28 N6 O6 S	480,18	8,61	1,28E+00		9,75E-01	x	1,25E-03
4-(Palmitoilamino)-1-pentofuranosil-2(1H)-pirimidinona	C25 H43 N3 O6	481,32	13,23	9,39E-05		4,20E-01		4,93E+00
4-(Palmitoilamino)-1-pentofuranosil-2(1H)-pirimidinona	C25 H43 N3 O6	481,32	12,43	7,00E-03		2,20E-01		4,25E-01
4-(Palmitoilamino)-1-pentofuranosil-2(1H)-pirimidinona	C25 H43 N3 O6	481,32	14,60	1,36E-02		4,01E-03		1,57E-01
4,5-Dimetoxi-2-nitrobenzaldeído	C9 H9 N O5	211,05	3,27	1,50E-02		4,16E-01		4,85E-04
4,5-Dimetoxi-2-nitrobenzaldeído	C9 H9 N O5	211,05	4,84	3,44E-02		1,76E-01		3,10E-04
4-amino-2-(trifluorometil)-2-butenóico acid	C5 H6 F3 N O2	169,03	0,93	3,25E-01		1,08E-01		1,77E-02
4-aminofenol	C6 H7 N O	109,05	1,15	2,29E-01		2,83E-01		2,31E-02
4-hidroxi desbrisoquina	C10 H13 N3 O	191,11	2,11	5,64E-01		9,06E-04		1,48E-03
4-Iodoanisol	C7 H7 I O	233,95	0,82	9,87E-02		1,50E-01		1,45E-01

Nome do composto	Fórmula	Massa Molecular	RT [min]	A-GM	M-GM	A-GF	M-GF	CDC
4-nitroanilina	C6 H6 N2 O2	138,04	1,72	1,92E+00		9,07E-02		6,94E-02
4-nitrobenzaldeído	C7 H5 N O3	151,03	5,36	4,63E+00		2,03E-02		1,30E-02
5- (4-piridilmetilideno) hexa-hidropirimidina-2,4,6-triona	C10 H7 N3 O3	217,05	1,82	1,33E-03			2,21E-03	2,21E-04
5-acetamido-6-formamido-3-metiluracil	C8 H10 N4 O4	226,07	5,97	3,31E-03		1,33E-02		7,13E-01
5-alil-5- (2-hidroxipropil) -1-fenil-2,4,6 (1H, 3H, 5H) -pirimidinetriona	C16 H18 N2 O4	302,13	6,94	4,12E-04		6,18E-03		3,64E-01
5'-Desoxi-5' - (metilsulfinil) adenosina	C11 H15 N5 O4 S	313,08	2,49	1,84E+00		2,66E-01		1,26E+00
5-Fosfonorvalina	C5 H12 N O5 P	197,05	0,95	3,84E-02		1,23E-01		7,02E-04
5'-O- [Hidroxi (metoxi) fosforil] adenosina	C11 H16 N5 O7 P	361,08	3,00	2,37E-02		7,09E-01		9,89E-03
5-Oxoproilvalilprolilglutaminilriptophilalanilvalilglicilhistidilphenilalanilmethioninamida	C61 H84 N16 O13 S	1280,61	7,26	1,85E-04		1,09E-03		2,24E-01
5 α -colestano-3 β , 6,7,8,15 β , 16 β , 26-heptaol 6-O-sulfato	C27 H47 O10 S	563,29	10,79		3,85E-05	2,41E-02		5,26E-03
5 α -colestano-3 β , 6,7,8,15 β , 16 β , 26-heptaol 6-O-sulfato	C28 H47 O10 S	575,29	5,82	5,81E-04		2,22E-03		3,54E-02
5 α -colestano-3 β , 6,7,8,15 β , 16 β , 26-heptaol 6-O-sulfato	C28 H47 O9 S	559,29	13,34	1,74E-03		3,41E-04		7,29E-02
6 beta hidroxi testosterona	C19 H28 O3	304,20	11,58		4,84E-04	8,02E-03		3,14E-01
6-Amino-1H-benzo [de] isoquinolina-1,3 (2H) -diona	C12 H8 N2 O2	212,06	6,55	3,33E-03		3,33E-04		2,66E-01
7-deazaguanina	C6 H6 N4 O	150,05	2,66	1,82E+00		7,82E-04		1,43E-01
8-quinolinil beta-D-glucopiranosídeo	C15 H17 N O6	307,11	6,69		8,26E-04	4,67E-03		3,85E-01
9- (3-Amino-3-desoxi-beta-D-xilofuranosil) -N-ciclopentil-9H-purin-6-amina	C15 H22 N6 O3	334,18	10,45	5,23E-04		1,54E-02		3,01E-01
9-acetoantraceno	C16 H12 O	220,09	1,08	4,24E-02		2,56E-01		1,41E-02
Acamprosato	C5 H11 N O4 S	181,04	5,13	9,90E+00		6,80E-03		1,79E-02
Acantaglicosídeo A	C56 H89 O27 S	1225,53	10,25	5,87E-05	x	x	6,71E-05	1,63E-03
Acantaglicosídeo B	C56 H89 O28 S	1241,52	9,75	1,10E-03		x	2,23E-01	2,03E-01
Acantaglicosídeo C	C56 H91 O28 S	1243,54	9,37	1,27E-02		9,05E-02		1,15E-03

Nome do composto	Fórmula	Massa Molecular	RT [min]	A-GM	M-GM	A-GF	M-GF	CDC
Aceclidina	C9 H15 N O2	169,11	1,13	1,27E-01		1,34E-01		5,91E-03
Acetato de (3β) -20-Oxopreg-5- en-3-il	C23 H34 O3	358,25	8,72	2,26E-02		2,03E-01		1,15E-01
Acetato de 1-piperazina carboxilato	C7 H14 N2 O2	158,11	1,87	1,62E-01		1,23E-01		6,55E-03
Acetato de Succinimidil	C6 H7 N O4	157,04	5,39	9,91E-03		2,96E-01		1,17E-03
Acetato de Succinimidil	C6 H7 N O4	157,04	5,94	1,34E-02		x	x	2,80E-04
Acido (6R) -3,5-didesoxi-5- (propionilamino) -6 - [(1R, 2R) -1,2,3-trihidroxi-propil] -alfa-L-treo-hex-2-ulopiranosónico	C12 H21 N O9	323,12	1,09	5,20E-03		1,39E-01		2,16E-01
Acido (6R) -5-acetamido-3,5-didesoxi-6 - [(1R, 2R) -1,2-dihidroxi-3- (lactoiloxi) propil] -alfa-L-treo-hex-2-ulopiranosónico	C14 H23 N O11	381,13	2,33	5,18E-01		x	x	1,06E-01
Ácido 1,3,4-trihidroxi-5-oxociclohexanocarboxílico	C7 H10 O6	190,05	2,32	8,87E-02		7,01E-01		2,17E-02
Ácido 1,3,4-trihidroxi-5-oxociclohexanocarboxílico	C7 H10 O6	190,05	2,01	3,45E-02		2,96E-01		2,40E-02
Ácido 1-aminociclopropano carboxílico	C4 H7 N O2	101,05	2,11	4,81E-01		1,92E-01		1,82E-01
Ácido 1-metil-1,2,3,4-tetra-hidro-beta-carbolina-3-carboxílico	C13 H14 N2 O2	230,11	6,65	3,95E-03		6,10E-02		1,55E-01
Ácido 3,5-di-terc-butyl-4-hidroxibenzoico	C15 H22 O3	250,16	11,56	3,83E-04		6,37E-03		2,10E-02
Ácido 4,5,6,7-tetrahidrotieno [3,2-c] piridina-2-carboxílico	C8 H9 N O2 S	183,04	2,49	2,67E-02		1,03E-01		2,87E-03
Ácido 4-dodecilbenzenossulfônico	C18 H30 O3 S	326,19	13,83	3,74E-01		1,15E+00		9,53E-03
Ácido 5- (tetradeciloxi) -2-furóico (TOFA)	C19 H32 O4	324,23	12,59		1,92E-04	2,77E-03		1,53E-01
Ácido 5-amino-7- (3-aminopirrolidin-1-il) -1-ciclopropil-6,8-difluoro-4-oxoquinolina-3-carboxílico (PD-124816)	C17 H18 F2 N4 O3	364,13	10,09	5,42E-04		3,86E-01		2,24E-03
Ácido aminometanossulfônico	C H5 N O3 S	111,00	0,81	3,93E-01		4,54E-01		1,08E-01
Ácido ciclohexano-1,2-diaminotetraacético	C14 H22 N2 O8	346,14	1,30	4,82E-01		3,25E+00		6,55E-02
Ácido cítrico	C6 H8 O7	192,03	1,57	6,86E+00		5,24E-01		6,28E-01
Ácido difenilfosfínico	C12 H11 O2 P	218,05	7,77	4,27E-05		6,24E-04		3,64E-03
Ácido D-α-hidroxi-glutárico	C5 H8 O5	148,04	1,42	9,88E-01		3,73E-01		5,42E-02
Ácido eicosapentaenóico	C20 H30 O2	302,22	12,97	1,44E-04		2,28E-03		5,57E-02
Ácido etilenodiamina-N, N'-diacético (EDDA)	C6 H12 N2 O4	176,08	0,91	6,79E-01		2,63E-01		6,36E-02
ácido fosfopantotênico	C9 H18 N O8 P	299,08	2,93	1,92E-02		1,11E+00		1,40E-02
Ácido fosforamidocianídico	C H3 N2 O2 P	105,99	0,82	8,73E-02		1,15E-01		3,09E-02
Ácido ftálico	C8 H6 O4	166,03	6,57	6,98E+00		2,14E-02		1,66E-01

Nome do composto	Fórmula	Massa Molecular	RT [min]	A-GM	M-GM	A-GF	M-GF	CDC
Ácido icossanodioico	C20 H38 O4	342,28	17,30	1,41E-03		5,35E-02		5,04E-01
Ácido juniperico	C16 H32 O3	272,23	15,17	7,01E-02		7,58E-01		5,28E-01
Ácido N-acetil-L-aspártico	C6 H9 N O5	175,05	1,43	3,39E+00		3,78E+00		2,66E-02
Ácido nicotinúrico	C8 H8 N2 O3	180,05	5,44	8,30E-02		8,82E-02		8,34E-02
Ácido quinurênico	C10 H7 N O3	189,04	6,09	8,98E-02		6,32E-03		2,63E-01
Ácido salicílico	C7 H6 O3	138,03	8,30	6,13E+00		1,48E-01		4,76E-01
Ácido Subérico	C8 H14 O4	174,09	7,18	5,14E+00		5,51E-02		1,09E-01
Ácido Succínico	C4 H6 O4	118,03	2,12	5,51E+00		9,28E-01		3,53E-01
Ácido sulfúrico	H2 O4 S	97,97	0,85	1,30E+00		9,85E-01		5,04E-02
Ácido tranexâmico	C8 H15 N O2	157,11	1,26	5,18E-01		8,34E-01		2,11E-02
Ácido tranexâmico	C8 H15 N O2	157,11	1,29	2,33E-01		2,23E-01		2,88E-02
Ácido tranexâmico	C8 H15 N O2	157,11	1,04	2,65E-01		3,16E-03		9,74E-04
Ácido trans-3-indoleacrílico	C11 H9 N O2	187,06	5,97	5,13E-02		1,19E-02		4,06E+00
Ácido urocânico	C6 H6 N2 O2	138,04	1,72	7,54E+00		2,36E-01		1,35E-01
Adenina	C5 H5 N5	135,05	2,50	4,19E+00		1,96E-01		2,78E-01
Adenina	C5 H5 N5	135,05	2,88	6,28E+00		1,87E-01		9,58E-01
Adenina	C5 H5 N5	135,05	1,18	6,12E+00		1,18E-02		1,16E-01
AG VIII	C27 H41 O8 S	525,25	5,69	1,89E-03		2,15E-03		1,14E-02
Alacepril	C20 H26 N2 O5 S	406,16	1,26	4,42E-02		2,61E-01		4,92E-03
aldeído-D-glucosamina 6-fosfato	C6 H14 N O8 P	259,05	0,99	3,54E-02		2,75E-01		7,67E-03
Alfoscerato de colina	C8 H20 N O6 P	257,10	0,91		1,26E-01	1,86E-01		1,15E+00
Aliskiren	C30 H53 N3 O6	551,39	14,84	6,42E-04		1,52E-02		4,29E-01
Amida C18	C18 H37 N O	283,29	13,60	4,72E-03		1,86E-01		3,49E-01
Anasterosídeo B	C56 H89 O32 S	1305,51	9,47	3,59E-02		2,39E-02		7,94E-03
Antramicina	C16 H17 N3 O4	315,12	6,22	1,77E-02		2,47E-01		6,53E-02

Nome do composto	Fórmula	Massa Molecular	RT [min]	A-GM	M-GM	A-GF	M-GF	CDC
Arabinosilhipoxantina	C10 H12 N4 O5	268,08	3,54	7,24E-01		1,00E+01		4,36E-01
Arsenobetaina	C5 H11 As O2	178,00	0,97	2,20E-01		2,11E-01		3,78E-02
Astemizole	C28 H31 F N4 O	458,25	10,07	1,99E-02		3,12E+00		6,68E-02
Astemizole	C28 H31 F N4 O	458,25	9,39	7,10E-02		1,39E+00		1,59E-01
Astemizole	C28 H31 F N4 O	458,25	10,30	1,34E-01		6,12E-01		1,24E-01
Astemizole	C28 H31 F N4 O	458,25	9,77	1,31E-01		5,85E-02		2,98E-02
Asteriidossídeo C	C62 H102 O31 S	1374,6 1	10,06	4,87E-04		4,88E-01		8,31E-01
Asteriidossídeo C	C62 H102 O31 S	1374,6 1	9,78	3,87E-03		2,61E-02		8,24E-02
Astrosaponina 1, Forbesídeo C	C57 H94 O28 S	1258,5 7	8,80	3,71E-02		1,02E+02		9,80E+00
Astrosaponina 1, Forbesídeo C	C57 H94 O28 S	1258,5 7	9,32	7,20E-02		9,31E+00		4,05E+00
Astrosaponina 1, Forbesídeo C	C57 H94 O28 S	1258,5 6	9,69	5,79E-01		7,79E+00		1,67E-01
Astrosaponina 1, Forbesídeo C	C57 H94 O28 S	1258,5 6	8,72	1,28E+0 0		3,83E-01		2,10E-03
Astrosaponina I ovariana (Co-Aris I; forbeside C)	C57 H93 O28 S	1257,5 6	8,71	6,43E-01		9,17E+00		4,94E+00
Astrosídeo B	C55 H89 O28 S	1229,5 3	9,59	4,03E-03		7,76E-02		1,55E-02
Azilsartana	C25 H20 N4 O5	456,14	9,92	2,50E-04		5,77E-03		1,30E+00
Benzoil-glicil-glicina	C11 H12 N2 O4	236,08	3,14		5,47E -04	1,67E-03		1,35E-01
Bis (2-etilhexil) ftalato	C24 H38 O4	390,28	17,07	1,10E-01		1,91E+00		2,43E+00
Bis (díclohexilfosfino) etano	C26 H48 P2	422,32	13,08	1,46E-03		2,85E-02		2,67E-01
Boc-Gly-OH	C7 H13 N O4	175,08	0,94	5,16E-02		9,38E-02		7,85E-03
Chaksine	C22 H38 N6 O4	450,29	15,34	2,81E-04		2,65E-03		2,56E-01
Ciclo (fenilalanil-prolil)	C14 H16 N2 O2	244,12	7,37	3,47E-04		5,03E-03		2,78E-03
Cortisol 21-mesilato	C22 H32 O7 S	440,19	9,27	3,99E-01		1,68E+01		3,13E-01
Creatina	C4 H9 N3 O2	131,07	0,98	3,72E+0 1		1,85E-01		7,04E-01
Creatinina	C4 H7 N3 O	113,06	0,97	8,58E+0 0		2,81E-02		4,86E-01
Decanoilcarnitina	C17 H33 N O4	315,24	9,81	1,29E-04		1,64E-03		1,98E-02

Nome do composto	Fórmula	Massa Molecular	RT [min]	A-GM	M-GM	A-GF	M-GF	CDC
decilsulfobetaina	C15 H31 N O5 S	337,19	9,77	5,65E-03		8,97E-01		6,74E-02
Decilubiquinona	C19 H30 O4	322,21	12,95	2,23E-03		5,68E-02		4,78E-01
Decilubiquinona	C19 H30 O4	322,21	11,58	7,03E-04		1,26E-02		7,79E-01
Desoximicina	C21 H41 N7 O11	567,29	7,58	1,03E-01		1,16E+00		5,70E-02
dHe-dHe-Qui(-Qui)-He-AG II	C57 H89 O28 S	1253,5 2	10,61		5,78E-04	3,41E-01		1,13E-01
Didecildimetilamonio	C22 H47 N	325,37	13,73	2,04E-02		3,48E-01		1,42E+00
Diidrotimina	C5 H8 N2 O2	128,06	0,96	2,81E-01		3,59E-01		7,01E-02
Dimetil 2,2' - [(1,2-dioxo-1,2-etanodiil) diimino] diacetato	C8 H12 N2 O6	232,07	1,31	3,17E-01		3,34E-02		4,98E-02
Dimetil acetilsuccinato	C8 H12 O5	188,07	1,77	3,90E-02		3,26E-01		2,67E-04
DL-Ácido Glutâmico	C5 H9 N O4	147,05	1,34	6,18E-01		2,25E+00		5,07E-01
DL-Ácido Glutâmico	C5 H9 N O4	147,05	0,93	2,13E+0 1		3,29E-01		5,38E-02
DL-Ácido Láctico	C3 H6 O3	90,03	1,35	2,31E+0 1		1,01E+00		6,29E-01
DL-Ácido Málico	C4 H6 O5	134,02	1,16	1,77E+0 0		4,45E-01		6,38E-02
DL-Arginina	C6 H14 N4 O2	174,11	0,90	3,59E-01		1,02E+00		4,88E-01
DL-Carnitina	C7 H15 N O3	161,10	0,95	4,78E+0 0		1,89E+00		1,00E-02
DL-Carnitina	C7 H15 N O3	161,10	1,28	1,98E-01			8,30E-02	3,14E-01
DL-Cicloserina	C3 H6 N2 O2	102,04	0,82	1,14E-01		1,44E-01		4,12E-02
DL-Glutamina	C5 H10 N2 O3	146,07	0,95	3,16E-01		x	1,03E-01	8,03E-02
DL-Lisina	C6 H14 N2 O2	146,11	0,84	2,59E-01		3,09E-01		3,12E-02
DL-Lisina	C6 H14 N2 O2	146,11	0,89	7,47E-02		9,33E-02		2,51E-01
Edelfosina	C27 H58 N O6 P	523,40	15,89	2,37E-04		1,83E-01		1,84E-01
Elacitarabina	C27 H45 N3 O6	507,33	12,73		3,06E-03	3,25E-01		1,19E+00
Elacitarabina	C27 H45 N3 O6	507,33	14,95	5,72E-04		1,22E-01		2,06E-01
Elacitarabina	C27 H45 N3 O6	507,33	14,70	3,20E-02		3,74E-02		7,45E-01

Nome do composto	Fórmula	Massa Molecular	RT [min]	A-GM	M-GM	A-GF	M-GF	CDC
Enalkiren	C35 H56 N6 O6	656,43	15,03	2,10E-03		5,20E-01		1,80E+00
Estearoiletanolamida	C20 H41 N O2	327,31	14,32	4,68E-02		1,74E+00		7,62E-02
Éter beta-guaiacil de veratrilglicerol	C18 H22 O6	334,14	12,15	2,53E-01		9,01E-01		6,59E-01
Éter monobutílico de trietilenoglicol	C10 H22 O4	206,15	7,97	1,69E-04		3,80E-03		4,20E-02
Éter monodecílico de decaetilenoglicol	C32 H66 O11	626,46	14,43	1,87E-03		2,16E-02		2,72E-01
Etil (2Z) -2 - [(2-nitrofenil) hidrazono] -3-oxobutanoato	C12 H13 N3 O5	279,09	0,90		4,64E-02	1,03E-01		2,28E-01
Etiracetam	C8 H14 N2 O2	170,11	1,81	2,12E-02		9,85E-02		3,09E-03
Fator ativador de plaquetas	C26 H54 N O7 P	523,36	14,63	1,50E-01		5,54E+00		9,23E-03
Forbesídeo E	C27 H42 O13 S2	638,21	8,37	2,84E-03		1,55E+00		7,08E-02
Fosfato de 2-hidroxi-3- (tetradecanoiloxi) propil 2- (trimetilamônio) etil	C22 H46 N O7 P	467,30	13,83	3,04E-04		2,23E-01		4,00E-01
Fosfato de 2-hidroxi-3- (tetradecanoiloxi) propil 2- (trimetilamônio) etil	C22 H46 N O7 P	467,30	11,77	5,87E-03		7,74E-03		3,89E-01
Fosfocolina	C5 H14 N O4 P	183,07	0,90	1,50E-01		1,36E-01		1,83E-02
Furfural	C5 H4 O2	96,02	0,82	7,13E+00		1,06E-01		2,25E-01
g-Butirobetaína	C7 H15 N O2	145,11	0,99	1,17E+00		6,99E-01		2,13E-01
Ginocardina	C12 H17 N O8	303,09	5,95	2,23E-02		2,27E-01		7,34E-04
Glicerol 3-fosfato	C3 H9 O6 P	172,01	0,91	3,52E+00		2,65E-02		3,32E-01
Glicilglicilglicilglicilglicilglicilglicilglicilglicilglicina	C20 H32 N10 O11	588,22	5,40	2,39E-01		6,36E+00		2,26E-01
Glicilglicilglicilglicilglicilglicilglicilglicilglicilglicina	C20 H32 N10 O11	588,22	5,71	7,12E-01		1,57E+00		7,18E-02
Glicilglicilglicilglicilglicilglicilglicilglicilglicilglicina	C20 H32 N10 O11	588,22	5,55	x	x	x	1,63E-01	x
Glicina	C2 H5 N O2	75,03	0,93	6,40E-01		1,72E-01		1,31E-01
Glicina	C2 H5 N O2	75,03	0,90	6,26E-01		1,98E-02		8,81E-02
Glicobismina A	C37 H34 N2 O6	602,24	5,50	5,08E-01		4,09E+00		1,62E-01
Glicosídeo B , Forbesídeo B	C56 H92 O28 S	1244,55	8,91	3,26E-03		6,25E+01		1,44E-01
Glicosídeo B , Forbesídeo B	C56 H92 O28 S	1244,55	9,18	1,73E-03		4,62E+00		1,72E-01

Nome do composto	Fórmula	Massa Molecular	RT [min]	A-GM	M-GM	A-GF	M-GF	CDC
Glicosídeo B , Forbesídeo B	C56 H92 O28 S	1244,5 5	9,22	1,55E-02		6,70E-01		1,11E+01
Glicosídeo B , Forbesídeo B	C56 H92 O28 S	1244,5 5	9,26	1,05E-02		3,86E-01		3,95E-02
Glicosídeo B , Forbesídeo B	C56 H92 O28 S	1244,5 5	9,61	7,50E-01		3,74E-01		2,21E-02
Glicosídeo B , Forbesídeo B	C56 H92 O28 S	1244,5 5	8,68	6,16E-02		2,59E-01		6,43E-03
Glicosídeo B , Forbesídeo B	C56 H92 O28 S	1244,5 5	9,31	2,52E-02		2,20E-01		2,92E-03
Gli-l-pro	C7 H12 N2 O3	172,08	1,07	8,98E+0 0		9,90E+00		2,75E-01
Gli-Phe	C11 H14 N2 O3	222,10	6,00	9,32E-04		1,35E-02		1,52E-01
Goniopectenosídeo B	C57 H93 O27 S	1241,5 6	10,27	5,48E-03		2,96E-01		1,82E+00
Guanina	C5 H5 N5 O	151,05	3,50	2,10E-01		1,32E-01		4,20E-01
Guanina	C5 H5 N5 O	151,05	1,18	1,17E+0 0		5,24E-02		3,75E-02
He-dHe-He-yl(-Qui)-Qui-AG VI	C64 H105 O33 S	1433,6 3	7,03	3,23E-05		1,07E-04		5,33E-03
Hexamidina	C20 H26 N4 O2	354,21	13,54	4,81E-02		7,52E-01		1,48E+00
Hexanoilcarnitina	C13 H25 N O4	259,18	7,46	1,60E-02		1,70E-01		3,13E-02
Hexanoilcarnitina	C13 H25 N O4	259,18	7,34	6,57E-03		7,12E-02		1,46E-03
Hexil (2E) -2 - [(5-nitro-2-furil) metileno] hidrazinocarboxilato	C12 H17 N3 O5	283,12	1,28	8,72E-02		6,11E-01		3,18E-02
Hidroximetilfurfural	C6 H6 O3	126,03	5,68	3,80E+0 0		3,63E+00		7,84E-02
Hipoxantina	C5 H4 N4 O	136,04	1,36	8,36E-01		2,09E+00		8,88E-02
Hipoxantina	C5 H4 N4 O	136,04	1,37	8,10E-01		1,59E-01		6,65E-02
Hipoxantina	C5 H4 N4 O	136,04	3,54	9,39E-01		3,77E-03		6,75E-02
Histamina	C5 H9 N3	111,08	0,81	5,85E-03		1,14E-03		9,28E-02
Histidilprolifenilalanilhistidilleucilleucylvaliltirosina	C52 H72 N12 O10	1024,5 5	12,44	7,61E-03		7,46E-01		2,99E-02
Impureza B de Sulpirida	C9 H11 N O5 S	245,04	4,48	2,47E-02		4,25E-03		1,18E+00
Indolina	C8 H9 N	119,07	5,04	1,12E+0 0		4,75E-01		4,05E-01
Intermediários DYE	C14 H12 N2 O3	256,08	4,93	2,38E-04		2,47E-03		1,60E-01

Nome do composto	Fórmula	Massa Molecular	RT [min]	A-GM	M-GM	A-GF	M-GF	CDC
Isoxil	C10 H17 N3 O2	211,13	0,91	7,87E-02		2,26E-01		2,97E-02
Itoprida	C20 H26 N2 O4	358,19	8,02	4,57E-02		6,38E-03		5,61E-01
L-(+)-Ácido aspártico	C4 H7 N O4	133,04	1,05	6,97E-01		5,15E-01		4,65E-02
L-(+)-Alanine	C3 H7 N O2	89,05	0,92	1,66E+00		1,48E-01		9,83E-02
L-(+)-Leucina	C6 H13 N O2	131,09	2,33	1,19E+00		1,63E+00		8,54E-02
L-(+)-Leucina	C6 H13 N O2	131,09	2,58	2,15E+00		7,13E-01		1,14E+00
L-(+)-Leucina	C6 H13 N O2	131,09	0,96	9,86E-01		4,03E-02		6,47E-01
L-(+)-Valina	C5 H11 N O2	117,08	1,25	8,31E-01		5,22E-02		3,16E-01
L-(+)-Valina	C5 H11 N O2	117,08	0,94	4,26E-01		1,37E-02		1,71E-01
L-(+)-Valinol	C5 H13 N O	103,10	0,91	6,55E+00		2,20E-01		6,89E-01
L-3-nitrotirosina	C9 H10 N2 O5	226,06	5,45	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00
L-3-nitrotirosina	C9 H10 N2 O5	226,06	5,46	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00
L-Ácido glutâmico	C5 H9 N O4	147,05	1,01	1,97E-02		4,34E-01		2,36E-01
L-Ácido glutâmico	C5 H9 N O4	147,05	0,94	2,96E+00		2,02E-01		3,47E-02
L-Ácido Piroglutâmico	C5 H7 N O3	129,04	1,67	3,17E+00		2,26E+00		2,14E-01
L-Ácido Piroglutâmico	C5 H7 N O3	129,04	1,67	3,24E+00		1,45E-01		4,73E-04
L-alfa-aspartil-L-alfa-aspartil-L-alfa-aspartil-L-alfa-aspartil-L-lisina	C22 H34 N6 O14	606,21	6,17	1,54E-02		2,15E-01		6,80E-04
Laureth-2	C16 H34 O3	274,25	14,74	1,26E-02		1,01E-01		1,91E-01
Leu-ala	C9 H18 N2 O3	202,13	1,29	3,57E-02		2,34E-01		7,27E-03
L-Fenilalanina	C9 H11 N O2	165,08	5,04	4,18E+00		1,66E+00		1,48E+00
Lisil-N- [4- (9-acridinilamino) fenil] glicinamida	C27 H30 N6 O2	470,24	12,80	1,86E-04		3,82E-03		2,14E-01
Lisolecitina	C24 H50 N O7 P	495,33	13,14	9,40E-02		3,38E+00		1,37E+00
Lisolecitina	C24 H50 N O7 P	495,33	12,86	7,10E-03		2,73E-01		7,73E+00

Nome do composto	Fórmula	Massa Molecular	RT [min]	A-GM	M-GM	A-GF	M-GF	CDC
Liso-PAF-C16	C24 H52 N O6 P	481,35	13,48	8,83E-01		2,30E+01		7,42E-03
L-Prolina	C5 H9 N O2	115,06	0,99	2,45E+00		1,58E-01		9,15E-03
L-Prolinamida	C5 H10 N2 O	114,08	0,84	2,55E-01		3,05E-01		2,50E-01
L-Tianina	C7 H14 N2 O3	174,10	1,00	2,47E-01		3,88E-01		4,36E-02
L-Tirosina	C9 H11 N O3	181,07	2,12	7,29E-01		4,75E-01		4,34E-01
lys-leu-lys-leu	C24 H48 N6 O5	500,37	15,96	3,69E-03		5,30E-02		3,54E-01
Mesalazina	C7 H7 N O3	153,04	1,15	1,27E+00		4,63E+00		3,33E-02
Mesalazina	C7 H7 N O3	153,04	2,66	8,81E-01		9,51E-01		1,78E-01
Metil N - {[(2-metil-2-propanil) oxi] carbonil} fenilalanil-2-metilalanilleucinato	C25 H39 N3 O6	477,29	12,61	2,49E-02		2,70E+00		7,62E-02
Metil-1-pentil-1H-indol-3-carboxilato	C15 H19 N O2	245,14	8,18	1,19E-03		9,58E-03		2,59E-03
Metil-3-aminobenzoato	C8 H9 N O2	151,06	1,00	1,06E-01		9,14E-02		9,69E-03
Minutosídeo A	C32 H53 O12 S	661,33	4,73	5,99E-04		7,30E-02		4,76E-04
Minutosídeo A	C32 H53 O12 S	661,33	5,05	1,52E-03		4,15E-02		3,34E-04
Minutosídeo Dissulfatado A	C32 H54 O9	582,38	9,03		6,35E-05	9,10E-04		7,51E-03
Minutosídeo Dissulfatado A	C32 H54 O9	582,38	9,55	1,39E-04		7,69E-04		1,05E-02
Monofosfato de adenosina	C10 H14 N5 O7 P	347,06	1,18	4,57E-01		1,86E+00		2,61E-01
Monofosfato de adenosina	C10 H14 N5 O7 P	347,06	2,80	1,82E-02		1,96E-01		2,43E-02
Monofosfato de uridina (UMP)	C9 H13 N2 O9 P	324,04	1,08	1,01E-01		1,82E+00		9,26E-02
N - [(4E) -1,3-Dihidroxi-4-octadecen-2-il] icosanamida	C38 H75 N O3	593,57	16,56	5,97E-03		2,46E-01		4,97E-02
N - {[(2S) -3-Butoxi-2-hidroxi-3-oxopropil] (isobutil) carbamoil} -3- (2-naftil) -L-alanina	C25 H34 N2 O6	458,24	13,37	4,41E-02		2,00E+00		9,27E-01
N- (1,3-dihidroxi-octadec-4-en-2-il) acetamida	C20 H39 N O3	341,29	13,91	5,68E-03		2,19E-01		2,40E-01
N- (2-Aminoetil) -N'-ciclohexil-1,2-etanodiamina	C10 H23 N3	185,19	0,72	3,46E-01		2,04E-01		3,07E-04
N- (2-Aminoetil) -N'-ciclohexil-1,2-etanodiamina	C10 H23 N3	185,19	6,79	2,30E-03		4,62E-02		1,27E-01
N- (2-Hidroxi-propil) metacrilamida	C7 H13 N O2	143,09	1,01	1,88E+00		1,19E+00		1,21E-01
N- (2-Hidroxi-propil) metacrilamida	C7 H13 N O2	143,09	0,95	1,93E+00		4,35E-01		1,07E-01
N- (3-Metilbutanoil) tirosil-N- [1- (4-hidroxifenil) -3-oxo-2-propanil] leucinamida	C29 H39 N3 O6	525,28	12,36	1,79E-02		6,46E-01		3,89E-03

Nome do composto	Fórmula	Massa Molecular	RT [min]	A-GM	M-GM	A-GF	M-GF	CDC
N- (3-Metilbutanoil) tirosil-N- [1- (4-hidroxifenil) -3-oxo-2-propanil] leucinamida	C29 H39 N3 O6	525,28	13,27	5,98E-03		1,80E-01		5,95E-02
N- (4-aminofenil) octadecanamida	C24 H42 N2 O	374,33	8,17	1,14E-04		5,10E-04		3,47E-01
N- (tert-Butoxicarbonil) -L-leucina	C11 H21 N O4	231,15	5,69	3,51E-02		7,79E-01		2,44E-01
N- (tert-Butoxicarbonil) -L-leucina	C11 H21 N O4	231,15	5,79	8,94E-02		2,44E-01		4,44E-02
N ~ 6 ~ - [(1E) -3-Oxo-1-propen-1-il] -L-lisina	C9 H16 N2 O3	200,12	1,26	3,74E-02		2,15E-01		6,92E-03
N, N'-Metilenobisacrilamida	C7 H10 N2 O2	154,07	1,04	9,20E+00		1,11E+01		1,05E+00
N-2-acetilguanina	C7 H7 N5 O2	193,06	5,21	1,47E-02		2,07E-03		3,38E-01
N-2-acetilguanina	C7 H7 N5 O2	193,06	5,21	1,64E-01	x	x	x	9,15E-02
N3, N4-Dimetil-L-arginina	C8 H18 N4 O2	202,14	1,00	5,46E-03		2,46E-02		7,55E-02
N6, N6, N6-trimetil-L-lisina	C9 H20 N2 O2	188,15	0,89	6,30E-02		8,90E-02		1,38E-01
N-acetilvalina	C7 H13 N O3	159,09	0,94	2,48E+00		x	1,21E+00	2,99E-01
Naftalen-2-amina	C10 H9 N	143,07	6,52	7,26E-02		2,40E-02		3,10E-01
Nalfa-acetil-N- (4-nitrofenil) -L-tirosinamida	C17 H17 N3 O5	343,12	1,76	2,39E-02		5,21E-01		4,59E-03
Não Identificado	C57 H90 O27 S	1238,54	9,73	1,08E-02		6,77E-02		2,98E-01
Não Identificado	C57 H90 O27 S	1238,54	9,24	2,89E-04		5,34E-02		1,40E-03
Não Identificado	C57 H90 O27 S	1238,54	10,18	9,21E-03		4,07E-02		2,40E-02
Não Identificado	C57 H90 O27 S	1238,54	8,85	2,83E-03		1,89E-02		4,67E-04
Não Identificado	C57 H90 O27 S	1238,54	9,11	5,36E-04		9,98E-03		3,02E-03
Não Identificado	C57 H90 O27 S	1238,54	9,33	2,04E-02		5,45E-03		3,08E-04
Não Identificado	C57 H92 O28 S	1256,55	9,02	4,70E-03		1,62E-01		4,52E-01
Não Identificado	C57 H92 O28 S	1256,55	8,90	2,01E-01		8,76E-02		1,47E-02
Não Identificado	C57 H92 O28 S	1256,55	9,19	5,74E-03		8,53E-02		5,57E-02
Não Identificado	C57 H92 O28 S	1256,55	8,86	2,02E-01		7,70E-02		4,43E-02

8. ANEXOS

Nome do composto	Fórmula	Massa Molecular	RT [min]	A-GM	M-GM	A-GF	M-GF	CDC
Não Identificado	C57 H92 O28 S	1256,5 5	6,96	6,76E-03		7,15E-02		9,64E-03
Não Identificado	C57 H92 O28 S	1256,5 5	8,47	1,66E-01		6,81E-02		1,79E+00
Não Identificado	C57 H94 O29 S	1274,5 6	10,70	5,06E-05		1,99E+01		4,63E-01
Não Identificado	C57 H94 O29 S	1274,5 6	8,35	2,36E-03		4,42E+00		8,61E-02
Não Identificado	C57 H94 O29 S	1274,5 6	8,57	3,84E-04		3,94E+00		7,51E-02
Não Identificado	C57 H94 O29 S	1274,5 6	9,12	5,27E-03		2,63E+00		2,30E-02
Não Identificado	C57 H94 O29 S	1274,5 6	8,22	1,39E-03		2,20E+00		1,67E-02
Não Identificado	C57 H94 O29 S	1274,5 6	9,33	8,48E-03		1,95E+00		3,44E-03
Não Identificado	C57 H94 O29 S	1274,5 6	8,63	3,78E-02		1,48E+00		1,69E-03
Não Identificado	C57 H94 O29 S	1274,5 6	9,53	3,21E-01		1,09E+00		3,85E-01
Não Identificado	C57 H94 O29 S	1274,5 6	7,91	5,53E-03		7,02E-01		1,58E-03
Não Identificado	C57 H94 O29 S	1274,5 6	8,27	2,53E-02		6,98E-01		4,14E-02
Não Identificado	C57 H94 O29 S	1274,5 6	9,45	8,32E-03		5,07E-01		1,89E-02
Não Identificado	C57 H94 O29 S	1274,5 6	10,64		2,31E-04	2,54E-01		1,97E-01
Não Identificado	C57 H94 O29 S	1274,5 6	11,11		3,69E-04	2,28E-01		1,01E-02
Netupitant	C30 H32 F6 N4 O	578,25	7,33	1,98E-04		1,60E-03		1,33E-01
N-Formilaspártato	C5 H7 N O5	161,03	1,21	6,51E-01		9,43E-01		5,59E-02
Nicomol	C34 H32 N4 O9	640,22	5,15	1,02E-04		1,90E-01		3,98E-03
Nicotinamida	C6 H6 N2 O	122,05	1,33	2,00E+00		1,06E+00		5,39E-02
Nicotinamida	C6 H6 N2 O	122,05	1,33	3,46E+00		2,78E-03		3,59E-03
Nicotinato de vitamina E	C35 H53 N O3	535,40	15,09	1,09E-01		1,67E+00		3,69E-02
Nitrato de 2-etilhexila	C8 H17 N O3	175,12	1,31	1,24E-01		5,68E-01		4,42E-02
Nitrato de 2-etilhexila	C8 H17 N O3	175,12	0,97	1,72E-01		5,32E-01		5,41E-02

Nome do composto	Fórmula	Massa Molecular	RT [min]	A-GM	M-GM	A-GF	M-GF	CDC
Nitrato de 2-etilhexila	C8 H17 N O3	175,12	1,23	2,70E-01		5,28E-01		1,08E-02
Nitrosobis(2-oxopropil)amina	C6 H10 N2 O3	158,07	0,92	6,62E-01		3,56E-01		6,64E-02
Nitrosobis(2-oxopropil)amina	C6 H10 N2 O3	186,08	0,82	x	x	x	x	6,18E-02
N-Metilhomoveratrilamina	C11 H17 N O2	195,13	3,14	3,21E-02		2,69E-01		7,15E-03
Norhaman	C11 H8 N2	168,07	6,73	2,59E-01		2,58E-02		1,08E-01
Novo anticoagulante oral (NOAC)	C27 H49 N3 O5	495,37	14,26	1,73E-01		5,07E+00		6,26E+00
N-Palmitoil-O-fosfono-L-tirosina	C25 H42 N O7 P	499,27	11,62	6,65E-02		2,23E+01		2,35E+00
N-Palmitoil-O-fosfono-L-tirosina	C25 H42 N O7 P	499,27	11,78	7,98E-01		5,44E+00		4,30E-01
Octa-hidro-1,2,8-indolizinetriol	C8 H15 N O3	173,10	1,04	2,53E-01		2,28E-01		1,91E-02
Octa-hidro-2H-pirido [1,2-a] pirazina	C8 H16 N2	140,13	1,06	1,12E-01		1,66E-01		7,03E-03
Octilamina	C8 H19 N	129,15	6,36	5,16E+00		2,43E-01		2,45E+00
Olodaterol	C21 H26 N2 O5	386,18	11,36	5,71E-02		9,10E-01		3,32E+00
Ophidianosídeo C	C54 H87 O27 S	1199,51	8,65	6,74E-04		1,43E-02		1,26E-03
Oxetacaína	C28 H41 N3 O3	467,32	12,35		4,51E-04	2,44E+00		1,93E-01
Óxido de dimetil (2-tridecanil) amina	C15 H33 N O	243,26	11,01	1,04E-03		x	1,88E-03	2,73E-01
Óxido de laurildimetilamina	C14 H31 N O	229,24	11,26	5,85E-03		1,93E-01		1,98E+00
Óxido de trifetilfosfina	C18 H15 O P	278,09	10,09	1,97E-02		1,63E-01		2,95E-01
Ozagrel	C13 H12 N2 O2	228,09	6,58		1,39E-04	2,01E-04		1,37E-01
Pectinosídeo F	C62 H101 O33 S	1405,59	9,79	1,14E-03		8,40E-03		2,20E+00
Picrasin C	C23 H34 O7	422,23	13,81	2,60E-02		6,45E-01		1,09E+00
Piperidina	C5 H11 N	85,09	1,29	3,93E-01		1,85E-01		1,18E-01
Piperidina	C5 H11 N	85,09	2,33	1,62E-01		1,36E-01		8,14E-02
Piperidina	C5 H11 N	85,09	2,58	2,07E-01		9,71E-02		3,68E-02
Piracetam	C6 H10 N2 O2	142,07	1,01	1,03E+00		1,53E+00		1,72E-01
Pregabalina	C8 H17 N O2	159,13	1,22	1,09E+00		5,11E-01		5,51E-03

8. ANEXOS

Nome do composto	Fórmula	Massa Molecular	RT [min]	A-GM	M-GM	A-GF	M-GF	CDC
Progesterona	C21 H30 O2	314,22	8,55	6,91E-02		2,96E-01		1,37E-02
Pro-Glu	C10 H16 N2 O5	244,11	1,05	4,59E-02		1,39E+00		1,30E-01
Prolifilfenilalanilarginilserilvalilglutamina	C33 H52 N10 O9	732,39	9,52	4,95E-02		9,78E-03		4,45E+00
Prolilglicililalanilarginina	C22 H41 N9 O6	527,32	12,43	3,70E-02		1,39E-01		7,12E-01
Regularosídeo B	C56 H92 O27 S	1228,5 5	9,92	1,35E-02		2,16E+00		6,50E-01
Regularosídeo B	C56 H92 O27 S	1228,5 5	10,14	2,55E-03		8,36E-01		5,62E-01
Retaspimicina	C31 H45 N3 O8	587,32	11,66	6,53E-01		2,15E+01		2,03E+01
Retaspimicina	C31 H45 N3 O8	587,32	11,83	6,53E-01		6,13E+00		5,18E-03
R-Palmitoil- (1-metil) Etanolamida	C19 H39 N O2	313,30	13,77	4,15E-03		1,67E-01		6,36E-03
Ruberósido B	C57 H94 O27 S	1242,5 7	10,31	1,33E-02		3,24E+00		3,17E-04
Ruberósido B	C57 H94 O27 S	1242,5 7	10,27	1,49E-02		8,11E-02		1,26E+00
Ruberósido B	C57 H94 O27 S	1242,5 7	10,79	6,78E-05	x	x	x	x
Ruberósido G	C57 H92 O27 S	1240,5 6	11,35	3,12E-04		2,83E+01		1,21E+01
Ruberósido G	C57 H92 O27 S	1240,5 6	9,72	1,79E-02		2,34E+01		6,14E-02
Ruberósido G	C57 H92 O27 S	1240,5 5	10,44	9,17E-02			1,58 E+0 0	3,50E-01
Ruberósido G	C57 H92 O27 S	1240,5 5	9,86	7,22E-04			1,58 E+0 0	4,65E+00
Ruberósido G	C57 H92 O27 S	1240,5 5	11,25	2,94E-03		8,50E-01		7,79E-01
Ruberósido G	C57 H92 O27 S	1240,5 5	9,96	2,38E-01		6,63E-01		1,61E-01
Ruberósido G	C57 H92 O27 S	1240,5 5	10,38	5,41E-03		6,01E-01		1,79E-03
Ruberósido G	C57 H92 O27 S	1240,5 5	10,25	2,28E-02		5,30E-01		4,65E+00
Ruberósido G	C57 H92 O27 S	1240,5 5	7,43	9,20E-04		2,18E-02		1,34E-01
Ruberósido G	C57 H92 O27 S	1240,5 5	9,93		6,48E -03	9,27E-03		2,36E-03

Nome do composto	Fórmula	Massa Molecular	RT [min]	A-GM	M-GM	A-GF	M-GF	CDC
S-2-pirimidinil benzenocarbotioato	C11 H8 N2 O S	216,04	1,02	1,80E-01			2,86E-01	2,40E-02
Serotonina	C10 H12 N2 O	176,09	5,97	2,52E-03		4,78E-04		1,13E-01
Spermidina	C7 H19 N3	145,16	6,43	1,26E-02		1,00E-01		6,60E-04
Spermidina	C7 H19 N3	145,16	6,78	2,29E-03		9,68E-02		2,96E-04
Spermina	C10 H26 N4	202,22	0,72	7,61E-02		2,45E-01		2,54E-01
Spirost-5-en-3-ol	C27 H42 O3	414,31	10,07	4,25E-03		5,45E-01		7,88E-02
Stearamida	C18 H37 N O	283,29	16,58	7,44E-03		4,05E-02		1,02E-01
Sulfato de 17-hidroxipregnenolona 17-Hydroxypregnenolone sulfate	C21 H32 O6 S	412,19	8,56	1,45E+01	2,53E+00	1,78E+02	2,01E+01	6,28E+00
Taurina	C2 H7 N O3 S	125,01	0,90	1,20E+00		3,68E-02		4,53E-01
Tenuispinosídeo C	C56 H91 O29 S	1259,53	9,07	5,70E-01		2,70E+01		1,76E+00
Tetracianoetileno	C6 N4	128,01	0,82	4,10E-01		4,48E-01		1,09E-01
Tetraidrocanabinol (THC)	C21 H30 O2	314,22	11,12	3,71E-03		6,34E-02		5,57E-04
Tetraquis [(2Z) -2-fluoro-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-il] difosfato	C40 H64 F4 O7 P2	794,41	6,33	6,12E-05		1,12E-03		1,50E-01
Timidina 5'-monofosfato	C10 H15 N2 O8 P	322,06	1,90	4,89E-02		1,79E-01		8,26E-01
Tridecil benzenesulfonato	C19 H32 O3 S	340,21	17,76	9,51E-02		2,91E-01		5,17E-01
Trietilenoglicol	C6 H14 O4	150,09	4,13	5,13E-01		5,44E-02		1,43E-01
Trigonelina	C7 H7 N O2	137,05	0,96	4,09E-01		9,55E-02		6,12E-02
UDP-GlcNAc	C17 H27 N3 O17 P2	607,08	0,97	1,57E-01		4,92E-01		1,80E-02
Vanilina	C8 H8 O3	152,05	5,45	6,40E-03		9,51E-02		1,19E-03
Versicosídeo A, forbesídeo A	C62 H102 O33 S	1406,60	9,05	2,81E-04		8,87E-01		1,82E+01
Versicosídeo A, forbesídeo A	C62 H102 O33 S	1406,60	9,42	6,14E-02		7,46E-02		1,01E-02
Vesnarinone	C22 H25 N3 O4	395,18	1,26	2,46E-02		1,77E-01		2,71E-03
Victoria Pure Blue BO	C33 H39 N3	477,31	13,01	1,37E-02		3,21E-01		6,48E-02
Vigabatrina	C6 H11 N O2	129,08	1,26	1,44E-01		3,94E-01		2,94E-02

Nome do composto	Fórmula	Massa Molecular	RT [min]	A-GM	M-GM	A-GF	M-GF	CDC
Vigabatrina	C ₆ H ₁₁ N ₂ O ₂	129,08	1,25	1,41E-01		1,45E-01		2,99E-02
Virilon	C ₂₇ H ₄₀ O ₃	412,30	9,17	4,96E-02		8,61E-01		3,99E-02

Onde: A- extrato aquoso; M- extrato metanólico; GM- gónadas masculinas; GF- gónadas femininas; CDC- componentes do disco central; RT: Tempo de retenção (min); x: Composto não detetado; vazio: resulta da junção dos dois extratos para os órgãos GM e GF ficando-se, apenas, com o composto que apresentou maior valor de área normalizada e, o de menor área foi descartado desta análise.