



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISAS E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

IURI BEZERRA DE BARROS

**ESTUDOS QUÍMICOS DE APROVEITAMENTO DO CAUXÍ,
ESPONJA-DE-ÁGUA-DOCE DA AMAZÔNIA**

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior
Co-orientadora: Profa. Dra. Cláudia Cândida Silva

**MANAUS
2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISAS E PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

IURI BEZERRA DE BARROS

**ESTUDOS QUÍMICOS DE APROVEITAMENTO DO CAUXÍ,
ESPONJA-DE-ÁGUA-DOCE DA AMAZÔNIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Doutor em Química, área de concentração em Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior
Co-orientadora: Profa. Dra. Cláudia Cândida Silva

**MANAUS
2013**

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

B277e	<p>Barros, Iuri Bezerra de Estudos químicos de aproveitamento do cauxi, esponja-de-água doce da Amazônia / Iuri Bezerra de Barros. - Manaus: UFAM, 2013. 188 f. : il. color. Tese (Doutora em Química) — Universidade Federal do Amazonas. Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior. Co-orientador: Profª. Drª. Cláudia Cândida Silva</p> <p>1. Esponja – Análise 2. Esponja – Composição 3. Quimiotaxonomia 4. Cerâmica (Tecnologia) I. Veiga Junior, Valdir Florêncio da (Orient.) II. Silva, Cláudia Cândida (Orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título</p> <p style="text-align: right;">CDU (1997): 591-34.04(811)(043.3)</p>
-------	--

IURI BEZERRA DE BARROS

“ESTUDOS QUÍMICOS DE APROVEITAMENTO DO CAUXÍ, ESPONJA-DE-ÁGUA-DOCE DA AMAZÔNIA.”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal do Amazonas,
como requisito para obtenção do título de Doutor em
Química, área de concentração em Química Orgânica.

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior.
Instituto de Ciências Exatas (UFAM)

Dr. Ubirajara Pereira Rodrigues Filho
Intituto de Química de São Carlos (USP)

Dra. Renata Takeara
Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (UFAM)

Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro
Instituto de Ciências Exatas (UFAM)

Dr. Anderson Cavalcante Guimarães
Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (UFAM)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior e a Profa. Dra. Cláudia Cândida Silva pela orientação essencial para a realização deste de trabalho e, principalmente, por todo o apoio e amizade.

À Profa. Dr. Cecilia Volkmer Ribeiro, da Fundação Zoobotanica do Rio Grande do Sul, pela identificação taxonômica do material e todo o apoio recebido.

Ao Prof. Dr. Ubirajara Pereira Rodrigues Filho, a Profa. Dra. Renata Takeara, a Profa. Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro e o Prof. Dr. Anderson Cavalcante Guimarães pela disponibilidade em participar da banca de defesa e inúmeras contribuições na finalizaão deste trabalho.

À Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa do Laboratorio de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará pelos ensaios de citotoxicidade apresentados nesta Tese.

Ao Prof. Dr. Emerson Silva Lima do Laboratório de Atividade Biologica II da Universidade Federal do Amazonas, pelos ensaios enzimáticos apresentados nesta tese.

À Profa. Dra. Ana Luiza Palhares de Miranda e a Profa. Dra. Joselia Alencar de Lima do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Ativas da Universidade Federal do Rio de Janeiro pelos ensaios *in vivo* apresentados nesta tese.

À Profa. Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira e o pós doutorando Dr. Fábio Alessandro Piera da Fundação Oswaldo Cruz - Manaus, pelos ensaios de atividade antimicrobiana apresentados nesta tese.

À todos os professores do Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas pelo conhecimento repassado.

Ao Laboratório de Pesquisa e Ensaios de Combustíveis da Universidade Federal do Amazonas pelo uso do equipamento de fluorescência de raios-X.

Ao Departamento de Geologia da Universidade Federal do Amazonas e a Profa. Dra. Adriana Horbe pelo uso do equipamento de difração de raios-X.

À minha orientadora de mestrado, Profa. Dra. Dalva Trevisan Ferreira da Universidade Estadual de Londrina que me apresentou e recomendou ao Prof. Dr. Valdir.

Aos colegas do grupo de pesquisa Química de Moléculas Bioativas da Amazônia que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas que acompanharam essa jornada.

À CAPES pela bolsa a mim concedida, e ao CNPq, FINEP e FAPEAM pelos financiamentos concedidos ao grupo de pesquisa.

Aos amigos André Rüdiger e Fabiano Vargas que foram minha família em Manaus.

À Dayana Lacerda Custódio que embarcou comigo na aventura de realizar o doutorado na Amazônia.

À minha mãe Maria Lucia Bezerra, meu pai Celso da Silveira de Barros e meu irmão Igor Bezerra de Barros que sempre me apoiaram apesar de toda a distância.

Construa que eles virão.

Ray Kinsella – Campo dos Sonhos (1989)

RESUMO

As esponjas possuem um enorme potencial biotecnológico na pesquisa de produtos naturais devido às diversas atividades biológicas atribuídas a seus extratos e substâncias isoladas. Apesar da maioria dos estudos relatados com esponjas serem de organismos marinhos, existem indícios de grande variabilidade de metabólitos secundários também em esponjas de água-doce. A ausência de estudos químicos desses organismos na Amazônia motivou a realização do presente trabalho, com um amplo levantamento de espécies e estudos de química orgânica e inorgânica. Diversas excursões na região Amazônica permitiram a coleta de esponjas em diferentes rios. A identificação taxonômica foi realizada por meio de técnicas de microscopia óptica, que permitiram observar a notável abundância de espécimes da família Metaniidae destacando os gêneros *Metania* e *Drulia*, e o gênero *Acalle* encontrado com menor frequência. As outras duas famílias relatadas na região neotropical também foram encontradas: Spongillidae, com os gêneros *Trochospongilla* e *Corvospongilla*; e Potamolepidae, com o gênero *Oncosclera*. A composição elementar das esponjas foi determinada por fluorescência de raios-X, permitindo a identificação de algumas características para grupos de esponjas. Pode-se destacar o alumínio ausente no gênero *Metania* e presente em todas as demais espécies estudadas; Ca, K e Ti que não foram detectados somente na espécie *M. fittkaui*; e a espécie *Trochospongilla paulula* apresentou capacidade de acumular vanádio. Foram avaliadas duas metodologias para a purificação da sílica presente nestes organismos, a primeira envolvendo a solubilização e precipitação seletiva, e a segunda envolvendo soluções altamente oxidantes seguida por calcinação. A purificação da sílica permitiu a obtenção de produtos com grau de pureza próximo a sílica disponível comercialmente como suporte para cromatografia líquida. Frações esteroídicas obtidas apartir dos extratos apolares destas esponjas foram derivatizadas e analisadas por cromatografia em fase gasosa, sendo identificados os esteróis majoritários presentes. O esterol 24-etil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol se mostrou majoritário nas amostras das famílias Metaniidae e Potamolepidae, diferenciando-as da Spongillidae na qual o colesterol é encontrado em maior concentração. Foram identificados outros três esteróis 24-metil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol, 24-metil-colesta-5-eno-3 β -ol e 24-etil-colesta-5-eno-3 β -ol e três cetoesteroides colesta-4-eno-3-ona, 24-metil-colesta-4,22-dieno-3-ona e 24-etil-colesta-4,22-dieno-3- até então inéditas em esponjas dulcicolas.

Palavras-chave: Porifera; 24-etil-colesta-5,22-dieno; sílica purificada; biocerâmica.

ABSTRACT

Sponges have enormous biotechnological potential in natural products research due to several biological activities exhibited by their extracts and isolated compounds. Although the majority of studies reported are with marine sponges, there are indications of great variability of secondary metabolites are also present in freshwater sponges. The absence of chemical studies of these organisms in Amazonia motivated the present work, with a broad survey of the species and organic and inorganic chemiscal studies. Several expeditions in Amazon region allowed the collection of sponges in different rivers. Taxonomic identification was performed by means of optical microscopy techniques, which allowed the observation of the remarkable abundance of family Metaniidae specimens of the genus *Metania* and *Drulia*, with the genus *Acalle* also found. The other two families reported in the Neotropics were also found: Spongillidae with genus *Trochospongilla* and *Corvospongilla*, and Potamolepidae, with the genus *Oncosclera*. The elemental composition of the sponges was determined by X-ray fluorescence, allowing the identification of some characteristics for groups of sponges. We can stand out the absent from aluminum in *Metania* genus and presence in all other species studied. Ca, K and Ti were not detected only in the *M. fittkaui* species. The species *Trochospongilla paulula* showed ability to accumulate vanadium. Two methodologies were evaluated for the purification of silica present in these organisms, the first involving the solubilization and selective precipitation, and the second employing highly oxidizing solutions, followed by calcination. The purification of silica afforded the product with purity near of silica commercially available for support to liquid chromatography. Steroidal fractions obtained from apolar sponges extracts were derivatized and analyzed by gas chromatography and the majority sterols were identified. The sterol 24-ethyl-cholest-5,22-dien-3 β -ol proved to be majoritary in the samples of the families Metaniidae and Potamolepidae, different from Spongillidae in which cholesterol is found in highest concentration. There were identified three other sterol 24-methyl-cholesta-5,22-dien-3 β -ol, 24-methyl-cholest-5-en-3 β -ol and 24-ethyl-cholest-5-en-3 β -ol and three ketosteroids cholest-4-ene-3-one, 24-methyl-cholest-4,22-dien-3-one and 24-ethyl-cholest-4,22-dien-3-one so far unpublished in freshwater sponge..

Keywords: Porifera; 24-ethyl-cholest-5,22-dien-3 β -ol; silica; bioceramic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagens de microscopia eletrônica de varreduras de espículas de <i>Drulia uruguayensis</i> (Volkmer-Ribeiro <i>et al.</i> , 2008).....	23
Figura 2: Adriadisiolida, primeiro monoterpeno isolado de <i>Dysidea</i> sp.....	29
Figura 3: Diterpenos tricíclicos isolados de <i>Higginsi</i> sp.	29
Figura 4: Negobinas A-I isoladas de <i>Negonbata</i> sp.	30
Figura 5: Neviotidina-A, isolada de <i>Siphonochalina siphonella</i>	31
Figura 6: N ³ ,5-cicloxantosina isolada de <i>Erylus</i> sp.....	31
Figura 7: 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undeca-7-eno isso de <i>Niphates digitales</i>	32
Figura 8: Espongotimidina e citarabina.....	32
Figura 9: Halicondrina B isolado da esponja <i>Halicondrina okadai</i> e seu derivado mesilato de eribulina.	33
Figura 10: Hemestarilina, isolado da esponja <i>Hemasterella minor</i> , e seu derivado E7974....	34
Figura 11: Neamfina, isolada da esponja <i>Neamphius huxley</i>	34
Figura 12: Alcaloide acetilênico isolado da esponja <i>Leucetta</i> sp.	35
Figura 13: Avarol e avarona, isolados <i>Dysidea avara</i>	35
Figura 14: Manoalida, sesterterpenoide isolado da esponja <i>Luffariella variabilis</i>	36
Figura 15: Contignasterol (IZP 94005) e seus derivados IPL 57092 e IPL 512602.	37
Figura 16: Halistanol trisulfato isolado de <i>Halichondria cf. moorei</i>	38
Figura 17: Trunculinas A e B isoladas de <i>Latrunculia brevis</i>	38
Figura 18: Ácido 6,6-dimetil-heptanóico.	40
Figura 19: Ácidos inéditos descritos nas espécies <i>Ephydatia syruaca</i> , <i>Nudospongilla</i> sp. <i>Cortispongilla barroisi</i>	41
Figura 20: Ácidos graxos da esponja <i>Baicalospongia bacilifera</i>	43
Figura 21: Esteróis relatados em <i>Spongilla lacustris</i> e <i>Ephydatia fluviatilis</i>	45
Figura 22: Esteróis relatados para a esponja <i>Spongilla lacustris</i>	46
Figura 23: Esteróis de <i>Baicalospongia bacilifera</i>	47
Figura 24: Esteróis identificados em <i>Lubomirskia baicalensis</i>	47
Figura 25: α-metilglucopiranósideo isolado de <i>Baicalospongia bacilifera</i>	48
Figura 26: Tetracosano-1-ol-1-O-β-gluco-piranósideo e 1-palmitoil-3-β-D-galactosil-sn-glicerol encontrados em <i>Spongilla lacustris</i>	48
Figura 27: Ácidos encontrados em esponjas marinhas com relevância quimiotaxonômica.	50
Figura 28: Esteróis com anéis ciclopripânicos.	50
Figura 29: Proposto de mecanismo de ação da silicateína α (Cha <i>et al.</i> , 1999).	52
Figura 30: Técnicas cromatográficas.....	56
Figura 31: Esquema básico de um cromatógrafo em fase gasosa.	58
Figura 32: Princípio da fluorescência de raios X.	62
Figura 33: Extração e partição de amostra de coletadas submersas.	66
Figura 34: Metodologia de acetilação.	71

Figura 35: Primeira metodologia de purificação de sílica de espículas de <i>M. reticulata</i>	74
Figura 36: Segunda metodologia de purificação de sílica de espículas de <i>M. reticulata</i>	75
Figura 37: Locais onde foram realizadas coleta de esponjas.....	79
Figura 38: Identificação taxonômica de esponjas realizada durante as coletas em Anavilhanas.	80
Figura 39: Pilastras do porto de Manaus cobertas por esponjas dulcícolas.....	82
Figura 40: Lixo acumulado nas margens do rio Negro, nas proximidades ao porto de Manaus.	82
Figura 41: Locais de coleta no rio Negro, próximos ao município de Manaus, Amazonas (Fonte: Google Earth).....	83
Figura 42: Igarapé Mapi, São Gabriel da Cachoeira, Amazonas (Fonte: Google Earth).....	83
Figura 43: Locais de coleta no arquipélago de Anavilhanas (Fonte: Google Earth).....	85
Figura 44: <i>Metania reticulata</i> fixada a vegetação sujeita a flutuação sazonal das águas do rio Negro.	90
Figura 45: “Tapetes” de <i>Drulia uruguayensis</i> encontrados em Anavilhanas.....	90
Figura 46: Local de coleta na Ilha de Vera Cruz, município de Maués, Amazonas.	92
Figura 47: Locais de coleta no município de Eirunepé, Amazonas (Fonte: Google Earth).	93
Figura 48: Local de coleta no município de Tefé, Amazonas (Fonte: Google Earth).....	93
Figura 49: Locais de coleta no estado do Pará (Fonte: Google Earth).	96
Figura 50: <i>Trochospongilla paulula</i> coletada as margens do rio Tapajós.....	98
Figura 51: <i>Oncosclera navicella</i> coletada as margens do rio Tapajós.	99
Figura 52: Locais de coleta no estado do Mato Grosso.....	99
Figura 53: Diferentes substratos nos quais foram encontradas esponjas.....	101
Figura 54: Exemplo de diagrama de caixa.	107
Figura 55: Diagrama de caixas da concentração de silício (% m/m) nas diferentes espécies de esponja dulcícola analisadas.....	108
Figura 56: Diagrama de caixa da concentração de ferro (% m/m) nas amostras de <i>Metania reticulata</i> nos diferentes pontos de coleta.	108
Figura 57: Diagrama de caixa da concentração de vanádio (% m/m) nas amostras de <i>Metania reticulata</i> nos diferentes pontos de coleta.	109
Figura 58: Diagrama de caixa da concentração de vanádio (% m/m) nas amostras de <i>Trochospongilla paulula</i> nos diferentes locais de coleta.....	110
Figura 59: Diagrama de caixas da concentração de ferro (% m/m) nas diferentes espécies de esponjas dulcícolas analisadas.....	110
Figura 60: Diagrama de caixa da concentração de ferro (% m/m) nas amostras de <i>Drulia uruguayensis</i> nos diferentes pontos de coleta.....	111
Figura 61: Diagrama de caixa da concentração de Fe (% m/m) nas amostras de <i>Metania reticulata</i> nos diferentes locais de coleta.....	112
Figura 62: Diagrama de caixa da concentração (% m/m) de Ca nas diferentes espécies de esponjas dulcícolas analisadas.....	113
Figura 63: Diagrama de caixas da concentração (% m/m) de Ca nas amostraas de <i>Drulia brownii</i> nos diferentes pontos de coleta.	114
Figura 64: Diagrama de caixa da concentração de manganês (% m/m) nas diferentes espécies de esponjas dulcícolas analisadas.	114

Figura 65: Diagrama de caixa para a concentração de manganês (% m/m) nas amostras de <i>Metania reticulata</i> nos diferentes pontos de coleta.....	115
Figura 66: Concentração de sílica nas amostras analisadas.	117
Figura 67: Ampliação do espectro de fluorescência de raios-X por dispersão de energia mostrando a redução na concentração de ferro obeservado na esponja (A), para a sílica purificada método I (B), método II (C) e sílica comercial (D).....	118
Figura 68: Concentração de ferro e potássio nas amostras analisadas.	119
Figura 69: Concentração elementos minoritários presentes nas amostras analisadas.....	119
Figura 70: Ampliação do espectro de fluorescência de raios-X por dispersão de energia mostrando a redução na concentração do enxofre obeservado na esponja (A), para a sílica purificada método I (B), método II (C) e sílica comercial (D).....	120
Figura 71: Esqueleto básico de esterol 3β hidroxilado com insaturação no carbono 5;.....	123
Figura 72: Formação dos íons m/z 273 e 255.....	123
Figura 73: Formação dos íons m/z 231 e 213 em esteróis 3β hidroxilados com cadeia lateral no carbono 17.	124
Figura 74: Formação do íon m/z [M-139] ⁺	125
Figura 75: Íons característicos identificados no espectro de massas do colesterol.	126
Figura 76: Cromatograma de uma fração esteroidica acetilada (A) e B cromatograma da mesma fração com adição de colesterol acetilado (B).	127
Figura 77: Estrutura dos esteróis identificados: colesterol (I); 24-metil-colesta-5,22-dieno- 3β -ol (II), 24-metil-colesta-5-eno- 3β -ol (III); 24-etil-colesta-5,22-dieno- 3β -ol (IV); 24-etil-colesta-5-eno- 3β -ol (V).	128
Figura 78: Agrupamento hierárquico das esponjas dulcícolas em função dos esteróis presentes. Db – <i>Drulia browni</i> ; Dc – <i>D. cristata</i> ; Du – <i>D. uruguensis</i> ; Mf – <i>Metania fittkaui</i> ; Mr – <i>M. reticulata</i> ; Oc – <i>Oncosclera navicella</i> e Tp – <i>Trochospongilla paulula</i>	131
Figura 79: Estrutura dos cetoesteroides detectados: colesta-4-eno-3-oná (VI), 24-metil-colesta-4,22-dieno-3-oná (VII) e 24-etil-colesta-4,22-dieno-3-oná (VIII).....	133
Figura 80: Eliminação da cadeia lateral em conjunto com mais três átamos de carbono para cetoesteroides.....	133
Figura 81: Proposta de fragmentação para a 24-metil-colesta-4,22-dieno-3-oná (VII).	134
Figura 82: Proposta de rota da transformação do colesterol (I) para coprastanol com a colesta-4-eno-3-oná (VI) como intermediário.	135
Figura 83: Cromatograma obtido para a fração volátil da esponja <i>Trochospongilla paulula</i>	137
Figura 84: Inserte empregado para aumentar a concentração da fração volátil de <i>Trochospongilla paulula</i> para analise por cromatografia em fase gasosa.....	137
Figura 85: Cromatograma obtido, empregando o inserte, para a fração volátil da esponja <i>Trochospongilla paulula</i>	138
Figura 86: Variação de volume entre as patas que receberam administração subplantar de carragenina 1% (0,1 ml por pata) e salina em função do tempo.	142
Figura 87: Variação de laténcia entre as patas que receberam administração de carragenina e salina quando submetidas ao estímulo térmico de 51°C.....	143
Figura 88: Estrutura e espectro de massas do colesterol.	184
Figura 89: Estrutura e espectro de massas do colesterol acetilado.	184
Figura 90: Estrutura e espectro de massas do 24-metil-colesta-5,22-dieno- 3β -ol.	185

Figura 91: Estrutura e espectro de massas do 24-metil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol acetilado..	185
Figura 92: Estrutura e espectro de massas do 24-metil-colesta-5-eno-3 β -ol.	186
Figura 93: Estrutura e espectro de massas do 24-metil-colesta-5-eno-3 β -ol acetilado.	186
Figura 94: Estrutura e espectro de massas do 24-etil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol.....	187
Figura 95: Estrutura e espectro de massas do 24-etil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol acetilado	187
Figura 96: Estrutura e espectro de massas do 24-etil- colesta-5-eno-3 β -ol.....	188
Figura 97: Estrutura e espectro de massas do 24-etil- colesta-5-eno-3 β -ol acetilado.	188

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Espécies de esponjas dulcícolas coletadas no rio Negro nas proximidades do município de Manaus.	84
Quadro 2: Relação de material coletado no arquipélago de Anavilhanas.	86
Quadro 3: Espécies encontradas no arquipélago de Anavilhanas	91
Quadro 4: Esponjas coletadas no estado do Amazonas excetuando o rio Negro.	94
Quadro 5: Identificação do material coletado no Pará.	97
Quadro 6: Espécies coletadas no rio Tapajós.	98
Quadro 7: Identificação do material coletado no Mato Grosso.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição elementar das esponjas de água doce (n – número de amostras).....	105
Tabela 2: Dados utilizados na identificação dos esteróis majoritários.....	127
Tabela 3: Esteróis presentes nos extratos em hexano das esponjas de água doce.....	129
Tabela 4: Fragmentos característicos observados para identificação dos cetoesteroides.....	134
Tabela 5: Composição da fração volátil de <i>Trochospingilla paulula</i>	138
Tabela 6: Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais. Os valores apresentados são média ± desvio padrão.	141
Tabela 7: Atividade de inibição da enzima tirosinase de frações esteroídicas de extratos em hexane de esponjas dulcicolas (% inibição a 100 µg.mL ⁻¹).	143

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	17
2.	Objetivos.....	19
2.1.	Objetivo geral	19
2.2.	Objetivos específicos.....	19
3.	Revisão Bibliográfica	20
3.1.	Esponjas.....	20
3.2.	Esponjas de água doce.....	22
3.2.1.	Esponjas de Água doce na Amazônia.....	23
3.3.	Rios da Amazônia.....	27
3.4.	Produtos Naturais de Esponjas	28
3.4.1.	Produtos naturais de esponjas de água doce.....	39
3.4.1.1.	Ácidos graxos de esponjas dulcícolas.	39
3.4.1.2.	Esteróis de esponjas dulcícolas	43
3.4.1.3.	Outros Produtos Naturais relatados em esponjas dulcícolas.....	48
3.4.2.	Quimiotaxonomia	49
3.5.	Espículas.....	51
3.5.1.	Sílica	53
3.6.	Bioindicadores	54
3.7.	Cromatografia	56
3.7.1.	Cromatografia em fase gasosa (CG).....	58
3.7.1.1.	Detectores.....	59
3.7.1.1.1.	Detector de ionização por chama (DIC)	59
3.7.1.2.	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)	59
3.7.1.3.	Derivatização para cromatografia em fase gasosa	60
3.8.	Espectroscopia de fluorescência de raios-X	61
4.	Materiais e Métodos	64
4.1.	Solvente	64
4.2.	Material animal.....	64
4.3.	Preparo dos extratos	65
4.3.1.	Maceração.....	65
4.3.1.1.	Maceração com solventes em ordem crescente de polaridade	65
4.3.1.2.	Maceração em metanol	65
4.3.2.	Extração em aparelho de Soxhlet	66

4.3.3. Extração da fração volátil	67
4.4. Técnicas Cromatográficas	67
4.4.1. Cromatografia em Coluna Aberta.....	67
4.4.2. Cromatografia em Coluna Flash.....	68
4.4.3. Cromatografia com sílica impreganada com KOH	68
4.4.4. Cromatografia em Camada Delgada	69
4.4.5. Cromatografia em fase gasosa	69
4.4.5.1. Cromatografia em fase gasosa dos esteróis.....	70
4.4.5.2. Cromatografia em fase gasosa dos esteróis acetilados.....	70
4.4.5.3. Cromatografia em fase gasosa da fração volátil das esponjas	70
4.5. Acetilação	70
4.6. Fluorescência de raios-X	71
4.6.1. Quantificação dos elementos observados	72
4.7. Difração de raios-X	72
4.8. Obtenção de sílica com alto grau de pureza de esponjas de água doce	73
4.9. Ensaios enzimáticos e biológicos	75
4.9.1. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	75
4.9.2. Avaliação da atividade antiproliferativa.....	76
4.9.3. Avaliação da atividade anti-inflamatória.....	77
4.9.3.1. Ensaios de edema da pata de rato induzida por carragenina e hiperalgesia.	77
4.9.4. Avaliação da atividade de inibição da enzima tirosinase	78
5. Resultados e discussão	79
5.1. Coleta e identificação	79
5.1.1. Estado do Amazonas	80
5.1.1.1. Rio Negro	80
5.1.1.1.1. Anavilhanas	85
5.1.1.2. Demais locais de coleta no Estado do Amazonas	91
5.1.2. Estado do Pará	94
5.1.3. Estado do Mato Grosso	99
5.2. Composição Inorgânica	102
5.3. Purificação de sílica.....	116
5.4. Esteróis majoritários dos extratos em hexano.	122
5.5. Composição da fração volátil de <i>Trochospongilla paulula</i>	136
5.6. Ensaios Biológicos e Enzimáticos.....	139
5.6.1. Atividade antimicrobiana	139
5.6.2. Atividade antiproliferativa.....	140

5.6.3.	Ensaio de edema da pata de rato induzida por carragenina.....	142
5.6.4.	Atividade inibitória da enzima tirosinase.....	143
6.	conclusões.....	144
	Referências	146
	ANEXO I.....	184

1. INTRODUÇÃO

As esponjas, organismos mais simples do Reino Animal, são exclusivamente aquáticas, bentônicas e filtradoras. Sua simplicidade confere grande adaptabilidade, o que resultou na colonização de uma enorme variedade de habitats. São divididas em quatro classes: Calcarea (BOWERBANK, 1864), Hexactinellida (SCHMIDT, 1870), Demospongiae (SOLLAS, 1885) e Homoscleromorpha (BERGQUIST, 1978). As três últimas apresentam espículas de sílica amorfa. Em ambientes dulcícolas apenas a classe Demospongiae é encontrada.

As pesquisas em química orgânica de esponjas marinhas têm possibilitado a descrição de centenas de substâncias novas todos os anos, não sendo raras as descrições de esqueletos inéditos em meio a essa profusão de compostos.

Muitas dessas substâncias apresentam atividades biológicas promissoras, como a espongotimidina. Esse nucleotídeo isolado da esponja caribenha *Cryptotethya crypta* originou a citarabina, indicada para o tratamento de leucemia, o derivado de produto natural marinho há mais tempo no mercado americano (Mayer *et al.*, 2010), reforçando a condição de “hotspot” para as esponjas nas pesquisas em produtos naturais.

As esponjas de água doce apresentam um número significativamente mais restrito de estudos abordando seus metabólitos, sendo mais numerosos com esponjas provenientes do lago Baikal (Rússia), o mais profundo e maior lago de água doce do mundo em volume. Estes trabalhos possibilitaram a identificação de um vasto número de ácidos graxos e esteróis, mostrando que os organismos dulcícolas apresentam uma riqueza metabólica semelhante à encontrada nos marinhos.

A análise dos lipídeos oriundos das esponjas pode ser realizada por meio de técnicas espectrométricas associadas ao comportamento cromatográfico destes produtos naturais e de seus derivados obtidos através de reações de derivatização. A separação dos lipídeos pode ser facilitada empregando técnicas de cromatografia líquida em coluna aberta empregando sílica como fase estacionária sílica, que também pode ser modificada superficialmente para reter determinados grupos de moléculas.

A condição séssil e o grande volume de água que filtram tornam as esponjas um potencial biomonitor dos ambientes em que se encontram. Na bacia Amazônica, a maior bacia hidrográfica do mundo, as esponjas podem representar uma importante ferramenta para

monitorar o impacto antrópico sobre esse bioma. A possibilidade de filtrar ions seletivamente, pode significar ainda uma nova ferramenta de biorremediação para cursos de águas impactados.

A sílica, material que compõe as espículas das esponjas das classes Demospongiae, Homoscleromorpha e Hexactinellida, está envolvida em diversos processos tecnológicos como a fabricação de cerâmicas, a construção civil e a química fina entre outros. A purificação desta sílica credencia as esponjas como uma fonte alternativa para esse insumo.

O estudo químico das esponjas de água-doce da Amazônia avaliando sua composição orgânica e inorgânica é um trabalho inédito, que poderá possibilitar a descoberta de novos produtos naturais com potencial uso biotecnológico. Ressalta-se que estes organismos ocorrem em grande quantidade em algumas localidades na Amazônia, possibilitando sua exploração, o que poderá originar novas fontes de renda para a população.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar os constituintes orgânicos e inorgânicos presentes nas esponjas de água doce e avaliar suas possíveis aplicações biotecnológicas

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Descrever a localização e identificar estes organismos nas bacias dos maiores rios da Região Amazônica
- ✓ Descrever a composição inorgânica das esponjas de água-doce da Amazônia
- ✓ Obter sílica de alto grau de pureza a partir de esponjas dulcícolas.
- ✓ Identificar os componentes majoritários dos extratos de esponjas de água-doce da Amazônia.
- ✓ Identificar os compostos voláteis de esponjas de água doce.
- ✓ Avaliar as atividades antimicrobiana, antiproliferativa, antiinflamatória e inibição da enzima tirosinase de extratos de diferentes polaridades

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Esponjas

As esponjas atraem a atenção da humanidade há muitos séculos devido à sua natureza esponjosa e aos seus diversos usos nas atividades humanas. Aristóteles, na Grécia antiga, já as classificava entre os animais, no entanto as usava como exemplo de organismo com características tanto de planta como de animal (Voultiadou, 2007). A natureza animal das esponjas foi estabelecida, claramente, apenas em 1765, quando se observou correntes internas ativas de águas (Ruppert, Fox e Barnes, 1996; Hickman Jr, Roberts e Larson, 2000).

O próprio nome do filo, Porifera, tem sua origem no grego πόρο = passagem + φέρω = portador, clara referência ao sistema de caminhos pelos quais a água é forçada no interior das esponjas (Voultiadou e Gkelis, 2005; Voultiadou, 2007).

As esponjas são os animais multicelulares mais primitivos, apresentando uma organização bastante simples, com células especializadas, porém estas não se organizam em órgãos ou tecidos (Ruppert, Fox e Barnes, 1996; Hickman Jr, Roberts e Larson, 2000).

A pinacoderma, arranjo de pinacócitos, células finas e planas que recobrem a superfície exterior e parte da superfície interior das esponjas, é o mais próximo de tecido verdadeiro que as esponjas possuem. Algumas destas células possuem o formato da letra “T”, com parte de seus corpos invadindo o mesoílo. Os pinacócitos podem se contrair de forma que todo o animal pode reduzir seu tamanho e controlar o fluxo de água no seu interior (Ruppert, Fox e Barnes, 1996; Hickman Jr, Roberts e Larson, 2000).

Os coanócitos são células ovóides com uma extremidade adjacente ao mesoílo e a extremidade oposta se projeta no interior da espongiocele e sustenta um flagelo circundado por um colar de microvilos. Os coanócitos são responsáveis pelo fluxo de água no interior das esponjas e pela alimentação (Ruppert, Fox e Barnes, 1996; Hickman Jr, Roberts e Larson, 2000).

Estudos morfológicos e moleculares levaram recentemente a uma nova classificação dentro do filo Porifera, originando uma quarta classe, Homoscleromorpha, na qual estão repositionadas algumas esponjas marinhas anteriormente classificadas dentro da classe Demospongiae (Gazave *et al.*, 2012). Mesmo o conceito de que as esponjas constituiriam um

grupo monofilético tem sido questionado em função da existências de indícios de que na realidade sejam quatro grupos monofiléticos: Demospongiae, Hexactinellidae, Homoscleromorpha e Calcarea, porém suas relações ainda não estão bem definidas (Nielsen, 2008).

Com mais de 8.500 espécies no filo, a classe Demospongiae é a que apresenta maior diversidade, e a única encontrada em ambientes dulcícolas (Dembitsky, Rezanka e Srebnik, 2003; Nichols e Wörheide, 2005; Manconi e Pronzato, 2008; Van Soest *et al.*, 2012).

A formação de gêmulas é documentada para esponjas dulcícolas e marinhas. Nestas, arqueócitos preenchidos por alimentos são circundados por espongiócitos que depositam um revestimento duro, composto de material semelhante à espongina e ainda ocorre a incorporação de espículas formando uma estrutura resistente. As gêmulas são capazes de resistir ao congelamento e ressecamento e são capazes de preservar a espécie em condições climáticas extremas (Ruppert, Fox e Barnes, 1996; Hickman Jr, Roberts e Larson, 2000).

Com relação à reprodução sexual, existem espécies de esponjas dióicas, mas há grande predominância de espécies hermafroditas e geralmente produzem os oócitos e o esperma em momentos diferentes. O esperma se origina da transformação de coanócitos e em esponjas da classe Calcarea e algumas Demospongiae os oócitos são originados dos coanócitos. Nas demais esponjas os oócitos são originados a partir de arqueócitos. A maioria das esponjas são organismos vivíparos, o esperma é liberado na água e levado para o interior de outra esponja onde ocorre a fertilização, o zigoto é retido e a nutrição advém do organismo materno, posteriormente uma larva ciliada é liberada. Outras esponjas são ovíparas, o esperma e o oócito são liberados na água (Ruppert, Fox e Barnes, 1996; Hickman Jr, Roberts e Larson, 2000).

O mais antigo registro fóssil de esponja, encontrado na China, data de aproximadamente 580 milhões de anos atrás (Li, Chen e Hua, 1998). Um indício da presença de esponjas em épocas remotas é a presença de 24-isopropilcolestano em petróleo e betume originados nas eras Proterozóica (aproximadamente 1,8 bilhões de anos atrás) e do Mioceno (aproximadamente 15 milhões de anos atrás) (McCaffrey *et al.*, 1994; Sperling *et al.*, 2010).

3.2. Esponjas de água doce

As esponjas, como outros animais que surgiram no mar, invadiram os ambientes dulcícolas em eras geológicas passadas. As movimentações tectônicas, permitiram a invasão continental pelos oceanos, e com o posterior recuo dos oceanos e a formação de grandes lagos de águas salina. O fluxo de água doce dos rios levou à dessalinização destes lagos em um processo lento, que permitiu a adaptação das esponjas a esses novos ambientes (Volkmer-Ribeiro, 1985; Volkmer-Ribeiro e Pauls, 2000; Manconi e Pronzato, 2008).

Segundo Machado (1947), foi L. Plucknet quem primeiro descreveu uma esponja dulcícola, em 1696, mencionando a espécie *Spongia fluviatilis*. Esses animais foram classificados em 1766, por C. Linné, como plantas, cabendo a Lamark, em 1816, demonstrar que os espongiários são animais.

As esponjas de água doce são classificadas em mais de 200 espécies pertencentes a 45 gêneros, distribuídos em seis famílias. Uma sétima família é relatada apenas em registros fósseis (Manconi e Pronzato, 2008).

A região neotropical é onde está relatada a maior diversidade de esponjas dulcícolas com 65 espécies divididas em três famílias: Metaniidae, Potamolepidae e Spongillidae. A família Spongillidae apresenta uma distribuição bastante cosmopolita, sendo registrada em todas as regiões do planeta. A família Potamolepidae está presente nas florestas chuvosas das regiões Neotropical, Afrotropical e ilhas do Oceano Pacífico. A família Metaniidae apresenta uma distribuição Gondwânica, distribuída a partir do círculo tropical de florestas chuvosas das regiões Neotropical, Afrotropical, Oriental e Australiana com um único gênero presente na região Neoártica (Manconi e Pronzato, 2008; Van Soest *et al.*, 2012).

A classificação taxonômica das esponjas está baseada na morfologia das espículas, principalmente das espículas da gemosclera. A Figura 1 traz como exemplo imagem de microscopia eletrônica de varredura das espículas de esponja da espécie *Drulia uruguayensis*.

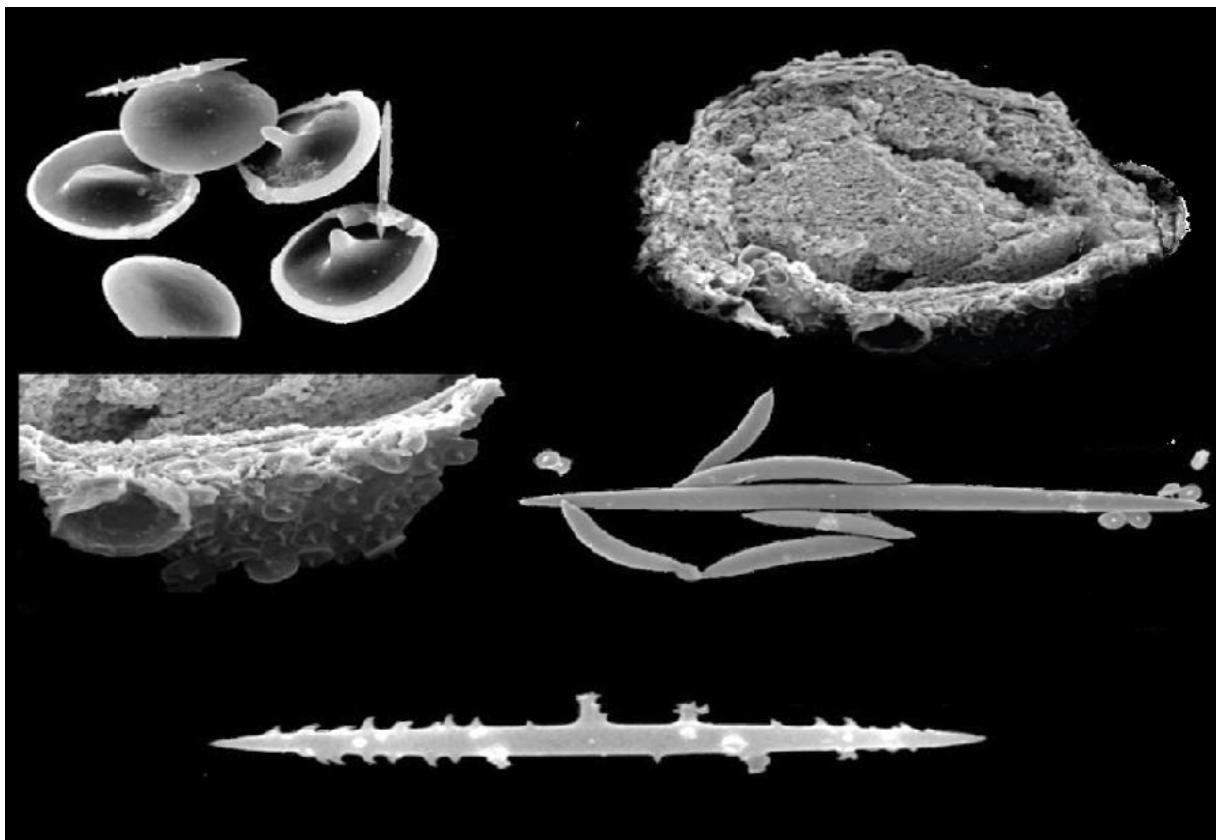


Figura 1: Imagens de microscopia eletrônica de varreduras de espículas de *Drulia uruguayensis* (Volkmer-Ribeiro *et al.*, 2008)

3.2.1. Esponjas de Água doce na Amazônia

Os primeiros relatos da presença de esponjas na Amazônia datam da segunda metade do século XIX, realizados por naturalistas e viajantes europeus (Volkmer-Ribeiro, 1999). Os estudos modernos de taxonomia e populações apresentam como marco inicial o trabalho realizado por Volkmer-Ribeiro e Rosa Barbosa (1972) com esponjas coletadas no rio Juruá. Posteriormente, diversos outros estudos foram publicados mostrando a variedade e relativa facilidade de acesso a estes organismos no período de vazante (Volkmer Ribeiro e Becker Maciel, 1983; Volkmer Ribeiro, 2000; Batista *et al.*, 2003; Fusari, Roque e Hamada, 2009; Volkmer-Ribeiro, Tavares e De Oliveira, 2009).

Um caso relatado de um ribeirinho que ao empurrar com as mãos espalmadas um tronco de madeira dentro de um igarapé, próximo ao rio Solimões, observou grande ardência em suas mãos que, piorou ao tentar lavá-las na água do igarapé. Um outro trabalhador, ao ver o colega na água, o alertou sobre a presença de “cauixi” na água e no tronco em questão,

sendo este provavelmente, o primeiro relato de lesão causada por esponjas de água doce no Brasil (Matta, 1932).

Assim como nas bacias dos rios Solimões e Negro, o prurido produzido ao se banhar em igarapés de águas paradas, em locais e épocas específicas do ano, é atribuída ao “cauxí” (Brazil, 1938).

Um surto de lesões oculares ocorrido em Araguatins, Tocantins, é o primeiro relato cientificamente comprovado de esponjas dulcícolas com patologia ocular. Espículas que revestem as gêmulas de esponjas das espécies *Drulia uruguayensis* e *Drulia ctenosclera* foram encontradas no tecido ocular de banhistas que mergulharam de olhos abertos no rio Araguaia durante o período de águas baixas do ano de 2005 (Volkmer-Ribeiro e Batista, 2007; Volkmer-Ribeiro, Melão e Fonseca-Gessner, 2008).

Estudo com esponja *D. uruguayensis*, mostrou que a esponja intacta pode causar reações inflamatórias devido a possibilidade de perfurar a pele permitindo a entrada de agentes inflamatórios (Magalhães *et al.*, 2011).

As palavras cauxí, cauixi e cauí são empregadas na Região Amazônica para denominar as esponjas dulcícolas. Diferentes origens distintas são atribuídas a estas palavras. Uma possibilidade seria corruptelas da palavra “açaí”, queimar-se em tupi, ou “cai”, de origem guarani que significa queimadura (Matta, 1932). Outra origem seria a palavra “caucy”, formada pelas palavras do nheengatú, “cauy” que significa coceira e “cy” que significa mãe, portanto o caucy, ou cauxí, seria a “mãe da coceira” (Brazil, 1938; Machado, 1947).

Os índios Carajás pulverizavam as esponjas e calcinadas, ou não, as adicionavam a argila com a qual fabricavam peças de cerâmica (Machado, 1947). Artefatos arqueológicos encontrados na região de Cachoeira-Porteira, estado do Pará sugerem que os índios desta região também empregavam esponjas dulcícolas na confecção de suas cerâmicas (Costa *et al.*, 2004).

Estudos com espécimes coletados na Amazônia levaram à criação da família Metaniidae reunindo os gêneros *Metania* GRAY, *Corvomeyenia* WELTNER, *Acalle* GRAY e *Drulia* GRAY, anteriormente classificados na família Spongillidae GRAY, além da descrição de uma nova espécie, *Metania subtilis* (Volkmer-Ribeiro, 1979; 1984; 1986).

A espécie *Metania spinata* CARTER foi redescrita juntamente com uma nova espécie, *Metania kiliani*, com ocorrência na bacia Amazônica, originando uma nova chave de identificação para o gênero *Metania* (Volkmer-Ribeiro e Costa, 1992).

A espécie *Drulia ctenosclera* foi descrita originalmente a parir de material coletado no rio Negro (Volkmer-Ribeiro e Mothes De Moraes, 1981) o gênero *Drulia* foi revisado com base em material coletado em toda região neotropical, ampliando a descrição das espécies, *D. browni* BOWERBANCK, *D. cristata* WELTNER, *D. conifera* BONETTO & EZCURRA DE DRAGO, originando uma chave de identificação (Mothes De Moraes, 1983).

A espécie *Acalle recurvata* BOWERBANK foi redescrita com base em material coletado no médio rio Juruá, estado do Amazonas, onde sua ocorrência foi relatada também em associação com esponjas do gênero *Trochonspongilla*, *T. gragaria* BOERBANK, *T. paulula* BOWERBANK, *T. lanzamirandai* BONETTO & EZCURRA DE DRAGO, *T. delicata* BONETTO & EZCURRA DE DRAGO (Volkmer Ribeiro e Rosa Barbosa, 1972).

Estudo de coleção de esponjas pertencentes ao gênero *Drulia*, coletados em substratos rochosos em fundos de rios da Região Amazônica, e também os rios Orenoco e São Francisco evidenciou a *Drulia uruguayensis* como espécie frequente na Amazônia, além da abundância das espécies *Drulia cristata*, *Drulia conifera* e *Drulia cienosclera* VOLKMER-RIBEIRO & MOTHES DE MORAES. Uma nova característica da espécie *D. uruguayensis* foi observada levando à redescription da mesma e a redefinição do gênero (Volkmer-Ribeiro e Tavares, 1995).

A ocorrência de espécimes híbridos de duas espécies, *Trochospongilla minuta*, POTTS e *T. delicata* BOWERBANK, pertencentes a família Spongillidae foi relatada no médio rio Juruá. A uniformidade em todos os espécimes estudados levou a descrição de um novo gênero, *Saturnospongilla*, com uma nova espécie *S. carvalhoi* (Volkmer-Ribeiro, 1976).

Trochospongilla variabilis BONETTO & EZCURRA DE DRAGO, *Trochospongilla pennsylvanica* POTTS, espécimes menores encontradas no interior de esponjas maiores pertencentes aos gêneros *Metania* e *Drulia*, foram descritas pela primeira vez em rios da Amazônia, sendo este o primeiro registro de *T. pennsylvanica* na região neotropical. Outras duas espécies novas foram descritas recentemente no rio Cuiiras, Amazonas, *Spongilla spoliata*, e no rio Culene, bacia do rio Xingú, possibilitou a descrição da espécie *Radiospongilla amazonensis* (Volkmer Ribeiro e Becker Maciel, 1983). Sendo a espécie *Spongilla spoliata*, junto com a espécie *Oncosclera navicella* CARTER (Potamolepidae BRIEN) redescrita após análise de material coletado em fundos rochosos de rios da Amazônia, os quais se apresentam como seu habitat preferido (Volkmer-Ribeiro e Tavares, 1997).

O gênero *Trochospongilla* VEJDOWSKY, PENNEY & RACER foi revisitado a partir de material coletado em toda América do Sul, em sua sinonímia foi incluído o gênero *Uruguayella* BONETTO & EZCURRA DE DRAGO e parte do gênero *Uruguaya* HINDE. As espécies *T. tenuissima* BONETTO & EZCURRA DE DRAGO e *T. horrida* BONETTO & EZCURRA DE DRAGO foram adicionadas como sinonímias de *T. minuta*, e *T. leidy* BONETTO & EZCURRA DE DRAGO, 1965, como sinonímia de *T. repens* HINDE (Volkmer-Ribeiro e De Rosa-Barbosa, 1985).

A nova espécie *Dosilia pydanielli* foi relatada com base em material coletado em lagoa no médio rio Uricóera, ilha de Maracá, Roraima (Volkmer-Ribeiro, 1992). Posteriormente, o gênero *Dosilia* foi revisado e a espécie *Heteromeyenia plumosa* WALTNER foram sinomizadas com *Dosilia radiospiculata* MILLS, concluindo com a redefinição das cinco espécies do gênero e apresentando uma chave taxonômica (Cândido, Volkmer-Ribeiro e Fürstenau-Oliveira, 2010).

Análise microscópica de sedimentos depositados em lago ancestral quase completamente assoreados na Serra dos Carajás, Pará, apresentou grande quantidade de espículas de *Corvomeyenia thumi* TRAXLER, apresentando indícios do estímulo gerado por períodos de seca na gemulação de esponjas tropicais dulcícolas (Volkmer-Ribeiro e Turcq, 1996).

As esponjas de água doce relatadas na bacia do rio Orenoco, Venezuela, compreendem 15 espécies distribuídas em três famílias: *Spongilla spoliata*, *Saturnospongilla carvalhoi*, *Trochospongilla gragaria*, *T. minuta*, *T. paulula*, da família Spongillidae; *Uruguaya coralliooides* BOWERBANK, *Oncosclera spinifera* BONETTO E EZCURRA DE DRAGO, *O. intermedia* BONETTO & EZCURRA DE DRAGO, *O. navicella*, da família Potamolepidae; e *Drulia browni* BOWERBANK, *D. cristata* WELTNER, *D. uruguayensis*, *D. conifera*, *Metania reticulata* BOWERBANK, *Acalle recurvata*, da família Metaniidae. Espongofauna bastante semelhante a encontrada na bacia do rio Amazonas, a qual se liga a bacia do rio Orinoco pelo rio Casiquiare que liga o rio Negro ao rio Orinoco (Volkmer Ribeiro e Pauls, 2000).

Amplo estudo em área da bacia do rio Araguaia, Amazônia central, possibilitou o registro de diversas espécies de três diferentes famílias: Spongillidae, representada pelas espécies *Trochospongilla gragaria*, *T. paulula*, *T. repens* HINDE, *T. lanzamirandai*, *T. delicata*, *Corvospongilla seckti* BONETTO & EZCURRA DE DRAGO, *Radiospongilla amazonensis*, *Saturnospongilla carvalhoi*; família Potamolepidae representada pelas espécies

Oncosclera navicella CARTER, *O. spinifera* BONETTO & EZCURRA DE DRAGO; e Metaniidae, representada pelas espécies *Acalle recurvata*, *Drulia browni*, *D. cristata*, *D. uruguayensis* e *Metania reticulata* (Batista *et al.*, 2003).

O primeiro levantamento da espongofauna em ambientes de águas pretas foi realizado no lago Tupé, onde foi encontrada grande abundância de esponjas pertencentes a três famílias, destacando-se as espécies *Metania reticulata*, *Drulia browni* e *D. uruguayensis*, todas pertencentes à família Metaniidae. As outras espécies encontradas no estudo foram: *Metania subtilis*, *Acalle recurvata*, família Metaniidae; *Trochospongilla gregaria*, *T. paulula* e *T pennsylvanica*, família Spongillidae; e *Oncosclera navicella*, *O. spinifera* e *O. intermedia* família Potamolepidae (Volkmer-Ribeiro e Almeida, 2005).

A diversidade biológica pesente na Amazônia, também se reflete nas esponjas, porém com estudos restritos a levantamentos ecológicos e taxonômicos. Desta forma estudos químicos destes organismos são uma lacuna a ser preenchida.

3.3. Rios da Amazônia

A bacia amazônica é o mais extenso sistema fluvial e o de maior massa líquida do planeta delimitado pelos maciços das Guianas, Brasil Central e a Cordilheira dos Andes, drenando uma área de aproximadamente 6,1 milhões de Km² (Sioli, 1991; Gaillardet *et al.*, 1997; Aucour *et al.*, 2003). A área de drenagem da bacia amazônica apresenta uma grande diversidade de formações geológicas, podendo ser distinguidas três grandes províncias geológicas: os Escudos das Guianas e do Brasil Central (44% da área da bacia), a Cordilheira dos Andes (11% da área da bacia) e a Amazônia central (45% da área da bacia) (Seyler e Boaventura, 2003). O pequeno declive presente na bacia, que entre Manaus e o oceano Atlântico (1.200 Km) é inferior a 3 cm km⁻¹ associado as precipitações sazonais intensas (2000 – 3000 mm ao ano a leste dos Andes) resultam na variação periódica do nível das águas em Manaus de 8 a 11 m e em aproximadamente 40.000 Km² de floresta inundada na área de drenagem da floresta durante os períodos de cheia (Walker, 1995).

Em função destas variações de solo, origem e precipitação, entre outros efeitos diversos, as águas dos diversos rios da Amazônia apresentam características distintas, sendo classificadas em três tipos: pretas, brancas e claras (Sioli, 1950; Sioli, 1968).

As águas pretas, que apresentam como maior exemplo o rio Negro, são caracterizadas por elevadas concentrações de metais alcalinos, entre os quais se destacam o sódio e potássio, além de metais como ferro, cobre, zinco e alumínio (Gibbs, 1972). Além de apresentarem certa acidez e alta concentração de matéria orgânica dissolvida, com sua coloração característica atribuída à presença de ácidos húmicos (Leenheer, 1982).

As águas brancas, como as do rio Solimões, apresentam pH próximo ao neutro, coloração marrom amarelada e muito material em suspensão. É relatada forte presença de metais alcalinos terrosos destacando elevada concentração de íons de cálcio e magnésio (Sioli, 1968; Stallard e Edmond, 1983).

As águas claras provenientes da Amazônia central possuem pouco material suspenso, apresentam uma maior transparência que a água branca, e em função do relevo regular oferece menor possibilidade de erosão (Sioli, 1960; Sioli, 1991).

3.4. Produtos Naturais de Esponjas

Em 2011, foram descritos 296 novos compostos em estudos com esponjas (Blunt *et al.*, 2013). No ano de 2010 esse número foi de 283 (Blunt *et al.*, 2012), número muito próximo ao de 2009, quando 287 novas estruturas foram descritas (Blunt *et al.*, 2011), resultados muito semelhantes aos obtidos nos dez anos anteriores. A diversidade de substâncias isoladas destes organismos é evidenciada pelas atividades biológicas relatadas para estas, tornando as esponjas um dos principais *hotspots* para as pesquisas na área de produtos naturais.

A fim de ilustrar a diversidade dos metabólitos encontrados nas esponjas marinhas alguns compostos relevantes que apresentarem esqueletos incomuns serão apresentados.

A adriadisiolida (Figura 2), identificada em *Dysidea* sp. proveniente do mar Adriático Norte, foi o primeiro monoterpeno isolado de uma esponja (Mancini *et al.*, 1987).

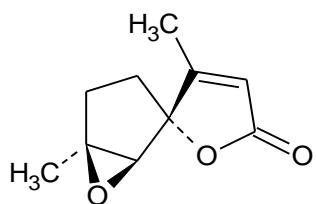


Figura 2: Adriadisiolida, primeiro monoterpeno isolado de *Dysidea* sp.

Três diterpenos tricíclicos (Figura 3) isolados de *Higginsia* sp., coletada na Austrália, apresentaram um esqueleto carbônico inédito (Cassidy *et al.*, 1985).

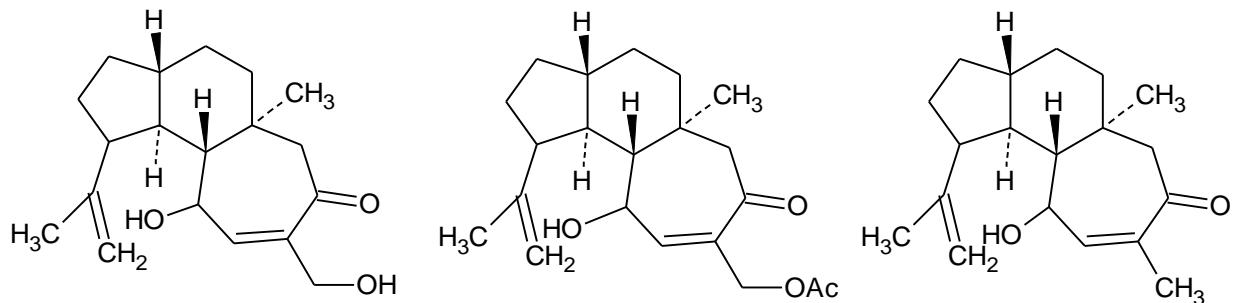


Figura 3: Diterpenos tricíclicos isolados de *Higginsi* sp.

Uma série de diterpenoides, Negobinas A – I (Figura 4) foram isolados de *Negonbata* sp., coletadas na ilha Pemba, Tanzânia. A negobina D apresentou toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. Estes produtos naturais são os primeiros relatos de diterpenos do tipo saculateno em organismos marinhos, sendo anteriormente relatados apenas em hepáticas (Rudi, Benayahu e Kashman, 2007).

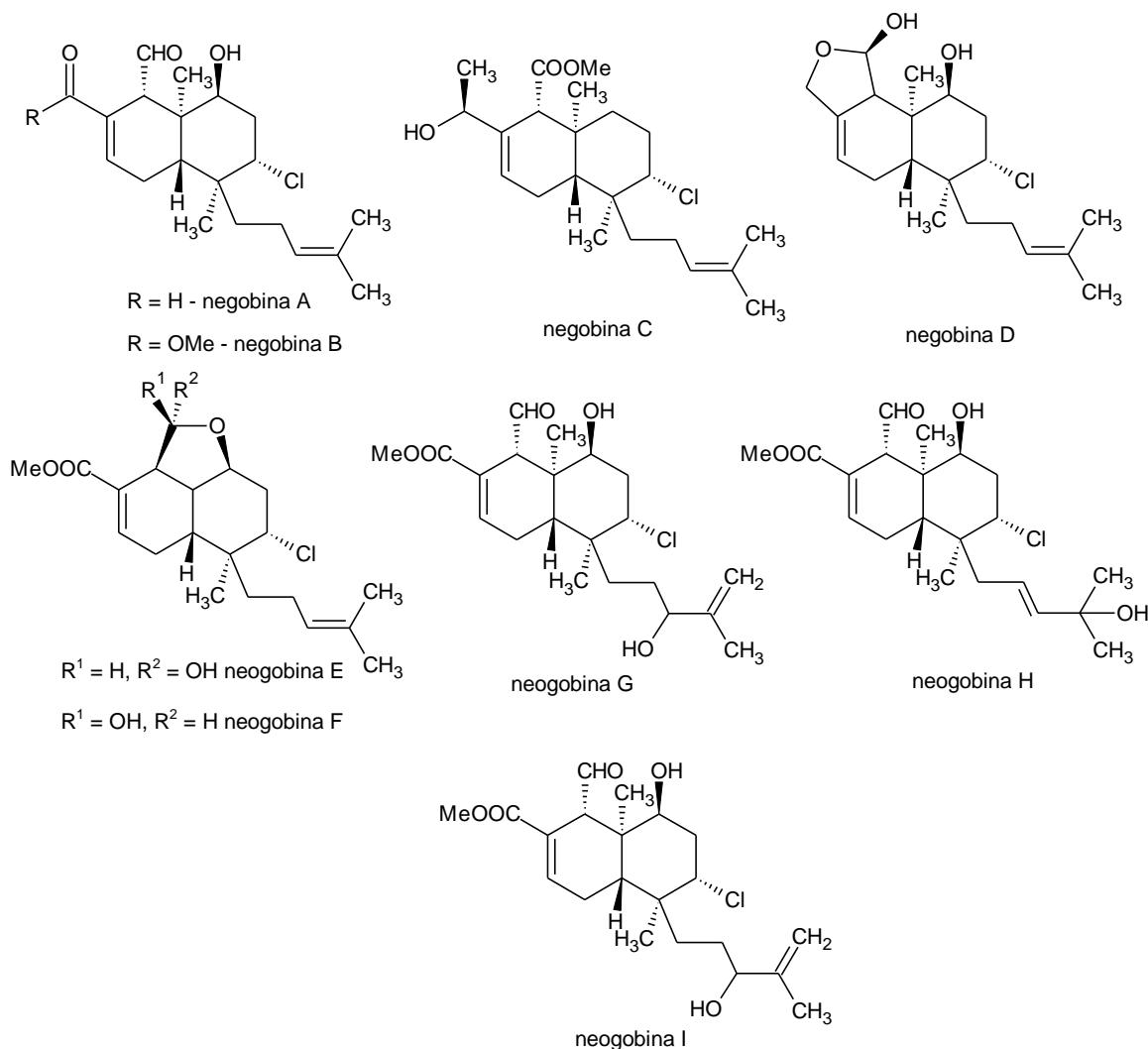


Figura 4: Negobinas A-I isoladas de *Negonbata* sp.

A neviotidina-A (Figura 5), isolada de *Siphonochalina siphonella*, possui um novo esqueleto triterpênico pentacíclico (Carmely e Kashman, 1986).

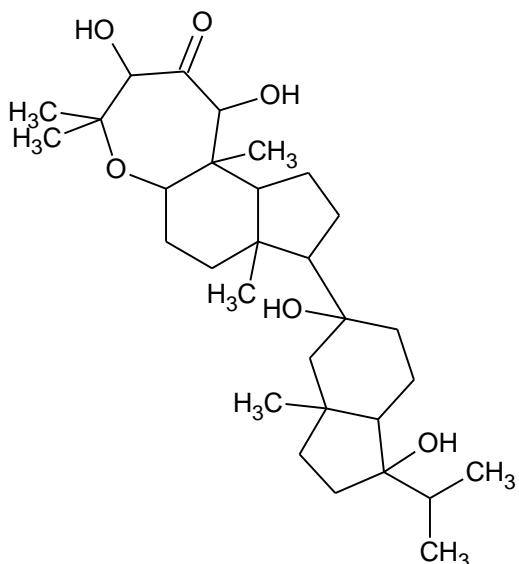


Figura 5: Neviotidina-A, isolada de *Siphonochalina siphonella*.

O N³,5-cicloxantosina (Figura 6), isolada de esponja marinha pertencente ao gênero *Erylus*, coletada ao sul da Austrália, é o primeiro registro de ciclonucleosídeo como produto natural, embora já conhecido como produto de síntese (Capon e Trotter, 2005).

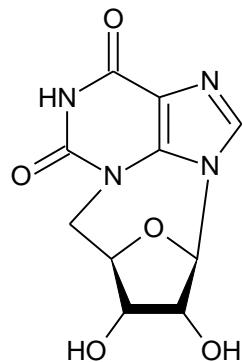


Figura 6: N³,5-cicloxantosina isolada de *Erylus* sp.

Na esponja *Niphates digitales*, coletada em Cuba, foi obtido 1,8-diazabiciclo[5.4.0]undeca-7-eno (Figura 7), pela primeira vez de uma fonte natural. Embora extremamente inesperado, a presença do composto foi confirmada por análises de cromatografia em fase líquida acoplada a espectrometria de massas (Regalado *et al.*, 2010).

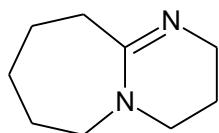


Figura 7: 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undeca-7-eno isso de *Niphates digitales*.

Associada à impressionante diversidade metabólica apresentada pelas esponjas é registrada uma ampla gama de atividades biológicas, que vêm sendo exploradas em busca de novos princípios ativos para a indústria farmacêutica.

O nucleotídeo espongotimidina, isolado da esponja caribenha *Cryptotethya crypta* (Bergmann e Feeney, 1951), originou a citarabina (Figura 8), um nucleosídeo pirimidínico sintético que atua inibindo DNA polimerase e DNA sintetase, indicado para alguns tipos de leucemia e meningite. A citarabina recebeu aprovação da FDA (*Food and Drug Administraion*) em 1969, e é o derivado de produto natural marinho há mais tempo no mercado americano (Bergmann e Feeney, 1951; Mayer *et al.*, 2010).

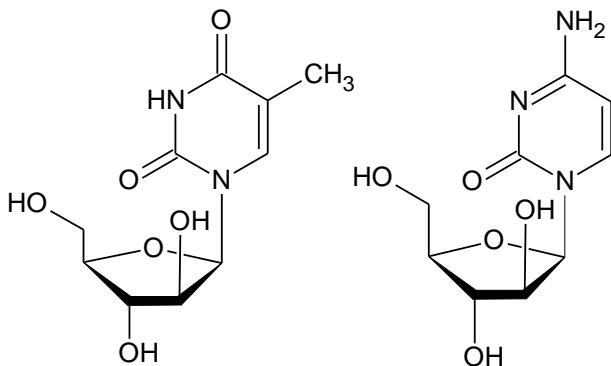


Figura 8: Espongotimidina e citarabina.

Poliéteres macrolídeos isolados originalmente da esponja marinha *Halicondria okadai*, exibiram grande atividade antitumoral *in vitro*, principalmente halicondrina B. Estudos com estruturas simplificadas desta substância mostraram que o mesilato de eribulina (Figura 9) mostrou a mesma atividade promissora, assim como atributos farmacêuticos favoráveis, como solubilidade em água e estabilidade química. Este composto apresentou bons resultados frente a diversos tipos de tumores em testes clínicos fase III, a última etapa para obter aprovação pela FDA (Hirata, 1986; Aicher *et al.*, 1992; Towle *et al.*, 2001; Jackson, Henderson e

Phillips, 2009; Mayer *et al.*, 2010; Cortes e Lorca, 2011; Devriese *et al.*, 2012; Austad *et al.*, 2013).

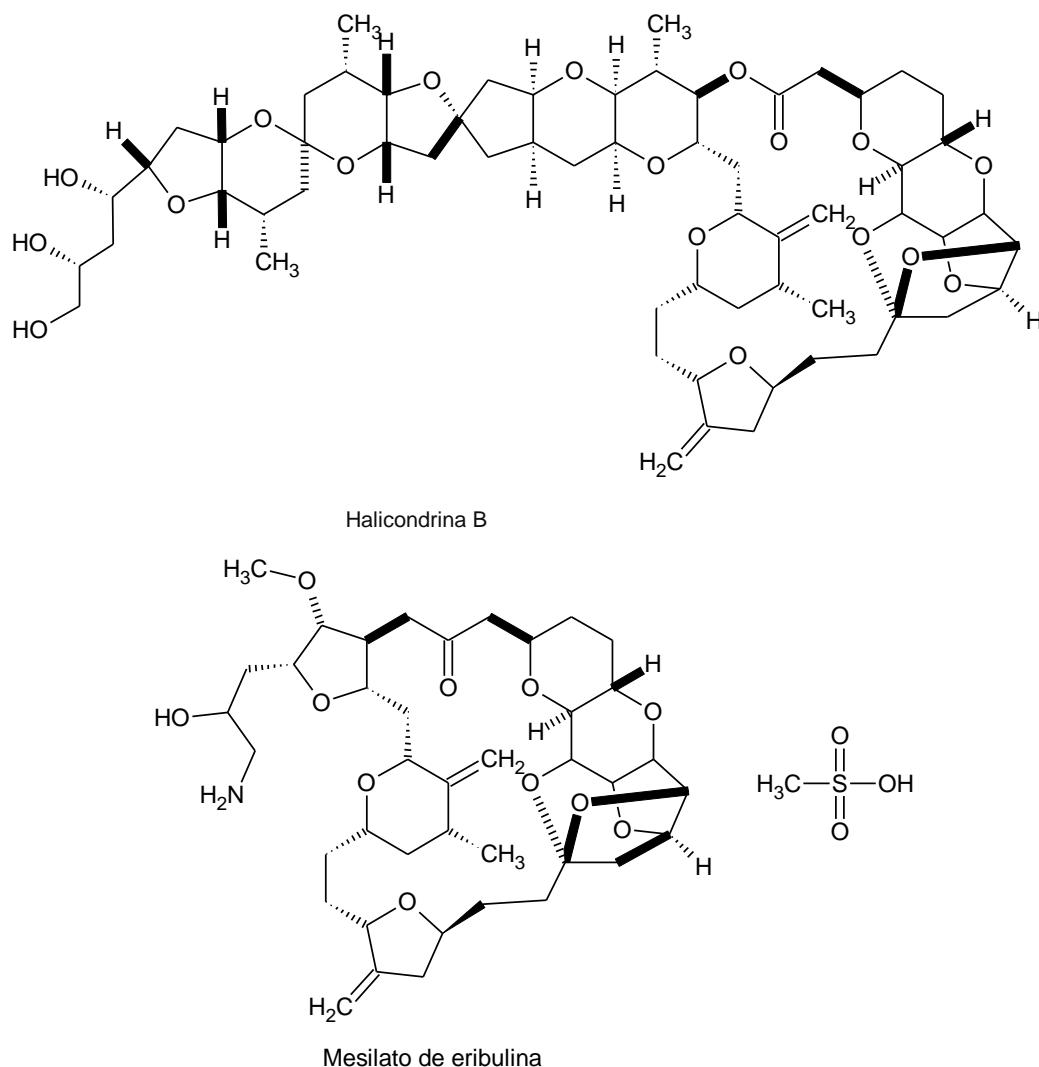


Figura 9: Halicandrina B isolado da esponja *Halicondria okadai* e seu derivado mesilato de eribulina.

O triterpeno citotóxico hemestarilina, isolado pela primeira vez da esponja marinha *Hemiasterella minor*, coletada na África do Sul, originou o E7479 que mostrou bons resultados nos teste fase I para aprovação junto a FDA, sendo recomendada a realização dos teste de fase II. A atividade antimitótica do derivado de produto natural envolve um mecanismo baseado na tubulina, levando a apoptose celular. Ao contrário de outras substâncias com atividade mediada pela tubulina como taxanos, alcaloides de vinca e

eribulina, que se ligam preferencialmente à tubulina β , o E7479 se liga a tubulina α (Figura 10) (Talpir *et al.*, 1994; Mayer *et al.*, 2010; Rocha-Lima *et al.*, 2012).

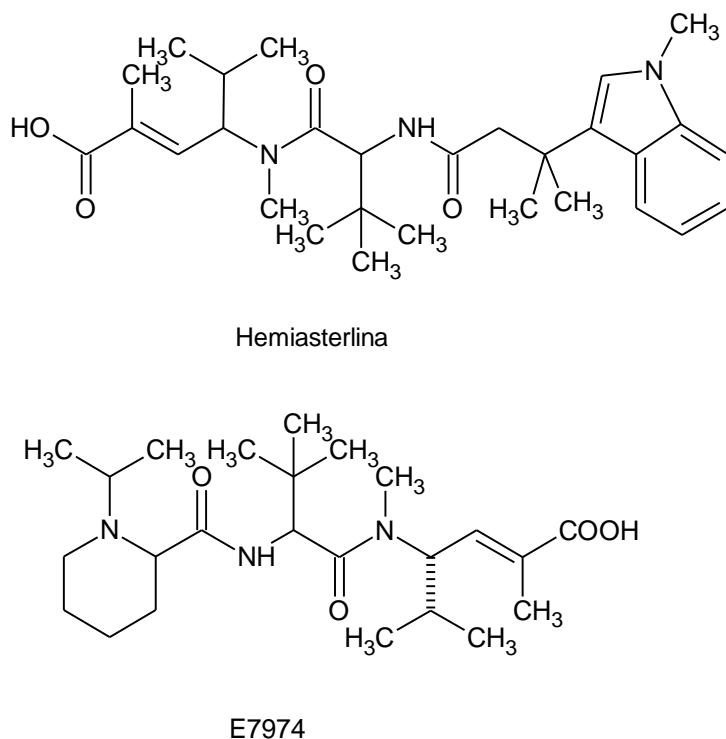


Figura 10: Hemestarylina, isolado da esponja *Hemiasterella minor*, e seu derivado E7974.

A esponja *Neamphius huxley*, coletada na Papua Nova Guiné, permitiu a identificação de neamfina (Figura 11), com atividade citotóxica. Esse metabólito é o primeiro relato de um sistema de anel imidazo[4,5,e]-1,2-tiazina tanto em produtos naturais ou síntese, a estrutura foi determinada por difração de raios-X de monocrystal (De Silva *et al.*, 1991).

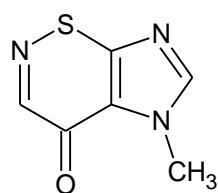


Figura 11: Neamfina, isolada da esponja *Neamphius huxley*.

Estudo com esponjas do gênero *Leucetta* possibilitou a identificação do primeiro alcaloide poliacetilênico de uma esponja (Figura 12) que apresentou atividade citotóxica ($IC_{50} = 2,5 \mu\text{g/mL}$) frente a células NBT-T2 (Hermawan, De Voogd e Tanaka, 2011).

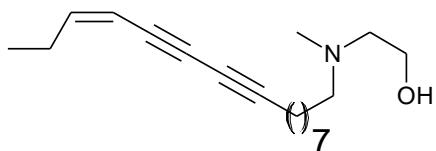


Figura 12: Alcaloide acetilênico isolado da esponja *Leucetta* sp.

Avarol e avarona (Figura 13), metabólitos de *Dysidea avara*, em ensaios preliminares mostram capacidade de inibir vírus HIV *in vitro*. Nove derivados amínicos da avarona foram sintetizados e submetidos a avaliação preliminar de citotoxicidade, porém nenhum foi tão ativo quanto o produto natural (Minale, Riccio e Sodano, 1974; Sarin *et al.*, 1987; Cozzolino *et al.*, 1990).

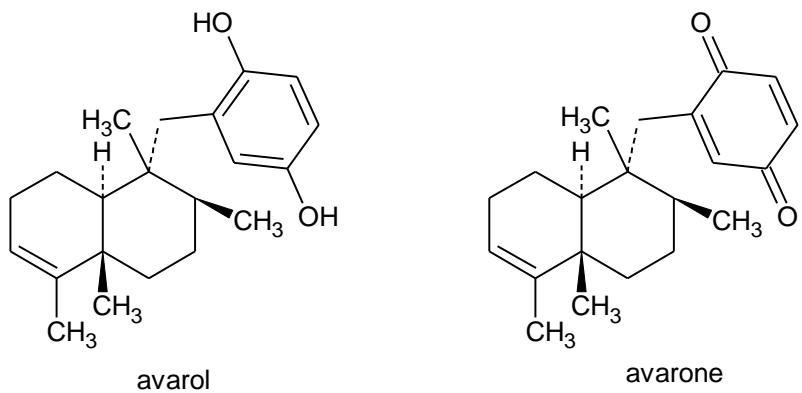


Figura 13: Avarol e avarona, isolados *Dysidea avara*.

A síntese enantioseletiva para o avarol e a avarona foram descritas empregando uma reação de adição radicalar para incorporar o anel aromático (Ling, Xiang e Theodorakis, 1999).

O sesterterpenóide manoalida (Figura 14) isolado originalmente da esponja marinha *Luffariella variabilis* (De Silva e Scheuer, 1980), apresentou atividade antibiótica e

antiinflamatória. A manoalida atua como antiinflamatorio através de ligação irreversível com a fosfolipase A2 (Bennett *et al.*, 1987; Glaser *et al.*, 1989) e chegou à fase 2 de testes pré-clínicos, porém as pesquisas foram descontinuadas em função de problemas na formulação (Haefner, 2003; Sipkema *et al.*, 2005; Gross e König, 2006; Folmer *et al.*, 2010).

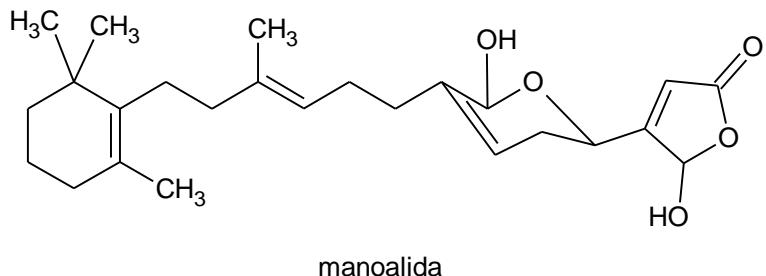


Figura 14: Manoalida, sesterterpenoide isolado da esponja *Luffariella variabilis*.

As esponjas se destacam entre os organismos marinhos devido aos seus esteróis não usuais como o contignasterol, (Figura 15), isolado de *Petrosia contignata*. Este esterol altamente oxigenado é notável devido à configuração não usual do próton 14 β e à funcionalidade hemiacetal na cadeia lateral. Esta substância, também conhecida por IZP 94005, e seus derivados, IPL 57092 e IPL 512602 (Figura 15), apresentam atividade antiinflamatória que, embora apresente relações estruturais com esteróides glicocorticoides, não compartilham o mesmo mecanismo de ação, sendo estas substâncias classificadas como “leucocyte-selective anti-inflammatory drugs (LSAIDs)”. Devido à bioatividade promissora, o contignasterol e seus derivados vêm sendo avaliados pela InflaZyme Pharmaceuticals Ltd. em cooperação com a Aventis Pharma como um antiasmático. Os derivados IPL 576092 e IPL 512602 já completaram a fase II de estudos clínicos de atividade contra o câncer (Burgoyne, Andersen e Allen, 1992; Gross e König, 2006; Ajikumar *et al.*, 2008).

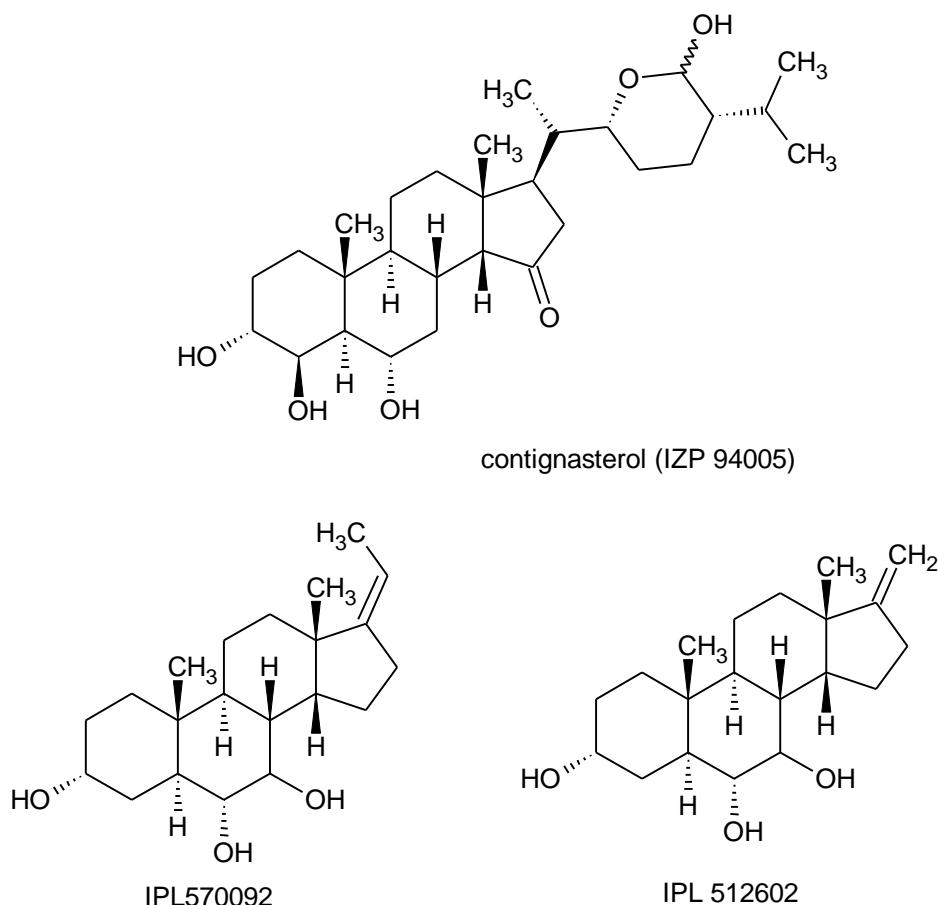


Figura 15: Contignasterol (IZP 94005) e seus derivados IPL 57092 e IPL 512602.

Alguns esteróis sulfatados apresentam atividade antimicrobiana significante como o halistanol trisulfato (Figura 16), um tris sulfato de sódio, isolado de *Halichondria cf. moorei*, (Fusetani, Matsunaga e Konosu, 1981). O mesmo produto natural foi isolado de esponjas do gênero *Topsentia* por fracionamento bioguiado e mostrou uma CI_{50} de aproximadamente 4 μM contra pp60^{V-src}, uma proteína oncogênica de ação tirosina-quinase. A remoção dos grupos sulfatos levou a um derivado inativo, outros esteróis monosulfatados avaliados não se mostraram ativos (Slate *et al.*, 1994).

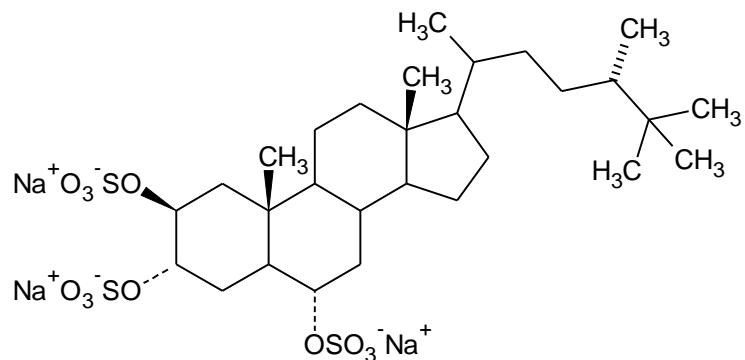


Figura 16: Halistanol trisulfato isolado de *Halichondria cf. moorei*.

Os nor-esterpenos trunculinas A e B (Figura 17), com atividade antimicrobiana, isolados junto com seus ésteres metílicos da esponja australiana *Latrunculia brevis* apresentaram um esqueleto novo (Capon, Macleod e Willis, 1987).

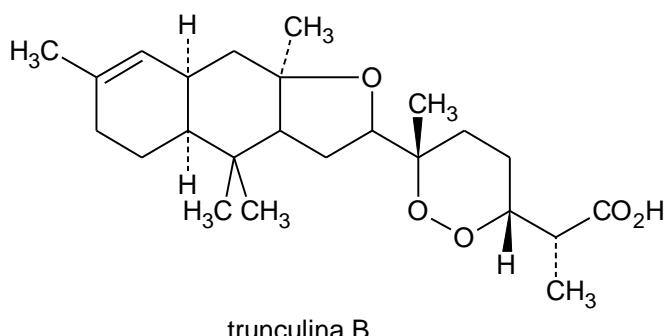
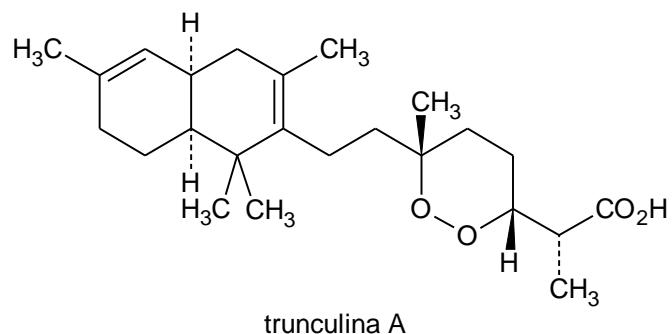


Figura 17: Trunculinas A e B isoladas de *Latrunculia brevis*.

Esses exemplos ilustram o potencial e a pluralidade dos produtos naturais presentes nas esponjas.

3.4.1. Produtos naturais de esponjas de água doce.

Os produtos naturais de esponjas de água doce apresentam um número de trabalhos muito reduzido quando comparados com os estudos envolvendo organismos marinhos. Sendo mais numerosos com os organismos encontrados no lago Baikal (Rússia), explorando principalmente a composição dos lipídios destes organismos.

3.4.1.1. Ácidos graxos de esponjas dulcícolas.

Significativa quantidade de ácidos graxos em esponjas dulcícolas foi relatada inicialmente para espécie *Spongilla lacustris* (Spongillidae) onde 31% da fração lipídica foram caracterizadas como ácidos graxos livres (Clarke e Mazur, 1941).

Posteriormente, outra espécie do mesmo gênero, *Spongilla wagneri* (Spongillidae), foi investigada quanto aos lipídeos presentes em suas gêmulas empregando análises em cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. Foi relatado que ácidos graxos livres, com cadeias entre 10 e 24 carbonos, representavam 18,53% dos lipídeos extraídos (Laseter e Poirrier, 1970).

Os fosfolipídeos da esponja *Ephydatia fluviatilis* (Spongillidae) foram estudados possibilitando a identificação de 15 ácidos graxos com cadeia de 14 a 16 carbonos, sendo cinco insaturados, três monoenoicos, quatro dienoicos, um trienoico e dois tetraenoicos além dos ácidos (5Z,9Z)-5,9-hexacosadienoico ($\Delta^{5,9}$ -26:2) e (5Z,9Z,19Z)-6,9,19-hexacosatrienoico ($\Delta^{5,9,19}$ -26:3) foram identificados como os componentes majoritários (Hahn *et al.*, 1989). Estes dois ácidos, frequentemente relatados anteriormente em esponjas marinhas da classe Demospongeae, mostraram uma variação sazonal que se justificativa como resposta adaptativa à temperatura do ambiente (Jefferts, Morales e Litchfield, 1974; Morales e Litchfield, 1976).

A incorporação de precursores de cadeia curta e sua transformação em ácidos graxos de cadeia longa (C_{26}) foram investigadas empregando marcação isotópica em esponjas *Ephydatia fluviatilis*. Um constante crescimento na razão $\Delta^{5,9,19}$ -26:3/ $\Delta^{5,9}$ -26:3 pode ser observado, caracterizando, de forma indireta, a primeira evidência de uma enzima Δ^{19} -

dessaturase. A mesma evidência foi observada em outra esponja de água doce com a identificação incerta (Hahn *et al.*, 1989).

Os fosfolipídios da esponja dulcícola *Euspongilla lacustris* (Spongilidae) coletada no rio Volga foram analisados permitindo a identificação de 17 ácidos graxos com cadeias contendo entre 14 e 26 átomos de carbono, dos quais oito insaturados, seis monoenoícos, um dienoíco, um trienoíco e um tetraenoíco (Dembitsky, Kashin e Karaganova, 1991).

A composição dos ácidos graxos de três diferentes espécies de esponjas de água doce coletadas em Israel, *Ephydatia syriaca*, *Nudospongilla* sp. (Spongillidae) e *Cortispongilla barroisi* (Malawispongia) foi analisada revelando vinte componentes principais e destacando uma elevada concentração de ácidos eicosatetranóico ($\Delta^{5,8,11,14}$ -20:4, acima de 10,1% da fração ácida) e ácidos eicosapentanóico ($\Delta^{5,8,11,14,17}$ -20:5, acima de 11,6%), e ácidos docosahexanóico ($\Delta^{4,7,10,13,16,19}$ -22:6, acima de 11,8%) (Dembitsky e Rezanka, 1996).

Cinco neo ácidos graxos não usuais foram relatados como minoritários nas esponjas *Ephydatia syriaca*, *Nudospongilla* sp. e *Cortispongilla barroisi*, entre os quais o ácido 6,6-dimetil-heptanóico (Figura 18). Anteriormente, uma amida deste ácido e o ácido incorporado a lipopeptídeos haviam sido relatados na cianobactéria *Lyngbya majuscula* (Orjala *et al.*, 1995; Nagle, Paul e Ann Roberts, 1996), possibilitando dúvida quanto a origem dos neo ácidos relatados nas esponjas.

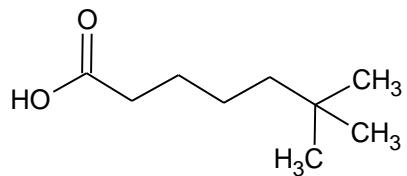


Figura 18: Ácido 6,6-dimetil-heptanóico.

Estudos posteriores com as mesmas espécies possibilitaram à identificação de 185 ácidos graxos empregando cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, e empregando outras técnicas cromatográficas foi possível isolar e identificar por ressonância magnética nuclear cinco ácidos não descritos anteriormente. A espécie *Ephydatia syruaca* permitiu o isolamento e identificação do ácido (2E,5R,10E,12E)-3,5,15-trimetil-7-metileno-hexadeca-2,10,12-trienóico. A partir da esponja *Nudospongilla* sp. os ácidos (2E,4E,6S,8E,10E,12S)-6,9,12-trimetiltetradeca-2,4,8,10-tetraenoíco, (2Z,4E,6Z,8E,10S,12E)-

6,8,10,13-tetrametilpentadeca-2,4,6,8,12,14-hexaenóico e ($2E,4E,6S$)-4,6-dimetil-hexadeca-2,4-dienóico foram isolados. A esponja *Cortispongilla barroisi* forneceu o ácido ($2E,4E,7R,8E,10E,14R$)-7,9,14-trimetilhexadeca-2,4,8,10-tetraenóico (Figura 19) (Řezanka e Dembitsky, 2002).

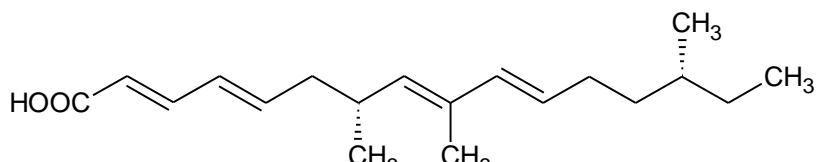
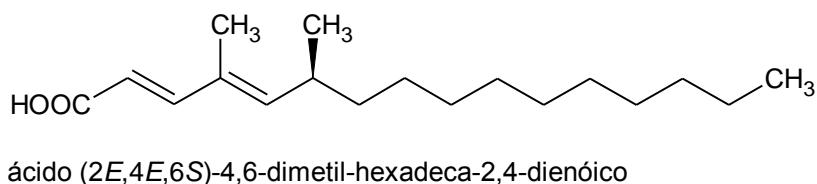
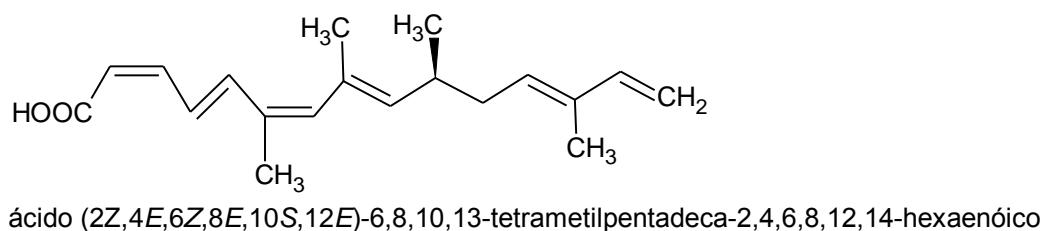
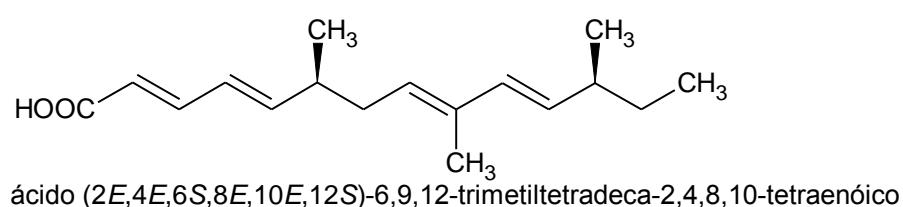
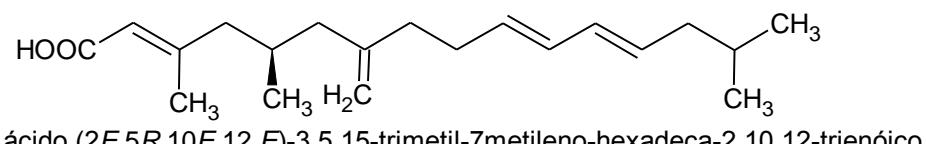


Figura 19: Ácidos inéditos descritos nas espécies *Ephydatia syruaca*, *Nudospongilla* sp. *Cortispongilla barroisi*.

Nas esponjas do lago Baikal pertencentes aos gêneros *Lubomirskia* e *Baicalospongia* (Lubomirskiidae) foram identificados os primeiros ácidos graxos de cadeia muito longa, entre

24 e 28 carbonos, em esponjas dulcícolas (Dembitsky, 1981). Os ácidos graxos das esponjas *Baicalospongia bacillifera* e *Baicalospongia intermedia* (Lubomirskiidae), endêmicas do lago Baikal, foram analisados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas permitindo a identificação de 185 ácidos graxos. Grande diversidade estrutural foi observada nestes ácidos sendo 46 saturados, iso-, anteiso-, ramificados, cíclicos, 55 monoenoícos, 37 dienoícos, 25 trienoícos e 22 polienoícos com até seis insaturações (Dembitsky, Rezanka e Kashin, 1993). Outra espécie endêmica do mesmo habitat, *Lubomirskia baicalensis* (Lubomirskiidae), também teve seus ácidos graxos investigados por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, permitindo a identificação de cento e oitenta e três ácidos graxos com diversidade semelhante à relatada nas espécies do gênero *Baicalospongia* (Dembitsky, Rezanka e Kashin, 1994).

Entre os ácidos graxos saturados relatados nas esponjas endêmicas do lago Baikal destaca-se a presença de algumas estruturas incomuns como os ácidos 11-metilnonodecanóico, ciclopripilhexacosanóico, iso-tetracosanóico e anteiso-pentacosanóico (Dembitsky, Rezanka e Kashin, 1993; Dembitsky, Rezanka e Kashin, 1994).

Quatorze novos ácidos graxos isoprenóicos poli-insaturados de duas séries homólogas, baseadas nos ácidos 3,7,11,15-tetrametil-hexadecanóico e 4,8,12-trimetiltridecanóico, foram isolados e identificados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C nas esponjas endêmicas do lago Baikal *Baicalospongia intermedia*, *Baicalospongia bacilifera* e *Lubomirskia baicalensis* (Rezanka e Dembitsky, 1993).

Na espécie *Lubomirskia baicaensis* foram identificados aldeídos de cadeia longa não usuais (22:1, 22:2, 23:1, 24:1, 24:2 e 25:2) em seu extrato lipídico, destacando o tetracosa-17-enal como aldeído majoritário, sendo este também o principal aldeído de outra espécie, a *Baicalospongia bacilifera* (Imbs e Vereshchagin, 2005).

A formação de aldeídos insaturados a partir de ácidos graxos de cadeia longa por meio de atividade enzimática é documentada em plantas aquáticas, algas, dinoflagelados de água doce e diatomáceas marinhas (Kajiwara *et al.*, 1990; Kajiwara *et al.*, 1993; Ginzburg *et al.*, 1998; Kawasaki *et al.*, 1998; D'ippolito, Iadicicco, *et al.*, 2002; D'ippolito, Romano, *et al.*, 2002).

Os ácidos graxos Δ^5 e Δ^4 da esponja de água doce *Baicalospongia bacilifera* foram revisitados seletivamente empregando reação de iodolactonização e a identificação por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas e reações de degradação química. A presença de diversos ácidos monoinsaturados ramificados não usuais, iso-15:1 Δ^4 ,

anteiso-15:1 Δ^4 , iso-17:1 Δ^4 , anteiso-17:1 Δ^4 , ácidos tetraenóicos não ramificados 18:4 $\Delta^{5,9,12,15}$ e ácidos eicosapentanóico isoméricos com ligações duplas trans ($\Delta^{5c,8c,11t,14c,17c}$ -20:5) foram relatados (Imbs e Latyshev, 1998).

Uma nova análise dos ácidos graxos da esponja *Baicalospongia bacilifera* mostrou o ácido 5Z,8Z,11Z,14Z,18E-eicosapentaenóico como principal componente, representando 14% do total de ácidos graxos detectados. A presença de dois outros isômeros deste ácido foi identificada na esponja, o 5Z,8Z,11Z,15Z,18E-eicosapentaenóico, até então inédito, e o 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z-eicosapentaenóico (Figura 20). Estes ácidos foram isolados na forma de ésteres metílicos empregando cromatografia em sílica impregnada com nitrato de prata e cromatografia líquida de alta eficiência e suas estruturas foram determinadas empregando espectrometria de massas acoplada a cromatógrafo em fase gasosa e ressonância magnética nuclear (Imbs e Rodkina, 2005).

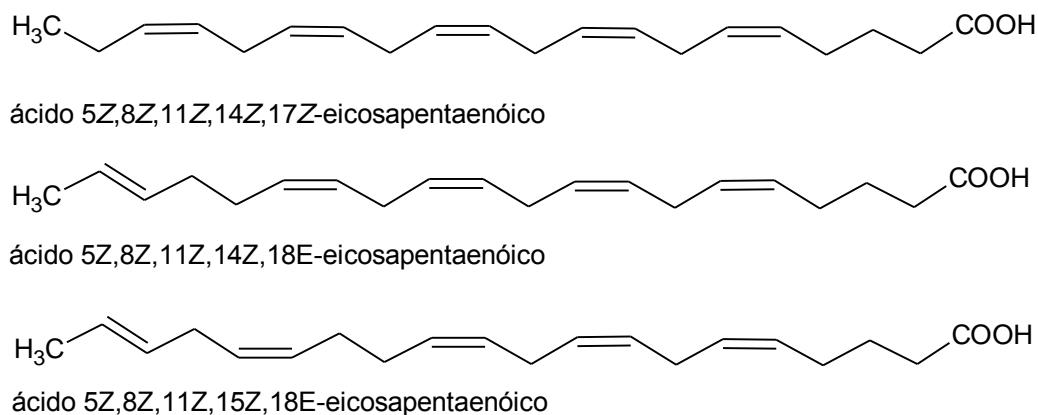


Figura 20: Ácidos graxos da esponja *Baicalospongia bacilifera*.

3.4.1.2. Esteróis de esponjas dulcícolas

Esponjas adquirirem seus esteróis de quatro diferentes formas: através da biossíntese direta; pela ingestão; pela modificação de esteróis ingeridos ou pela biossíntese associada a algum organismo simbionte (Goad, 1983; Djerassi e Silva, 1991), portanto certamente há uma influência do meio.

A capacidade das esponjas biossintetizarem esteróis não usuais e comuns é relatada para diversas esponjas (Kerr *et al.*, 1989; Kerr, Kerr e Djerassi, 1991; Silva, Wunsche e Djerassi, 1991). O arsenal metabólico das esponjas, marinhas e dulcícolas, também é capaz de converter esteróis 24-alquil substituídos em colesterol, e surpreendentemente o processo reverso também se mostra presente nas mesmas espécies (Malik, Kerr e Djerassi, 1988; Kerr *et al.*, 1990; Kerr *et al.*, 1992), permitindo a estes animais transformar esteróis incorporados conforme suas necessidades.

O número de esteróis presentes nas esponjas varia fortemente com a espécie, limitando-se geralmente entre sete e dez. Em muitos casos há apenas um esterol que se apresenta como majoritário e os demais aparecem em quantidade traço (Bergquist, Lavis e Cambie, 1986), característica esta que favorece um trabalho quimiosistemático, onde os esteróis majoritários podem ser empregados como marcadores para as espécies.

Mazur (1941), obteve o 5,6-dihidrostigmasterol em estudos com *Spongilla lacustris*, sendo este o primeiro produto natural isolado a partir de uma esponja de água doce. Desde então vários outros esteróis têm sido descritos.

Estudos com as espécies *Spongilla lacustris* e *Ephydatia fluviatilis*, muito frequentes na Europa, coletadas na Itália, permitiram a identificação de oito esteróis: colesterol, (22E)-colesta-5,22-dieno-3 β -ol, (24R)-24-metil-colesta-5-eno-3 β -ol, (24S)-24-metil-colesta-5-eno-3 β -ol, (22E,24S)-24-metil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol, (22E,24R)-24-metil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol, 24-metilcolesta-5,24(28)-dieno-3 β -ol, (24S)-24-etilcolesta-5-eno-3 β -ol e (22E,24R)-24-etilcolesta-5,22-dieno-3 β -ol em ambas as espécies. A espécie *Ephydatia fluviatilis* apresentou ainda sitosterol e o estanal 24-metil-5 α -colestano-3 β -ol (Figura 21). Nas duas espécies, o colesterol aparece como o mais abundante esterol, representando 74 e 66%, da fração esteroídica respectivamente (Manconi *et al.*, 1988).

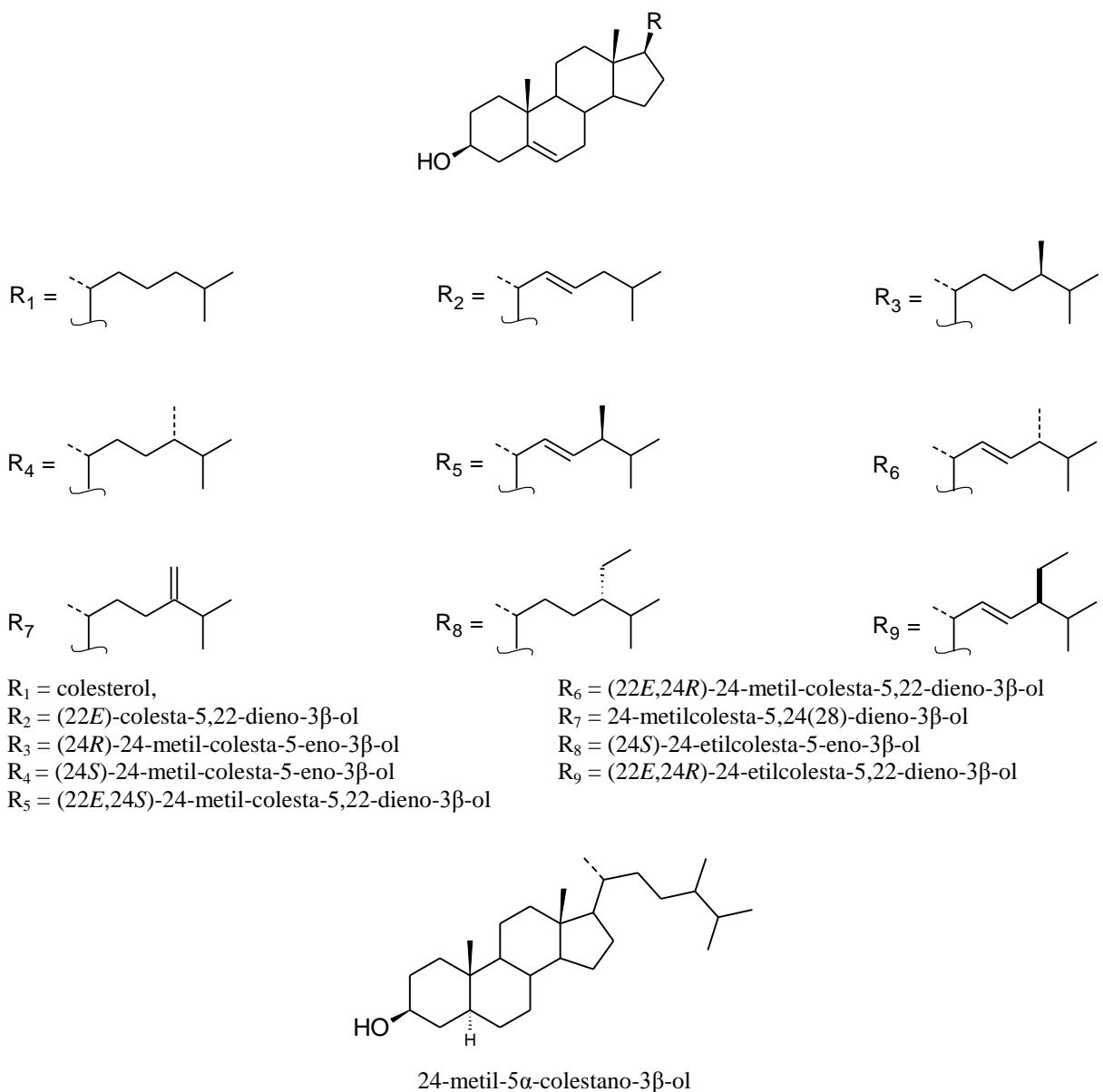


Figura 21: Esteróis relatados em *Spongilla lacustris* e *Ephydatia fluviatilis*.

Outro trabalho com a espécie *Spongilla lacustris*, a partir de material coletado na província Yunnan, China, permitiu a identificação de oito esteróis colesterol, 5- α -colesta-7-eno-3 β ,6 α -diol, colesta-5-eno-3 β ,7 β -diol, colesta-5-eno-3 β ,7 α -diol, (22E)-colesta-5,22-dieno-3 β ,7 α -diol, 24 ξ -etyl-colesta-5-eno-3 β ,7 α -diol, colesta-7-eno-3 β ,5 α ,6 β -triol, (24S)-24-etyl-colesta-7,22-eno-3 β ,5 α ,6 β -triol, 24S-etyl-colesta-7-eno-3 β ,5 α ,6 β -triol (Figura 22) (Hu *et al.*, 2009).

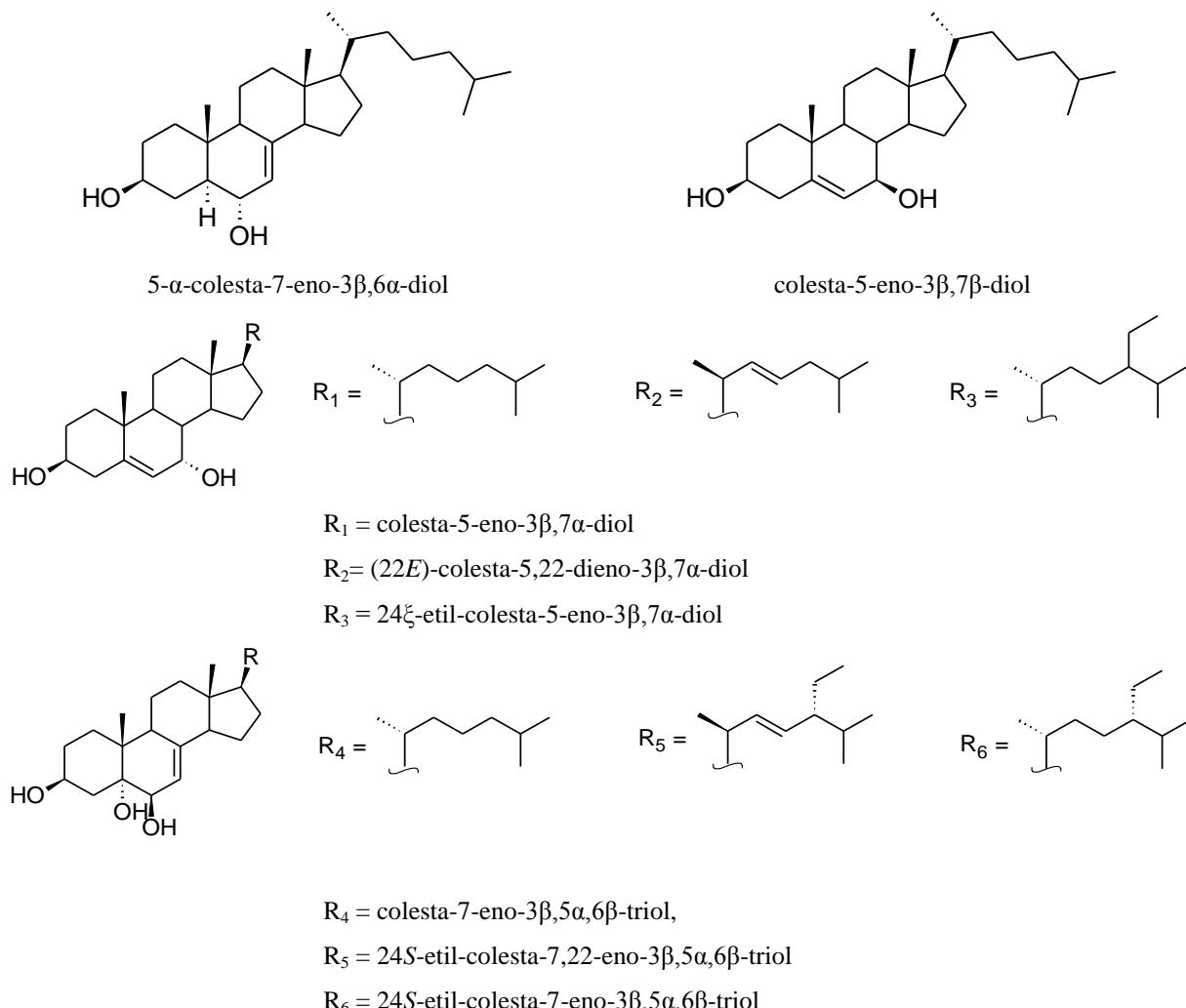


Figura 22: Esteróis relatados para a esponja *Spongilla lacustris*.

A partir da esponja *Ephydatia syriaca* foi possível isolar a siriacina, uma nova e não usual ceramida glicosídeo sulfatada ligada a um ácido graxo muito longo, como o ácido (*all*-Z)-34S-metil-hexatriaconta-5,9,12,15,18,21-hexaenóico (Řezanka, Sigler e Dembitsky, 2006).

A análise da espécie *Baicalospongia bacilifera* permitiu identificar esterol inédito, o baikalosterol (24-etyl-26-norcolesta-5,22E,25-trieno-3 β -ol), além de oito esteróis já conhecidos: (24S)-metilcolesta-5,22E,25-trieno-3 β -ol, colesta-5,22E-dieno-3 β -ol, 24-metilcolesta-5,24(28)-dieno-3 β -ol, 24 ξ -metilcolesta-5,22E-dieno-3 β -ol, colesterol, (24S)-metilcolesta-5-eno-3 β -ol, 24 ξ -etylcolesta-5,22E-dieno-3 β -ol, (24S)-etylcolesta-5-eno-3 β -ol (Figura 23). O colesterol também aparece nesta espécie como principal esterol, representando 39% da fração esteroídica obtida (Makarieva *et al.*, 1991).

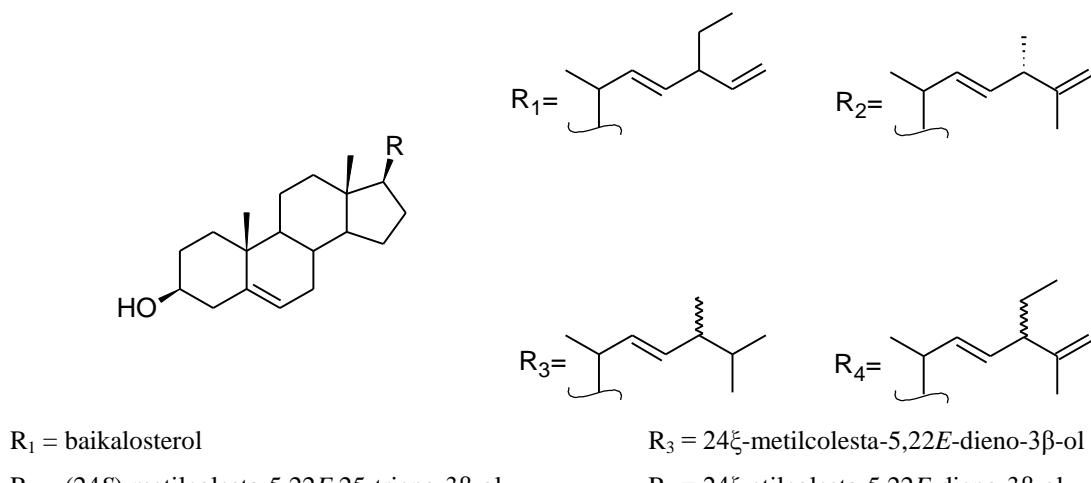


Figura 23: Esteróis de *Baicalospongia bacilifera*.

Outra espécie proveniente do lago Baikal, Rússia, *Lubomirskia baicalensis*, teve sua fração de esteróis estudada, onde foram detectados 16 $\Delta^5,3\beta$ -esteróis, porém apenas 14 foram identificados: 24-norcolesta-5,22-dieno-3 β -ol, colesta-5,22E-dieno-3 β -ol, colesterol, 24-etil-26-norcolesta-5,22E,25-trieno-3 β -ol, 24-metil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol, 24-metil-colesta-5,22E,25-trieno-3 β -ol, 24-metil-colesta-5,25-dieno-3 β -ol, 24-metil-colesta-5,24(28)-dieno-3 β -ol, 24-metil-colesta-5-eno-3 β -ol, 24-etil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol, 24-etil-colesta-5,25-dieno-3 β -ol, 24-etil-colesta-5,24(28)E-dieno-3 β -ol, 24-etil-colest-5-eno-3 β -ol, 24-etil-colesta-5,24(28)Z-dieno-3 β -ol (Figura 24). Nesta espécie, o colesterol novamente é o mais abundante esterol, representando 56% do total (Kolesnikova, Makarieva e Stonik, 1992).

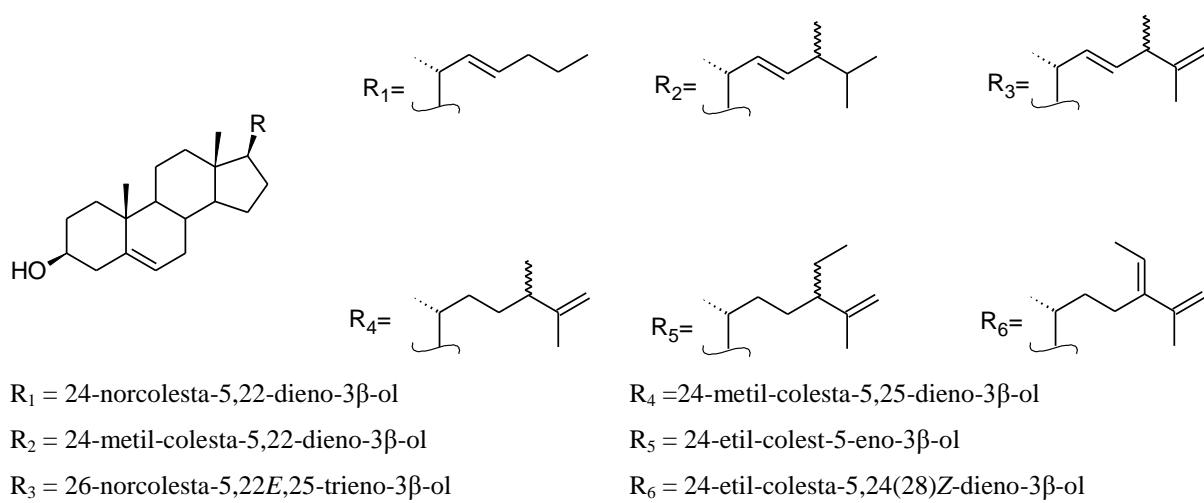


Figura 24: Esteróis identificados em *Lubomirskia baicalensis*.

3.4.1.3. Outros Produtos Naturais relatados em esponjas dulcícolas.

Além de ácidos graxos e esteróis, os trabalhos com esponjas dulcícolas possibilitaram o isolamento de substâncias de outras classes.

Através de repetidas colunas cromatográficas com a fração mais polar do extrato obtido em etanol da esponja *Baicalospongia bacilifera*, utilizando XAD-2 como fase estacionária, foi possível isolar α -metilglucopiranosideo (Figura 25) e a identificação foi realizada através de comparação com padrão autêntico (Makarieva *et al.*, 1991).

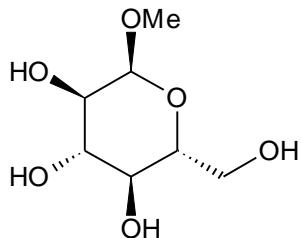


Figura 25: α -metilglucopiranosideo isolado de *Baicalospongia bacilifera*.

O estudo químico da espécie *Spongilla lacustris* permitiu a identificação de uma substância inédita, tetracosana-1-ol-1-O- β -gluco-piranosideo, além do já conhecido 1-palmitoil-3- β -D-galactosil-sn-glicerol (Figura 26) (Hu *et al.*, 2009), que, já havia sido relatado na esponja marinha *Spongia cf. hispida* e na alga marinha *Oscillatoria rosea*, com atividade de inibir a agregação plaquetária e o crescimento bacteriano (Rho *et al.*, 1996; Pettit *et al.*, 1997).

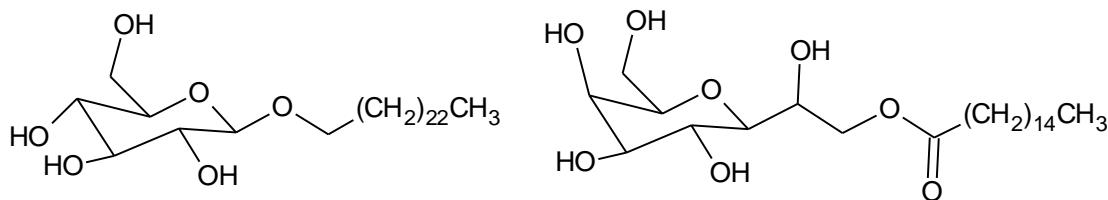


Figura 26: Tetracosano-1-ol-1-O- β -gluco-piranosideo e 1-palmitoil-3- β -D-galactosil-sn-glicerol encontrados em *Spongilla lacustris*.

Mesmo com um número restrito de trabalhos, as esponjas dulcícolas apresentam grande variabilidade de metabólitos, justificando a necessidade de pesquisas nesta área.

3.4.2. Quimiotaxonomia

A identificação taxonômica das esponjas exige um alto grau de especialização em virtude da baixa complexidade destes animais, levando à busca de marcadores para facilitar esse trabalho. Os marcadores moleculares para estes organismos estão ainda sendo estabelecidos, embora o uso de marcadores de DNA para o filo tenha se iniciado nos anos 1990 (Kelly-Borges, Bergquist e Bergquist, 1991).

Metabólitos especiais são uma alternativa para auxiliar na caracterização das esponjas em função de seu vasto número, que cresce ano a ano, e a diversidade estrutural que apresentam.

Alguns ácidos possuem valor quimiotaxonômico significativo tanto para esponjas marinhas quanto dulcícolas. Um exemplo são as esponjas *Anthosignella varians* e *Spheciopspongia vesparium* nas quais o ácido 4,8,12-trimetiltridecanóico corresponde 5,2% e 23%, respectivamente, do total de ácidos graxos. Nas esponjas *Chondrilla nucula* e *Agelas dispors* o ácido 3,7,11,15-tetrametilhexadecanóico representa 13,8% e 8,6% do total da composição fosfolipídica (Figura 27). Tais ácidos não ocorrem simultaneamente em uma mesma esponja (Carballeira, Maldonado e Porras, 1987). A presença de ácidos graxos de cadeia longa com insaturações nos carbonos 5 e 9 ($\Delta^{5,9}$) é apontado como uma marcador para diferenciar as classes Hexactinellidae e Demospongiae da classe Calcareae (Thiel *et al.*, 2002).

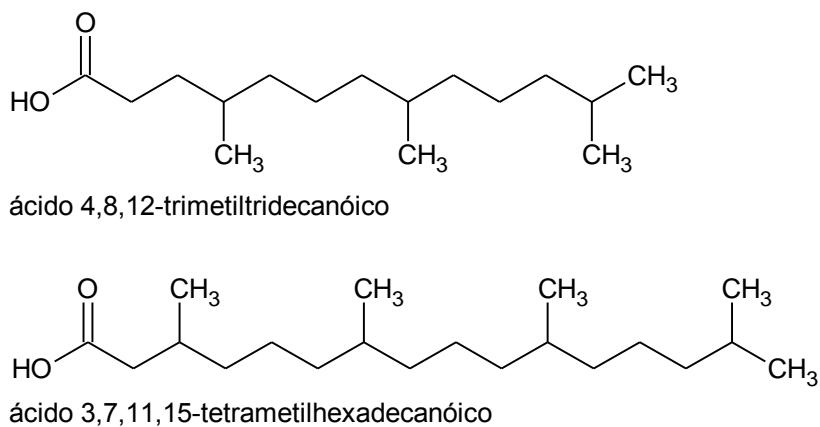


Figura 27: Ácidos encontrados em esponjas marinhas com relevância quimiotaxonômica.

Os ácidos graxos presentes nas esponjas podem ter origem em microrganismos simbiontes (Gillan *et al.*, 1988), entretanto há indícios de que ácidos graxos de cadeia longa são produzidos pelas esponjas (Hahn *et al.*, 1988; Lawson, Thompson e Djerassi, 1988; Garson *et al.*, 1994).

A presença de esteróis com anéis ciclopropânicos (Figura 28) nas cadeias laterais como majoritários em algumas esponjas da ordem Haplosclerida embasou a criação de uma nova ordem Petrosia (Bergquist, 1980). Os seguintes resultados ilustram essa características nas esponjas desta classe *Calyx nicaensis* onde calysterol representa 52% dos esteróis (Fattorusso *et al.*, 1975), *Petrosia ficiformis* com o petrosterol sendo 60% de seus esteróis (Sica e Zollo, 1978) e *P. hebes* na qual o petrosterol corresponde a 50% de seus esteróis (Cho e Djerassi, 1987).

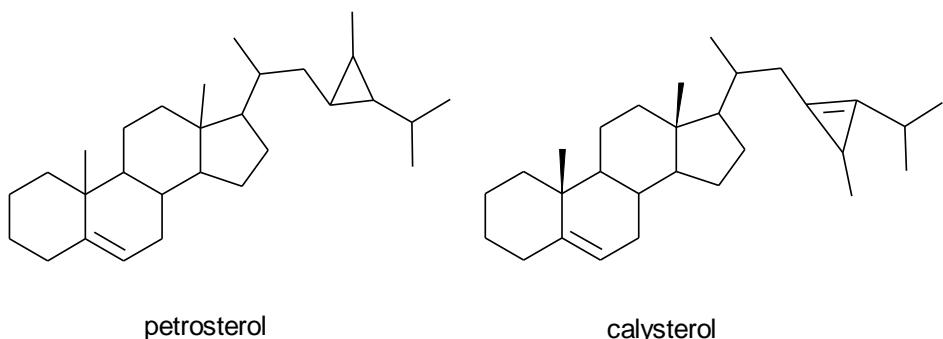


Figura 28: Esteróis com anéis ciclopropânicos.

Estudos posteriores (Bergquist, Hofheinz e Oesterhelt, 1980; Bergquist, Lavis e Cambie, 1986; Bergquist *et al.*, 1991) mostraram que nem todas as espécies então classificadas na ordem Petrosia apresentavam esteróis com anéis ciclopripânicos ou estruturas relacionadas. Tais resultados indicam a necessidade de mais estudos com os esteróis das esponjas e possivelmente de novas classificações.

A análise dos esteróis de esponjas da ordem Halichondrida (Demospongiae), sugere a necessidade de uma revisão da relação filogenética entre algumas de suas famílias, indicando origem polifilética do gênero *Halichondria* enquanto que os gêneros *Myrmekioderma* e *Pseudoxinella* apresentariam uma origem monofilética (Castellanos *et al.*, 2003).

Gauvin e colaboradores (2004) analisaram os esteróis de esponjas do gênero *Xetospongiae* e comparando os resultados observados com dados da literatura de esponjas de duas espécies do mesmo gênero, identificaram a existência de três grupos diferentes, o que os levou a sugerir a necessidade de uma revisão taxonômica para o gênero.

A diversidade dos lipídios presente nas esponjas associada ao valor quimiotaxonômico que estes metabólitos apresentam mostra a importância destes estudos.

3.5. Espículas

As espículas são as estruturas de sustentação das esponjas pertencentes às classes Demospongiae, Homoscleromorpha e Hexactinellida. São compostas de sílica amorfa, opala, enquanto a classe Calcarea possui espículas de carbonato de cálcio (Schröder *et al.*, 2008). Evolutivamente, os organismos da classe Hexactinellida foram os primeiros a surgir, seguidos das Demospongiae e finalmente das Calcarea. Há evidências indicando que a biomíneralização do silício precede a do calcário em mais de 10 milhões de anos (Brasier, Green e Shields, 1997; Muller, 1998).

O primeiro relato de que algumas esponjas possuíam como elementos de sustentação, as espículas, compostas por “agulhas de vidro” organizadas de forma irregular, só foram relatadas em 1825 (Grey, 1825). Em 1885, as esponjas compostas de silício foram divididas em duas classes Hexactinellia e Demospongiae (Schulze, 1885), e estudos recentes determinaram a criação da classe Homoscleromorpha (Gazave *et al.*, 2012).

As espículas de sílica de ambas as classes possuem um canal axial central em torno do qual a sílica é depositada, no interior do canal se encontra um filamento com diâmetro na ordem de 1 µm e comprimento variável conforme o tamanho da espícula (Uriz, 2006). Um caso extremo são as espículas basais de *Monarhaphis chuni*, classe Hexactinellida, que atigem mais de 3 cm de comprimento e até 8,5 mm de diâmetro (Schulze, 1925; Müller, W. et al., 2007).

A formação das espículas de sílica é iniciada no interior de células especializadas, os esclerócitos, e concluída no meio extracelular. A compreensão da formação das espículas foi possível após a descoberta do filamento axial presente nas espículas de membros das classes Demospongiae e Hexactinellida contendo uma enzima que foi denominada silicateína. De forma oposta à relatada em plantas e diatomáceas, onde biosílica é depositada a partir de uma solução super saturada, as espículas das esponjas são formadas de um meio hiposaturado intermediado por enzimas, permitindo às esponjas formarem a biosílica em ambientes pobres em sílica (Müller et al., 2003; Uruz et al., 2003; Veremeichik et al., 2011; Wang et al., 2012).

A investigação dos filamentos de silicateína da esponja *Tethya aurantium* permitiu a identificação de três isoformas, silicateína α, β e γ, ocorrendo na proporção de 12 : 6 : 1 (Shimizu et al., 1998). Um mecanismo enzimático para a ação da silicateína α de polimerização da sílica (Figura 29) foi proposto por Cha e colaboradores (1999).

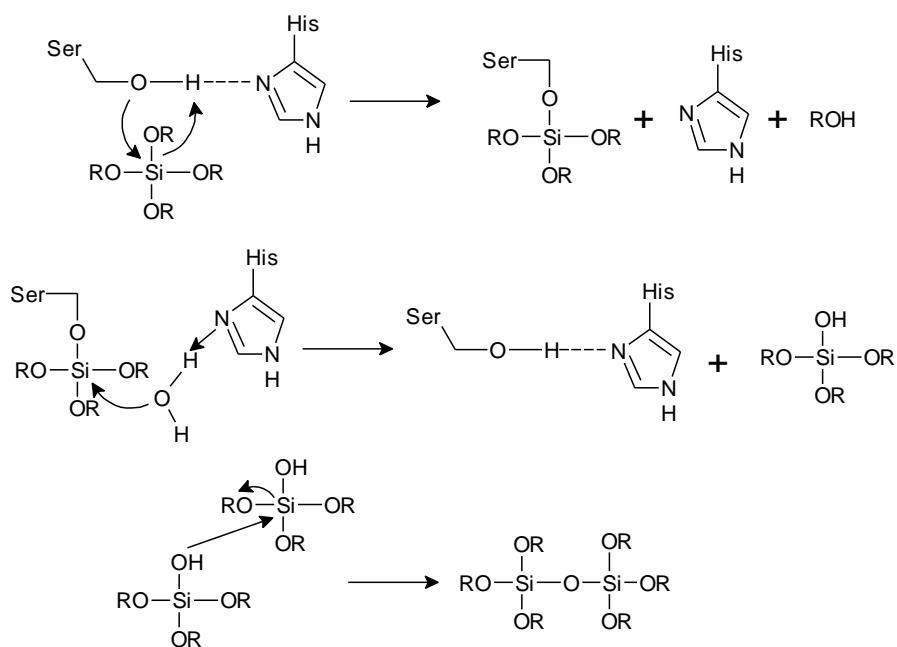


Figura 29: Proposto de mecanismo de ação da silicateína α (Cha et al., 1999).

A presença de múltiplas silicateinas, em esponjas dulcícolas foi demonstrada com a identificação de duas silicateinas α nas espículas da espécie *Lubomirskia baicalensis* (Kaluzhnaya *et al.*, 2007). A análise de espículas de esponjas coletadas no rio Negro, porém sem identificação taxonômica, demonstrou a natureza amorfa e mesoporosa desse material, sugerindo o uso de mecanismos enzimáticos biomiméticos para sintetizar esse material *in vitro* (Jensen *et al.*, 2009; Jensen, Keding e Yue, 2011).

A composição elementar das esponjas pertencentes à classe Demospongiae varia significantemente conforme a espécie, mas é primordialmente silício, oxigênio e hidrogênio, sendo que a sílica pode representar mais de 75% da massa seca do animal. Outros elementos se fazem presentes nas espículas, porém em baixas concentrações, entre os quais, destacam-se: alumínio, cálcio, cloro, cobre, ferro, potássio, sódio, enxofre e zinco (Sandford, 2003; Uriz *et al.*, 2003; Müller, W. E. G. *et al.*, 2007; Schröder *et al.*, 2008).

As espículas purificadas da esponja dulcícola *Drulia uruguayensis*, coletadas no rio tapajós apresentaram o silício como componente majoritário (18,9%). Os elementos cálcio, ferro, cobre e zinco também foram observados nas espículas analisadas (Magalhães *et al.*, 2011).

A variação da composição elementar das esponjas em função da espécie estudada pode ser uma informação quimiotaxonômica relevante.

3.5.1. Sílica

A sílica, SiO_2 , é composta dos dois elementos mais abundantes na crosta terrestre, e ocorre naturalmente com elevada pureza tanto em formas cristalinas quanto amorfas, além de combinações com outros metais e silicatos (Iler, 1979; Moore, 1999).

A humanidade mantém uma relação estreita com a sílica. Na antiguidade, o conhecimento empírico indicava qual argila utilizar para cada finalidade, como potes para armazenar ou cozinhar alimento, ou tijolos de construção. Diversos processos tecnológicos atuais empregam sílica, como a fabricação de cerâmicas, a construção civil e a química fina, entre outros (Kalapathy, Proctor e Shultz, 2002; Björnström *et al.*, 2003; Della *et al.*, 2006).

Por ser geralmente obtida de fontes minerais, em processos dispendiosos (Iler, 1979; Kalapathy, Proctor e Shultz, 2002; Da Silva Jr *et al.*, 2010) a busca de fontes alternativas para

sílica amorfa tem explorado o potencial da casca de arroz ou mesmo de suas cinzas, um subproduto encontrado em abundância, que contém grande quantidade de sílica, (Kamath e Proctor, 1998; Kalapathy, Proctor e Shultz, 2000a; b; 2002; Foletto *et al.*, 2005; Della *et al.*, 2006; Abdel-Mohdy *et al.*, 2009; Da Silva Jr *et al.*, 2010; De Lima *et al.*, 2011). Outras fontes de sílica amorfa como resíduos de alto forno (Seggiani e Vitolo, 2003) e cinzas de óleo de xisto (Gao *et al.*, 2010) também são utilizadas.

Um exemplo do potencial tecnológico de espículas de esponjas foi demonstrado ao empregar um tipo específico destas, “*sterrasters*”, provenientes da esponja do gênero *Geodia* de forma ovóide, como suporte para coluna de cromatografia em fase gasosa. As espículas apresentaram desempenho satisfatório, possibilitando uma boa separação de uma mistura de alcoóis e cetonas (Webb, Smith e Wells, 1965).

As espículas silicosas de esponjas associadas a “esqueletos” de diatomáceas, argila, grãos de areias e matéria orgânica, em proporções variáveis, formam rochas denominadas de espongilitos. Estes apresentam diversas aplicações nas indústrias de cerâmicas, produtos refratários, suprimentos para cromatografia e suporte para catalisadores (Volkmer-Ribeiro e Motta, 1995; Melnikov *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2011).

As esponjas dulcícolas podem representar uma nova fonte de sílica amorfa, material que possui diferentes aplicações.

3.6. Bioindicadores

A possibilidade de empregar esponjas como bioindicadores vem sendo investigada (Patel, Balani e Patel, 1985; Perez *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2006), a condição de animais sésseis e filtradores as tornam intimamente ligadas ao meio que habitam.

A concentração total de um metal em um invertebrado aquático, como as esponjas, vai depender do histórico de obtenção e acumulação do elemento pelo animal e do ambiente. A habilidade de incorporar elementos pelas esponjas é documentada para diversas espécies e metais, como ouro (Bowen, 1968) e ferro (Le Pennec *et al.*, 2003), por exemplo. Há também indícios de certa seletividade do material incorporado tanto pela composição quanto pelo tamanho dos grãos presentes no ambiente, influenciada pelo substrato no qual a esponja se encontra aderida, embora os mecanismos envolvidos não sejam claros, nem a função do

material incorporado nestes organismos. O substrato também exerce influência sobre sua expressão gênica (Pozzolini *et al.*, 2010).

A capacidade de acúmulo de metais por estes organismos pode ocorrer tanto diretamente dos metais dissolvidos na água que circula através das esponjas, quanto das partículas suspensas coletadas e absorvidas como alimento por estes animais (Roberts *et al.*, 2008).

A habilidade da esponja *Halichondria panicea* acumular cobre, zinco e cádmio em proporções diretas às encontradas em seu habitat foi demonstrada com altas taxas de acúmulo. Com a transferência da esponja para outro ambiente não impactado foi observada a redução na concentração dos metais previamente acumulados (Hansen, Weeks e Depledge, 1995).

Esponjas da espécie *Spirastrella cuspidifera* coletadas na costa da Índia apresentaram capacidade de acumular Cd, Cr, e Sn na faixa de 15 a 2000 µg g⁻¹ de massa seca, com 5 a 7 ordens de magnitude maiores que a água ambiente. Em *Petrostylyssa foetida*, no mesmo nicho ecológico, não foi possível detectar estes íons metálicos. A esponja *Spirastrella cuspidifera* apresentou também maior capacidade de acúmulo de Ni, Co, Zn e Ti, enquanto as concentrações de Cu, Mn, Pb, Fe e Sr eram mais elevadas em *Petrostylyssa foetida*. Os halogênios Br e I apresentaram praticamente a mesma concentração nas duas espécies (Patel, Balani e Patel, 1985).

Estudos com esponjas *Petrosia testudinaria* coletadas em duas regiões da costa indiana indicaram que aquelas situadas próximas à costa (1 Km) apresentaram concentrações de metais pesados (Al, Fe, Mn, As, Ni, Co, Cu, Se) até 64 vezes maiores que as situadas distante do continente (5 a 7 Km), mostrando o potencial de bioindicador destes organismos (Rao *et al.*, 2006).

As esponjas também são capazes de acumular poluentes orgânicos como demonstrado pela esponja marinha *Spongia officinalis*. A concentração de 24 substâncias da classe bifenil policlorados (PCB) apresentou concordância com a concentração na área de estudo. As maiores concentrações encontradas foram para hexa- e heptaclorobifenil (Perez *et al.*, 2003).

O uso de esponjas como bioindicadores representa uma nova alternativa para o monitoramento do vasto sistema hidrográfico amazônico.

3.7. Cromatografia

A cromatografia é um método físico químico de separação de uma mistura, através da distribuição de seus componentes entre duas fases que se encontram em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Enquanto a fase móvel passa através da fase estacionária os componentes da mistura são distribuídos entre as mesmas de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária resultando em migrações diferenciadas (Collins, 2006).

A palavra cromatografia deriva das palavras gregas *chrom* que significa cor e *graphe* que significa escrever, embora o processo não dependa de cor, e é atribuída ao botânico Tswett, que em 1906 a utilizou em um trabalho que descreve a separação dos componentes de extratos de folhas, embora a técnica tenha registros anteriores a esse. No experimento empregou colunas de vidro recheadas com vários sólidos finamente divididos como fase estacionária e éter como fase móvel (Tswett, 1906a; b).

Existem diversas formas de classificar as diferentes modalidades de cromatografia, podendo ser feita pela natureza das fases móveis e estacionárias usadas e o mecanismo de separação empregado (Figura 30) (Poole, Cooke e Wilson, 2000).

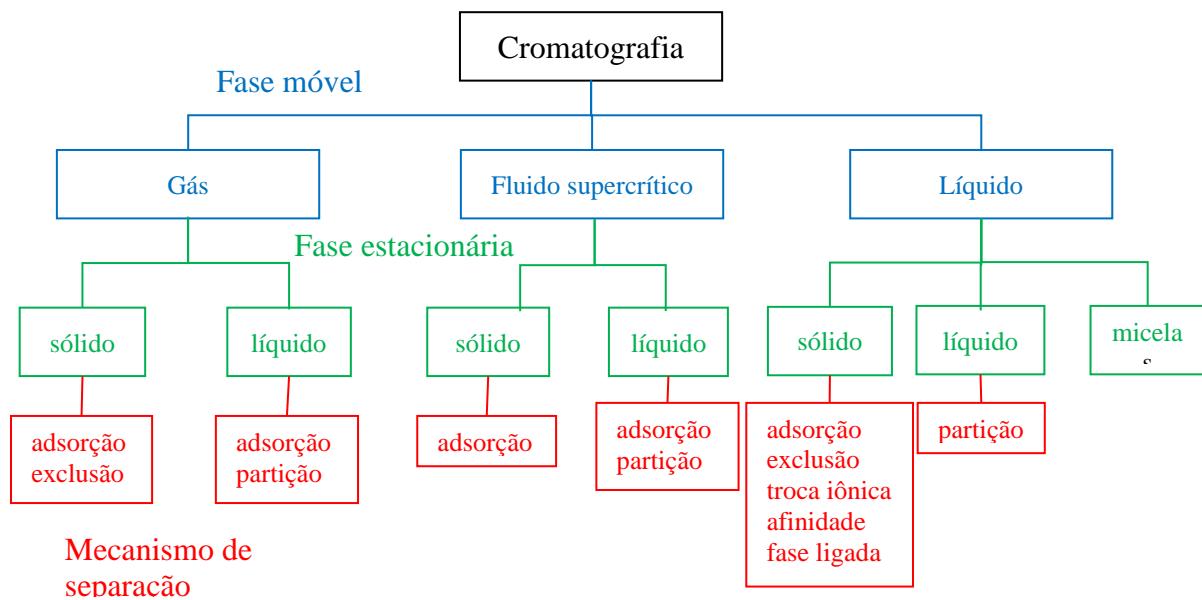


Figura 30: Técnicas cromatográficas.

A cromatografia em camada delgada consiste em uma técnica de separação de componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada fina de adsorvente aderido a uma superfície plana, tendo como marco inicial trabalho publicado em 1938 por Izmailov e Sharaiber. O processo de separação está baseado, basicamente na adsorção, porém usando-se fases estacionárias tratadas podem ocorrer por outros mecanismos (Shostenkot, Georgievskii e Levin, 2000; Vichenewski, 2006).

A cromatografia em fase líquida em coluna aberta pode empregar os mesmos adsorventes que a cromatografia em camada delgada, sendo de fácil execução não exigindo grande instrumentação (Vichenewski, 2006).

Existe uma grande diversidade de adsorventes comercialmente disponíveis sendo os mais empregados: sílica, alumina, celulose e poliamida (Vichenewski, 2006).

Diversos trabalhos ilustram o uso de sílica tratada com soluções de nitrato de prata (AgNO_3) para a separação de compostos com diferentes graus de insaturação (Ikan, 1965; Ikan e Cudzinovski, 1965; Nano e Martelli, 1966; Vroman e Cohen, 1967; Stevens, 1968; Nikolova-Damyanova, Christie e Herslön, 1996). A técnica se baseia na formação de um complexo entre os elétrons presentes na ligação dupla e os íons de prata, que aumenta a retenção dos compostos insaturados levando a uma migração diferenciada em função do número de ligações duplas presentes na estrutura (Eberz *et al.*, 1937; Winstein e Lucas, 1938).

O uso de sílica impregnada com sulfato de cobre (CuSO_4) também mostra bons resultados na separação de ácidos biliares, porém o mecanismo envolvido não está completamente estabelecido (Dołowy, 2007; Pyka e Klimczok, 2008).

A sílica tratada com hidróxido de potássio (KOH) é descrita como uma ferramenta para a separação de ácidos orgânicos de misturas complexas através de um mecanismo de troca iônica. Análises espectroscópicas indicam que o hidróxido de potássio não fica retido na sílica, mas sim ocorre a formação de silicatos de potássio (McCarthy e Duthie, 1962; Douglas e Powell, 1969; Ramljak *et al.*, 1977; Khulbe, Mann e Macphee, 1996; Pinto *et al.*, 1997; Pinto *et al.*, 2000; Lima *et al.*, 2003).

A cromatografia em fase líquida apresenta um incremento em sua eficiência com a redução das partículas empregadas como fase estacionária (Snyder e Kirkland, 1979), sendo a cromatografia flash (Still, Kahn e Mitra, 1978; Fair e Kormos, 2008) e a cromatografia de alta eficiência (Snyder e Kirkland, 1979; Snyder, Kirkland e Glajch, 1997) evoluções naturais da cromatografia em fase líquida.

3.7.1. Cromatografia em fase gasosa (CG)

O desenvolvimento da cromatografia em fase gasosa acelerou-se após um trabalho pioneiro explorando a partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida para separar ácidos carboxílicos com cadeias de 1 a 12 carbonos (James e Martin, 1952).

Um sistema de cromatografia a gás é composto basicamente por um reservatório para o gás de arraste (eluente), uma coluna disposta no interior de um forno no qual é possível realizar o controle da temperatura, um sistema de injeção para a amostra, um detector e um registrador (Figura 31) (Fowlis, 1994; Bonato, 2006).

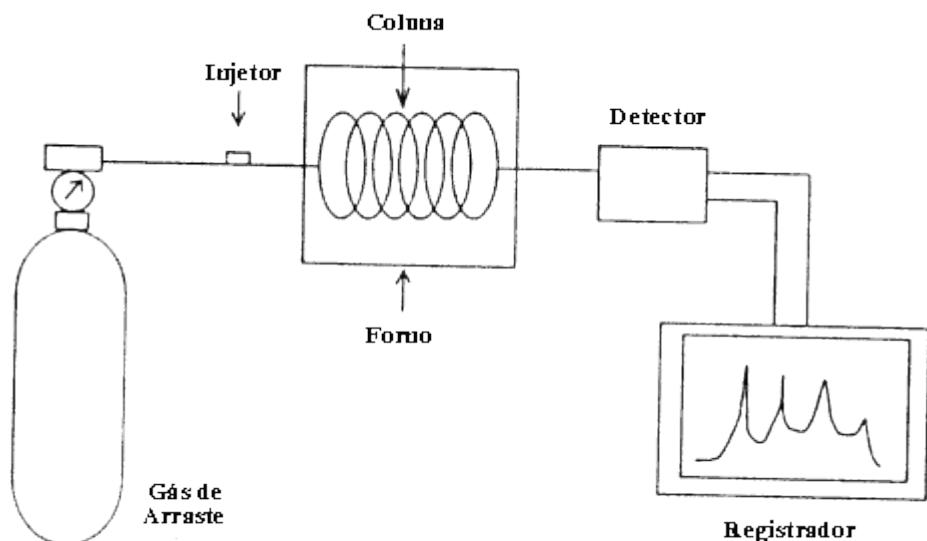


Figura 31: Esquema básico de um cromatógrafo em fase gasosa.

A cromatografia em fase gasosa tornou possível a análise de dezenas de substâncias de uma mesma amostra em função de sua excelente resolução e os baixos limites de detecção que pode atingir. Em função da substância a ser analisada e do detector a ser empregado consegue-se detectar valores inferiores a 10^{-12} g (Bonato, 2006).

3.7.1.1. *Detectores*

As amostras, após serem separadas na coluna, devem ser detectadas para então serem registradas. Esse detector pode apresentar uma certa seletividade respondendo a apenas uma classe de substâncias ou ser universal detectando qualquer substância presente na amostra. É ideal que os detectores apresentem uma alta sensibilidade, sendo essa definida como mudança na resposta do detector em função da quantidade detectada. Outra característica importante dos detectores é o ruído, que são variações na linha de base em determinado intervalo de tempo, representando efeitos eletrônicos do sistema de detecção. O ruído interfere diretamente na quantidade mínima detectável, que é definida como a quantidade mínima de amostra que gera uma resposta três vezes superior ao ruído. Para análises quantitativas é importante determinar a faixa de linearidade do detector, que é definida como a razão entre a maior e a menor concentração de amostra onde a resposta do detector é linear (Bonato, 2006).

3.7.1.1.1. Detector de ionização por chama (DIC)

O detector de ionização por chama é o mais frequentemente empregado. O eluente da coluna é queimado em uma pequena câmara por uma chama de oxi-hidrogênio produzindo alguns íons no processo. Estes íons são coletados gerando uma pequena corrente elétrica que é então amplificada gerando o sinal. Compostos que não contêm carbono orgânico não são detectados, possibilitando análises de amostras que contenham água, desde que isso não interfira na separação cromatográfica (McNair e Miller, 1997).

3.7.1.2. *Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)*

A interface entre o cromatógrafo em fase gasosa e o espectrômetro de massas é responsável por transportar o eluente da coluna proveniente do cromatógrafo em fase gasosa para o espectrômetro de massas. Isto deve ser feito tomando cuidado para que o analito não

condense nesta interface e também não degrade antes de entrar na fonte de íons do espectrômetro de massas. Além disso, o fluxo de gás que entra na fonte de íons deve ser inferior a capacidade da bomba de vácuo do espectrômetro de massas (Kitson, Larsen e Mcewen, 1996).

Thomson, em 1913, demonstrou que o gás neon apresentava diferentes espécies atômicas, possuindo massa atômica entre 20 e 22 unidades (Thomson, 1921). Essas diferentes espécies foram posteriormente denominadas isótopos e esse trabalho concedeu a Thomson o título de “pai da espectrometria de massas”.

Um espectrômetro de massas é um aparelho capaz de medir a relação massa carga de um íon em fase gasosa e determinar a abundância de cada espécie iônica. Em cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas a carga é quase sempre 1. Todos os espectrômetros de massas funcionam separando íons em fase gasosa em um ambiente de baixa pressão pela interação entre um campo magnético ou elétrico com a partícula carregada (Kitson, Larsen e Mcewen, 1996).

A cromatografia em fase gasosa é amplamente empregada para compostos de baixa polaridade, como na identificação de componentes de óleos essenciais além de aplicações em química de alimentos, petróleo, forenses e biológicas (Jennings, Mittlefehldt e Stemple, 1997; Alvarez, 2004; Brettell, 2004; Smith, Craig e Walters, 2004; Snyder, 2004; Adams, 2009).

3.7.1.3. *Derivatização para cromatografia em fase gasosa*

A desvantagem da técnica de cromatografia em fase gasosa é que se limita a substâncias voláteis e termicamente estáveis. À derivatização é obrigatória para substâncias polares e termolábeis a fim de possibilitar a análise cromatográfica. A redução da polaridade, geralmente, melhora as condições cromatográficas da substância, minimizando adsorção indesejada e permitindo a obtenção de picos melhor definidos, melhorando a resolução. A separação de compostos de difícil separação pode ser facilitada com o uso de derivatizantes apropriados (Segura, Ventura e Jurado, 1998; Bonato, 2006).

Moléculas contendo um grupo funcional protônico são frequentemente derivatizadas empregando reações de sililação, sendo o reagente trimetilsilil o mais comum. A habilidade

de formar derivados silil para os grupos funcionais segue a ordem: álcool > fenol > ácidos carboxílicos > aminas > amidas (Evershed, 1993; Segura, Ventura e Jurado, 1998; Bonato, 2006).

Alguns esteróis não exibem boas características cromatográficas, principalmente pela presença de grupos cetonas e/ou hidroxilos. Dentre diversos derivatizantes para grupos hidroxila existentes, reações com trimetilsilil são bastante úteis (Evershed, 1993; Segura, Ventura e Jurado, 1998; Andrási *et al.*, 2011).

Reações de acilação também são frequentemente empregadas como derivatização para cromatografia em fase gasosa. Consiste na introdução de um grupo acila em uma molécula contendo um hidrogênio reativo. Derivados acilados podem ser obtidos de uma variedade de grupos funcionais como alcoóis, aminas, amidas, tióis, fenóis, enóis, sulfanamidas, compostos insaturados e anéis aromáticos. Reações de acilação são geralmente realizadas empregando três tipos principais de reagentes: haletos de acila, anidridos ácidos ou derivados reativos de acila como imidazóis ácidos (Blau, 1993; Segura, Ventura e Jurado, 1998).

Reações de acilação também são documentadas na identificação de esteróis de esponjas, sendo frequentemente relatada a reação de acetilação empregando anidrido acético e piridina (Manconi *et al.*, 1988; Kolesnikova, Makarieva e Stonik, 1992; Santalova *et al.*, 2004; Aknin *et al.*, 2010).

O uso de agentes derivatizantes também se faz necessário quando o espectro de massas da substância não apresenta íons diagnósticos (Segura, Ventura e Jurado, 1998). A cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas é amplamente aplicada na análise estrutural de ácidos graxos. Empregando derivatizantes apropriados é possível determinar a posição de ramificações, anéis, heteroátomos e insaturações (Dobson e Christie, 2002).

3.8. Espectroscopia de fluorescência de raios-X

Logo após a descoberta dos raios-X em 1895, por Wilhelm Conrad Röntgen, a possibilidade da fluorescência de raios-X foi demonstrada. Porém, foram necessárias algumas décadas até que, em 1948, Friedmann e Birks desenvolvessem o primeiro espectrômetro de raios-X. O primeiro detector semicondutor que possibilitou o desenvolvimento da

fluorescência de raios-X por dispersão de energia (EDXRF) foi desenvolvido no final da década de 1960, principalmente no Lawrence Berkeley Lab (Van Friecken, 2004).

Um modo simplificado para explicar a emissão de raios-X seria que ao bombardear uma amostra com raios-X, os átomos atingem um estado de excitação levando à vacâncias nas camadas eletrônicas inferiores. Um elétron é então transferido para a camada inferior para suprir essa vacância, emitindo raios-X que são equivalentes à diferença de energia entre os níveis eletrônicos envolvidos (Figura 32). Cada elemento emite raios-X com comprimento de onda e energia característicos, permitindo a identificação dos mesmos presentes na amostra (Patnaik, 2004).

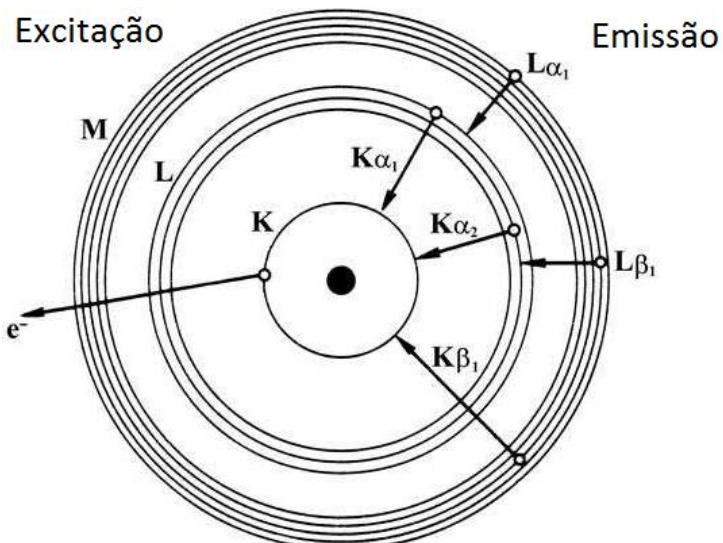


Figura 32: Princípio da fluorescência de raios X.

A fluorescência de raios-X rivaliza com a precisão de técnicas de química via úmida na análise de elementos majoritários. No entanto é difícil para detectar elementos com concentração inferior a uma parte em 10.000 (Patnaik, 2004). A técnica apresenta grandes vantagens como a capacidade de realizar análise multi-elementar e a possibilidade de estudar amostras sólidas, geralmente preparadas como pastilhas prensadas de pó (Kramar, 1997; Patnaik, 2004; Van Friecken, 2004).

Tradicionalmente EDXRF tem sido excluída de metodologias de certificação de material, no entanto um método empregando fluorescência de raios-X por dispersão de energia usando luz síncrotron (ED-SRXRF) passou a fazer parte da metodologia de certificação do Instituto Federal de Pesquisa de Materiais e Testes da Alemanha, mostrando que todos os

riscos de interferências por picos intensos e subtração de ruído de fundo não são mais razões para excluir a técnica (Radtke, Vincze e Gorner, 2010).

A composição inorgânica da oleorresina de cinco espécies da família Burseraceae, conhecido popularmente por breu, foi investigada empregando a técnica de EDXRF. O estudo identificou a presença de um padrão de composição nas amostras analisadas, inclusive sugerindo a presença de mecanismos de absorção seletiva diferentes para determinadas espécies (Rüdiger, Silva e Veiga Junior, 2009).

Moedas de prata gregas encontradas na península Ibérica, provenientes do período entre os séculos I (um) e V (cinco) antes de Cristo, foram caracterizadas empregando EDXRF, mostrando que a prata representa, em média, 98,32% das moedas, indicando o domínio de um bom processo de purificação do minério pelos antigos gregos (Pitarch e Queralt, 2010).

A análise de elementos traço nas cascas de árvores, empregando EDXRF, foi empregada para avaliar a poluição gerada pela produção de cimentos nas cidades de Laranjeiras e Nossa Senhora do Socorro, no estado do Sergipe. O acumulo de determinados elementos nas amostras analisadas indicou que a emissão gerada pelas indústrias de cimento afeta a região como um todo (Ferreira *et al.*, 2012).

A técnica de EDXRF também foi empregada para avaliar elementos traço (Ca, Fe, Cu e Zn) em tecidos mamários, cancerígeno e normal. A concentração dos elementos avaliados foi mais elevada nos tecidos neoplásicos (benignos e malignos) quando comparada as amostras de tecido normal, mostrando que estes elementos podem ser usados como biomarcadores para os tumores (Silva *et al.*, 2012).

Empregando EDXRF para determinar a concentração dos elementos traços (K, Ca, Fe, Cu, Zn, Si, Sr, Al e Au) e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) para os elementos ultra traço (Mn, Pb, As, Hg, V, Cr, Sn, Cd, Ni e Co), amostras de mexilhão (*Mytilus galloprovincialis*), coletado no Cape Town Harbour, foram analisadas revelando a presença de concentrações médias acima dos valores recomendados pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) foi relatada (Fatoki *et al.*, 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Solvente

Todo o solvente utilizado no presente estudo apresenta grau de pureza para análise (P.A.) e foi previamente destilado no laboratório, com exceção do ácido bórico, sólido, empregado nas diluições para fluorescência de raios-X.

4.2. Material animal

Durante os períodos de baixa das águas as esponjas ficam expostas facilitando a sua localização e coleta, desta forma foram realizadas excursões a diversos locais, com posição determinada por GPS (*Global Positioning System*). Os espécimes foram frequentemente encontrados aderidos a vegetação sujeita aos pulsos de inundação, ou rochas nos leitos dos rios.

As amostras coletadas submersas foram armazenadas em freezer até a extração, enquanto que as amostras coletadas secas, em função do ciclo das águas, foram trituradas e devidamente armazenadas após serem limpas mecanicamente para remoção dos galhos, folhas e rochas aos quais se encontravam aderidas (Araújo *et al.*, 2003).

Fragmentos das esponjas coletadas foram separados para a identificação taxonômica, atentando para a presença de gêmulas nestes fragmentos, essenciais para identificação.

Para a preparação das espículas para identificação taxonômica, sob microscópio estereoscópico, um pequeno pedaço de esponja contendo gêmulas foi colocado sobre uma placa histológica. Pingou-se duas a três gotas de ácido nítrico a 65%. Posicionou-se a lâmina sobre uma chama levando o ácido à fervura, até constatar a total eliminação da matéria orgânica que envolvia as espículas. Gotejou-se, em seguida, água sobre as espículas dissociadas e a deixou evaporar sobre a chama, repetiu-se a operação três vezes para eliminar resíduos de ácido. Uma vez que o resíduo silicoso estava bem seco cobriu-se a preparação com Entelan® e lamínula (Volkmer-Ribeiro, 1985).

A identificação foi realizada pela Dra. Cecília Volkmer-Ribeiro, da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, em Porto Alegre-RS, e amostras “voucher” dos materiais coletados foram depositadas e catalogadas no Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (MCN-FZB) e no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

4.3. Preparo dos extratos

Inicialmente os extratos foram preparados por maceração. Em função do baixo rendimento observado outras técnicas de extração foram testadas, e a extração em aparelho Soxhlet apresentou melhores resultados.

4.3.1. Maceração

4.3.1.1. Maceração com solventes em ordem crescente de polaridade

Foram preparados extratos por maceração sucessiva com solventes de polaridade crescente (hexano, acetato de etila e metanol). Quantidades de solvente suficientes para cobrir as amostras foram adicionadas às mesmas e após cinco dias o solvente foi removido e concentrado em evaporador rotativo à pressão reduzida. O processo foi repetido cinco vezes com cada um dos solventes empregados, resultando em três extratos para cada amostra.

4.3.1.2. Maceração em metanol

As esponjas coletadas submersas foram extraídas por maceração em metanol. O material congelado foi submerso diretamente no solvente por sete dias, após este período o

solvente foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo à pressão reduzida. Esse processo foi repetido três vezes. O extrato concentrado obtido foi particionado com hexano, diclorometano e acetato de etila. A Figura 33 ilustra o procedimento adotado.

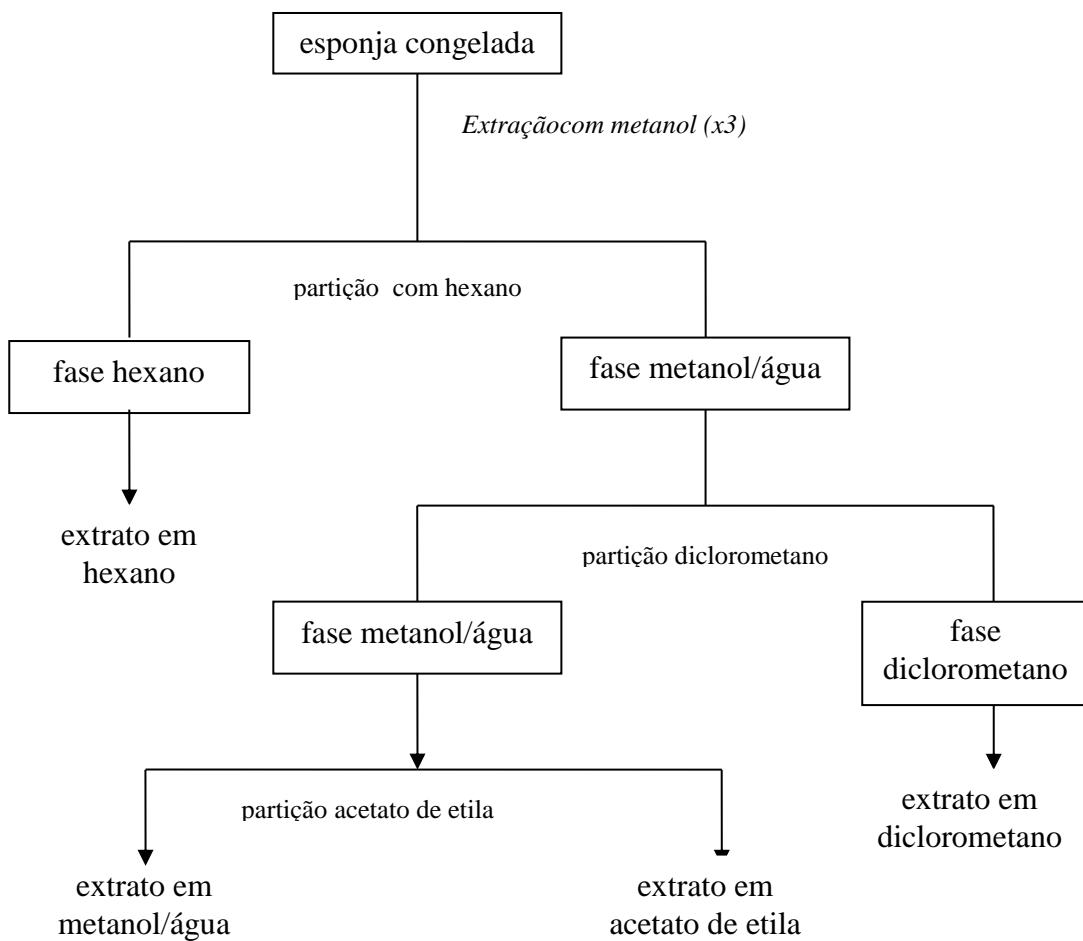


Figura 33: Extração e partição de amostra de coletadas submersas.

4.3.2. Extração em aparelho de Soxhlet

Foram preparados extratos empregando extrator tipo Soxhlet, no qual as amostras foram extraídas por 12 h com três solventes em polaridade crescente (hexano, acetato de etila e metanol) originando três extratos para cada amostra.

4.3.3. Extração da fração volátil

A extração foi realizada em aparelho Likens-Nickerson (Macleod e Cave, 1975). A esponja congelada foi submetida por 3 h à extração e destilação simultânea (SDE) continua e a fração volátil, obtida em clorofórmio foi seca com Na_2SO_4 anidro e armazenada em freezer até a análise (Roussis *et al.*, 1995).

4.4. Técnicas Cromatográficas

A fim de separar os constituintes majoritários presentes nos extratos orgânicos obtidos, diversas técnicas cromatográficas foram empregadas, tais como: Cromatografia em Coluna Aberta (CCA), Cromatografia de com sílica impregnada com KOH (CIK), Cromatografia em Coluna Flash (CCF) e Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

As características do extrato a ser estudado determinaram a técnica a ser empregada.

4.4.1. Cromatografia em Coluna Aberta

Utilizou-se sílica de fase normal 60A, 60 – 200 mesh, Acros Organics[®] como fase estacionária, empacotada em uma coluna de vidro aberta, onde foram utilizados como fase móvel diferentes solventes sempre com gradiente de polaridade crescente.

Empregou-se colunas com diferentes diâmetros escolhidas conforme a massa da amostra a ser fracionada para obter-se sempre um caminho cromatográfico mínimo de 10 cm e máximo de 20 cm.

A razão de massa de sílica e massa de amostra foi avaliada empregando inicialmente 20 : 1 e devido à baixa resolução obtida, foi gradativamente aumentada até 50:1, em que observamos um resultado satisfatório, sendo então foi empregada nos processos seguintes.

4.4.2. Cromatografia em Coluna Flash

A cromatografia em coluna Flash foi realizada segundo metodologia descrita por Still, Kahn e Mitra (Still, Kahn e Mitra, 1978) empregando como fase estacionaria sílica Flash 230 – 400 mesh.

Nesta técnica empregou-se uma coluna de vidro de 2 cm de diâmetro. Uma pequena quantidade de algodão foi empregada para reter a fase estacionária no interior da coluna, adicionou-se a sílica sobre o algodão até formar uma coluna com aproximadamente 15 cm de altura. A fim de obter o empacotamento uniforme, com auxílio de uma bomba de ar, aplicou-se pressão ao interior do sistema até não haver mais variação na altura da coluna de sílica.

Foi adicionada a fase móvel previamente selecionada e, com auxílio da bomba de ar, forçou-se sua passagem pela coluna até completa uniformidade da coluna. Adicionou-se a amostra a ser fracionada no topo da coluna, amostra essa que não ultrapassava 160 mg, e recolheu-se 20 frações de 10 mL. Ao final do procedimento recolheu-se uma última fração de 100 mL de metanol a fim de recuperar o material que eventualmente pode ter ficado retido na coluna.

As frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada e reunidas por similaridade.

4.4.3. Cromatografia com sílica impregnada com KOH

A cromatografia com sílica impregnada com KOH empregando sílica de fase normal 60A, 60 – 200 nesh, Acros Organics® impregnada com solução de KOH 10% (m/v), como fase estacionária e diclorometano e metanol, como fases móveis.

Empregou-se uma razão de 1 para 40 em relação à massa da amostra a ser fracionada e a massa de sílica impregnada com KOH a ser empregada no procedimento. O diâmetro da coluna empregada foi escolhido em função da massa de sílica ser empregada a fim de obter um caminho cromatográfico mínimo de 10 cm.

O volume da fração em diclorometano empregado foi de 2,5 mL para cada grama de sílica, e o de metanol de 1 mL para cada grama de sílica.

Na fração em diclorometano ficaram contidas as substâncias não ácidas presentes na amostra inicial, enquanto que a fração obtida com metanol continha os sais de potássio dos ácidos que ficaram retidos na sílica tratada com o hidróxido de potássio.

A fração em metanol foi concentrada e re-suspendida em uma solução de metanol-agua onde o pH, que inicialmente era próximo a 12, foi corrigido para 2 empregando solução de ácido clorídrico 1,0 M, e em cada pH diferente, incluindo o inicial, a solução foi particionada com diclorometano.

4.4.4. Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada foi utilizada para uma avaliação prévia dos extratos obtidos, assim como para acompanhar os fracionamentos realizados.

Neste procedimento foram utilizadas placas flexíveis de alumínio cobertas com gel de sílica 60F₂₅₆ e dois reveladores universais, vanilina sulfúrica e sulfato célico.

4.4.5. Cromatografia em fase gasosa

As análises foram realizadas em cromatógrafo em fase gasosa modelo CG2010 Shimadzu® com detector de ionização de chama (CG-DIC) instalado no Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), com coluna DB-5, com medidas de 15 m x 0,25 mm x 0,25 µm, sendo utilizado como gás de arraste hélio em fluxo de 1 mLmin⁻¹ e cromatógrafo em fase gasosa modelo QP-2010 Shimadzu® acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM) com coluna similar, empregando a técnica de impacto eletrônico a 70 eV.

4.4.5.1. *Cromatografia em fase gasosa dos esteróis*

A temperatura da coluna foi programada para iniciar a 100 °C, com acréscimo de 5 °C min⁻¹ até 290 °C, permanecendo em 290 °C por 10 minutos e as injeções foram realizadas no modo *split* 1 : 20.

4.4.5.2. *Cromatografia em fase gasosa dos esteróis acetilados*

A análise foi realizada empregando uma isotermia a 280 °C por 60 minutos, as injeções foram realizadas no modo *split* 1 : 20.

4.4.5.3. *Cromatografia em fase gasosa da fração volátil das esponjas*

A temperatura da coluna foi programada para iniciar a 60 °C e subir 3 °C min⁻¹ até atingir 240 °C, e a injeção foi realizada no modo *splitless*. Padrões de hidrocarbonetos lineares foram injetados nas mesmas condições para a obtenção dos índices de retenção.

4.5. Acetilação

As amostras a serem acetiladas foram inicialmente dissolvidas em piridina, em uma concentração de 10 mg mL⁻¹ e em seguida foi adicionado igual volume de anidrido acético. A fim de reduzir o tempo reacional foi empregado 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalisador (Figura 34). O andamento da reação foi acompanhado por meio de cromatografia em camada delgada. Após aproximadamente 1 h a reação se completa, então foram adicionados gotas de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N possibilitando a observação da formação de um precipitado branco, prosseguiu-se com uma partição líquido-líquido com clorofórmio. A

fase em clorofórmio obtida é e então lavada com ácido clorídrico (HCl) 1 N e seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). Após a eliminação do solvente obtemos a amostra acetilada (Shiraishi, 1978).

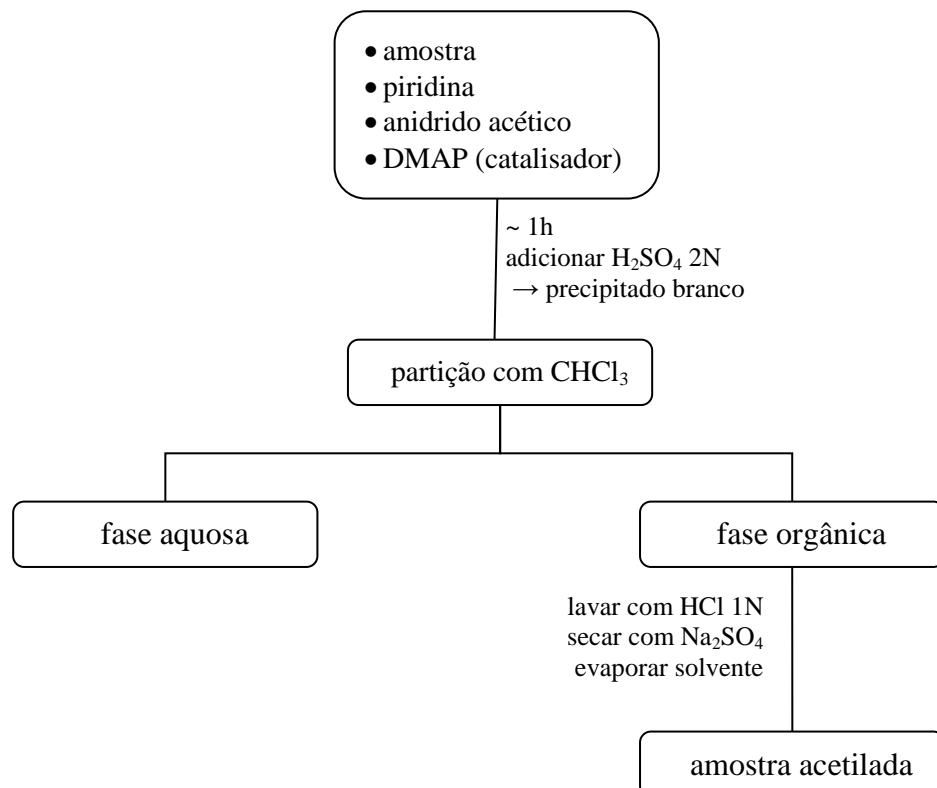


Figura 34: Metodologia de acetilação.

4.6. Fluorescência de raios-X

Foi utilizada a técnica de fluorescência de raios-X por dispersão de energia (EDXRF) em estado sólido, em equipamento modelo Shimadzu EDX 700, instalado no Laboratório de Pesquisas e Ensaios de Combustíveis (LAPEC) na Universidade Federal do Amazonas, para determinar a composição elementar das amostras analisadas. As pastilhas foram preparadas em uma prensa de 10.000 Kgf, utilizando 7,0000 g de H_3BO_3 para a fixação de 1,0000 g da amostra. Cada amostra foi analisada em triplicata, usando radiação Rh $\text{K}\alpha$, colimador em 10 mm, em atmosfera de vácuo. O tempo de irradiação foi de 200 s para cada amostra.

4.6.1. Quantificação dos elementos observados

A calibração do equipamento foi realizada utilizando padrões de referência geológicos: GBW 3125, GBW 7105, GBW 7113, entre outros. Assim, obteve-se um erro médio entre 1% e 12% para os elementos quantificados aqui. Com o objetivo de medir a exatidão e precisão do método, os mesmos padrões foram analisados cinco vezes cada, obtendo um desvio padrão médio de 7%. Os limites de detecção foram calculados utilizando a fórmula sugerida por Araújo e colaboradores (2003), atingindo valores de 10 ppm para os elementos mais pesados, e de 150 ppm para os de número atómico menores.

A concentração dos elementos nas primeiras amostras analisadas, em função das intensidades encontrados, mostrou que somente a diluição de 1: 7 em ácido bórico seria suficiente para minimizar o efeito da matriz.

Sais de pureza conhecidos, diluídos em ácido bórico, também de pureza conhecido, foram usados em seis concentrações pré-determinadas, as quais foram submetidas às mesmas condições de análise que as amostras. Estes padrões foram analisados sob as mesmas condições das amostras, para gerar curvas padrão que foram usadas para a quantificação de cada elemento. A quantificação com padrões externos foi realizado para cada elemento detectado.

4.7. Difração de raios-X

A difração de raios-X foi empregada com o equipamento modelo Shimadzu® XRD 6000, instalado no departamento de Geologia da Universidade Federal do Amazonas, para determinar a cristalinidade. As especificações utilizadas na coleta de dados são: radiação Cu K_a, 40 KV, 30 mA, velocidade de 2,0 ° min⁻¹, 0,02⁰ de passo, com varredura entre 04 e 60°.

O cálculo da cristalinidade foi realizada através da formula:

$$x = \frac{1}{1 + K \times \frac{I_a}{I_{cr}}}$$

onde I_{cr} é o índice de cristalinidade, I_a é intensidade de difração amorfa e K é a razão entre a intensidade espalhamento do raios-X da fração amorfa de uma massa conhecida de material e a fração cristalina.

4.8. Obtenção de sílica com alto grau de pureza de esponjas de água doce

Amostras de esponjas foram submetidas a dois diferentes processos para obtenção de sílica com alto grau de pureza.

O primeiro método foi adaptado de um trabalho com cinzas de casca de arroz (Kalapathy, Proctor e Shultz, 2000a). Inicialmente, foram adicionados 60 mL de água ultra pura e 10 g de esponja a um Erlenmeyer, o pH da solução foi ajustado para 1,0 empregando uma solução de HCl 6,0 M e mantida sob agitação constante por 2 h. Após esse período, o material foi filtrado e o sólido obtido foi solubilizado com 60 mL NaOH 1,0 M, sob aquecimento e agitação constante por 1 h. Decorrido o tempo, o material foi novamente filtrado, a solução obtida ficou em repouso até seu resfriamento à temperatura ambiente e, então, o pH foi ajustado para 7,0 empregando solução de HCl 1,0 M e deixado repousando por 18 horas. Posteriormente, foram adicionados 100 mL de água ultra pura e a solução foi centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos e seca a 80 °C, o precipitado foi separado e o procedimento foi repetido 2 vezes, resultando na amostra I (Figura 35).

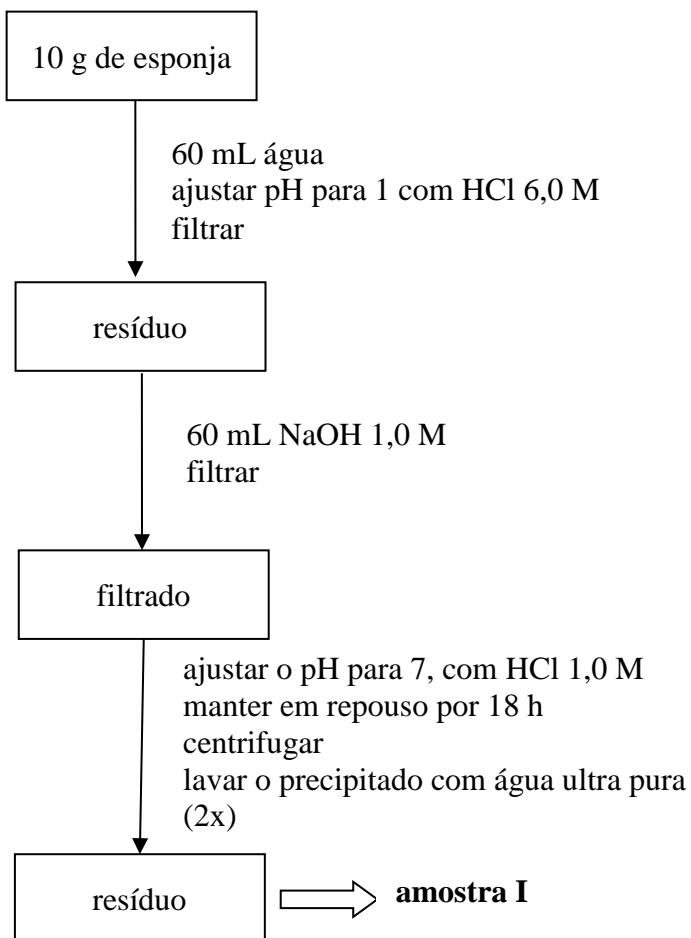


Figura 35: Primeira metodologia de purificação de sílica de espículas de *M. reticulata*.

A segunda metodologia empregada foi adaptada de da Silva Júnior e colaboradores (2010), na qual 12 g de esponja e 160 mL de ácido nítrico foram colocados em um Erlenmeyer e deixados sob agitação por 1 h. Posteriormente, a solução foi filtrada e o sólido lavado com água ultra pura, até não apresentar mais mudança na coloração, e o resíduo foi seco em estufa a 100 °C. Foram adicionados 60 mL de solução de $\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{H}_2\text{O}_2$ (2:1 v/v) e mantida sob agitação por 30 minutos. Decorrido esse tempo, a solução foi filtrada utilizando uma placa de vidro sinterizado, porosidade G3, e o resíduo foi lavado novamente até não apresentar mudança na coloração, e seco em estufa a 100 °C. O material obtido foi então calcinado a 600 °C por 4 h em forno tipo mufla, e então passou a ser denominada de amostra II (Figura 36).

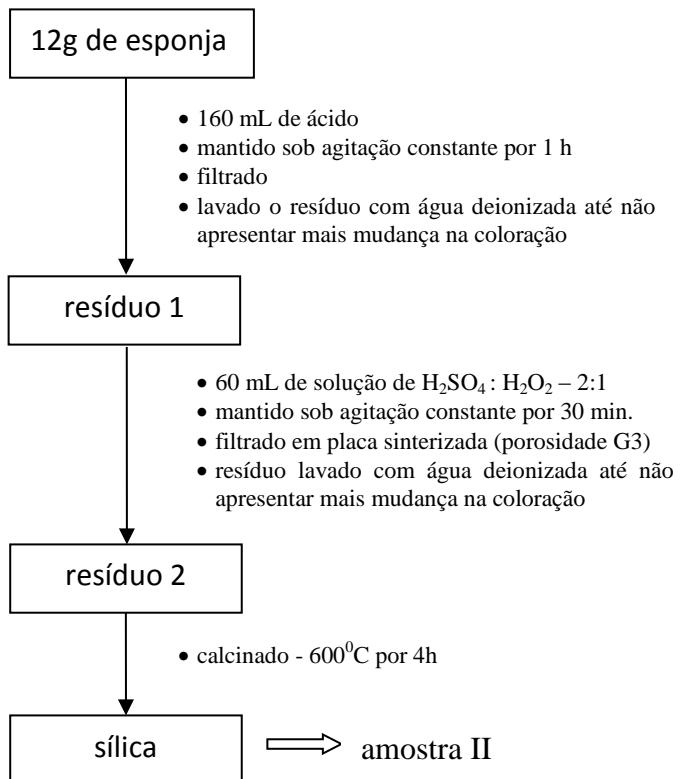


Figura 36: Segunda metodologia de purificação de sílica de espículas de *M. reticulata*

4.9. Ensaios enzimáticos e biológicos

4.9.1. Avaliação da atividade antimicrobiana

Os ensaios para avaliar a atividade antimicrobiana foram realizados no Instituto Leônidas e Maria Deane, unidade da Fundação Oswaldo Cruz em Manaus, sob a supervisão da Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira e do pós doutorando Dr. Fabio Alessandro Pieri.

Foram preparadas soluções com concentração de 10 mg mL^{-1} em solução 1 : 1 de dimetilsulfóxido (DMSO) e água destilada estéril.

A atividade antimicrobiana foi testada contra patógenos bacterianos de importância médica e veterinária: sete espécies Gram-positivas: *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (ATCC 6051), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (ATCC 33591), *Streptococcus oralis* (*Streptococcus sanguis*) (ATCC 10557), *Streptococcus pyogenes* grupo A tipo 1 (ATCC

12344) e *Enterococcus faecalis* (*Streptococcus faecalis*) (ATCC 14506); e três espécies Gram-negativas: *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) (CDC EDL-933), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (ATCC 13076) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022).

Os testes, em duplicata, foram realizados por difusão em ágar pela técnica do orifício, com adaptações das técnicas descritas por Cursino e colaboradores (2011) e Pieri e colaboradores (2010). Foram utilizadas placas de Petri de 90 mm previamente preparadas com uma camada inferior de 10 mL de ágar bacteriológico e uma superior de 15 mL de ágar Müeler Hinton. Na camada superior foram feitos seis orifícios com o auxílio de ponteiras estéreis de 200 µL de forma equidistante para a posterior pipetagem de 40 µL das soluções das amostras, do controle positivo e do controle negativo.

As culturas bacterianas foram preparadas a partir de culturas novas (18 - 24 h), produzidas a partir de uma única colônia crescida em meio ágar BHI, e foram adequadas a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \cdot 10^8$ UFC mL⁻¹). Preparados os inóculos seguiu-se a semeadura nas placas preparadas com o auxílio de suabes estéreis, segundo preconiza o CLSI (2008), que foram imersos no inóculo e levemente pressionados na parede do tubo para retirada de excesso. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h em estufa bacteriológica.

Após o tempo de incubação verificou-se a presença de halos de inibição circulares. Quando identificada a formação de halo acrescentou-se a placa uma sobrecamada de 10mL de solução de trifeniltetrazólio a 0,1%, um indicador colorimétrico, que passa de transparente a vermelho quando há crescimento bacteriano, acrescido de Agar bacteriológico 1% para destacar o halo de inibição. Foi considerada inibição microbiana quando houve formação de halo de inibição.

4.9.2. Avaliação da atividade antiproliferativa

Os extratos brutos de esponjas foram submetidos a ensaios de toxicidade em células tumorais pelo teste do MTT, realizados em parceria com o Grupo de Farmacologia da Universidade Federal do Ceará sob a supervisão da Profa. Dra. Claudia do Ó Peso. As linhagens tumorais utilizadas, HL-60 (leucemia – humano), MDA-MB435 (melanoma - humano), HCT-8 (cólon - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano), foram cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640,

suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos, mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. As amostras foram dissolvidas e diluídas com DMSO estéril na concentração estoque de 10 mg/mL. Análise de citotoxicidade pelo método do MTT vem sendo utilizada no programa de *screening* do *National Cancer Institute* dos Estados Unidos, que testa mais de 10.000 amostras a cada ano (Skehan *et al.*, 1990).

As células foram plaqueadas na concentração de $0,1 \times 10^6$ cél mL⁻¹ para as linhagens MDA/MB-435 e SF-295, $0,7 \times 10^5$ cél mL⁻¹ para a linhagem HCT-8 e $0,3 \times 10^6$ cél mL⁻¹ para a linhagem HL-60. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante, removido. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (sal de tetrazolium), e as placas foram incubadas por 3 h. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado com 150 µL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

O cálculo da CI₅₀ (concentração capaz de inibir em 50% o crescimento celular) foi realizado a partir da regressão não-linear no programa *GraphPad Prism* (versão 4). Cada amostra foi analisada a partir de dois experimentos realizados em triplicata.

4.9.3. Avaliação da atividade anti-inflamatória

4.9.3.1. *Ensaios de edema da pata de rato induzida por carragenina e hiperalgesia.*

Os ensaios de edema da pata de rato induzida por carragenina e hiperalgesia foram realizadas na Universidade Federal do Rio de Janeiro sob a supervisão da Profa. Dra. Ana Luisa Palhares de Miranda e da Profa. Dra. Joselia Alencar Lima.

Foi realizado o ensaio de hipernocicepção térmica induzida pela administração subplantar de carragenina 1% em ratos. Os extratos foram administrados por via oral na dose de 100 mg Kg⁻¹ uma hora antes da administração subplantar do agente inflamatório carragenina 1% (0,1 mL por pata). Animais controles receberam volume igual do veículo. Foi medida a formação do edema analisando-se a variação do volume das patas que receberam carragenina e das patas contralaterais. Para a avaliação da hiperalgesia térmica os mesmos animais foram colocados sobre uma placa aquecida a 51°C e cronometrou-se o tempo que os

mesmos suportavam este estímulo térmico. O resultado da hiperalgesia térmica foi expresso como variação de latência em segundos, onde subtrai-se o valor em segundos da leitura basal obtida com a retirada da pata da placa aquecida antes e após a administração do estímulo inflamatório. Quanto maior essa variação, maior o grau de hiperalgesia apresentada pelo animal (Lima *et al.*, 2005).

4.9.4. Avaliação da atividade de inibição da enzima tirosinase

O ensaio foi realizado segundo a metodologia de Hearing Jr (1987). Inicialmente foram preparados os reagentes. Para o preparo da solução tampão fosfato pH 6,9 (10 mM) foram pesados 1,36 g de fosfato de potássio para 1000 mL água mili-Q, o pH foi ajustado para 6,9 adicionando-se HCl ou NaOH. Solução enzimática foi preparada pesando-se 0,002 g de enzima e dissolvendo-se em 20 mL do tampão, sendo necessário diluir 1:4 antes do uso. O reagente de coloração (L-Dopa 1 mmol/L) foi preparado pela adição de 0,0197 g do reagente Sigma D9628 (3,4-dihidroxi-L-fenilalanina) em 100 mL do tampão.

Para a realização do ensaio foi necessário preparar oito diluições dos extratos ou frações, começando com a concentração de 1 mg mL⁻¹. Então foram adicionados 25 µL do inibidor (extrato, diluente/controle ou padrão). Em seguida foi adicionado 75 µL da solução de enzima, e feita a leitura da absorbância em 475 nm da placa no leitor de Elisa para obtenção de valores A1. Incubou-se por 5 minutos a 37 °C e adiciona-se 100 µL do reagente de cor. Em seguida as amostras foram incubadas novamente por mais 15 minutos a 37 °C e efetuou-se novamente a leitura no leitor de Elisa para obtenção de valores A2. O cálculo da inibição foi obtido através da fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 \times \left(1 - \frac{A2_{amostra} - A1_{amostra}}{A2_{controle} - A1_{controle}} \right)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Coleta e identificação

As áreas alagáveis da Amazônia apresentam comunidades de esponjas abundantes e adaptadas ao ciclo de cheia e vazante das águas característico da região (Volkmer Ribeiro, 1981), sendo encontradas aderidas à vegetação de várzea e rochas presentes nestas áreas.

Durante o período de baixa das águas esses animais ficam expostos, facilitando sua localização e coleta. Foram realizadas diversas excursões a campo possibilitaram a coleta de esponjas em diferentes pontos de três estados: Amazonas, Pará e Mato Grosso (Figura 37).

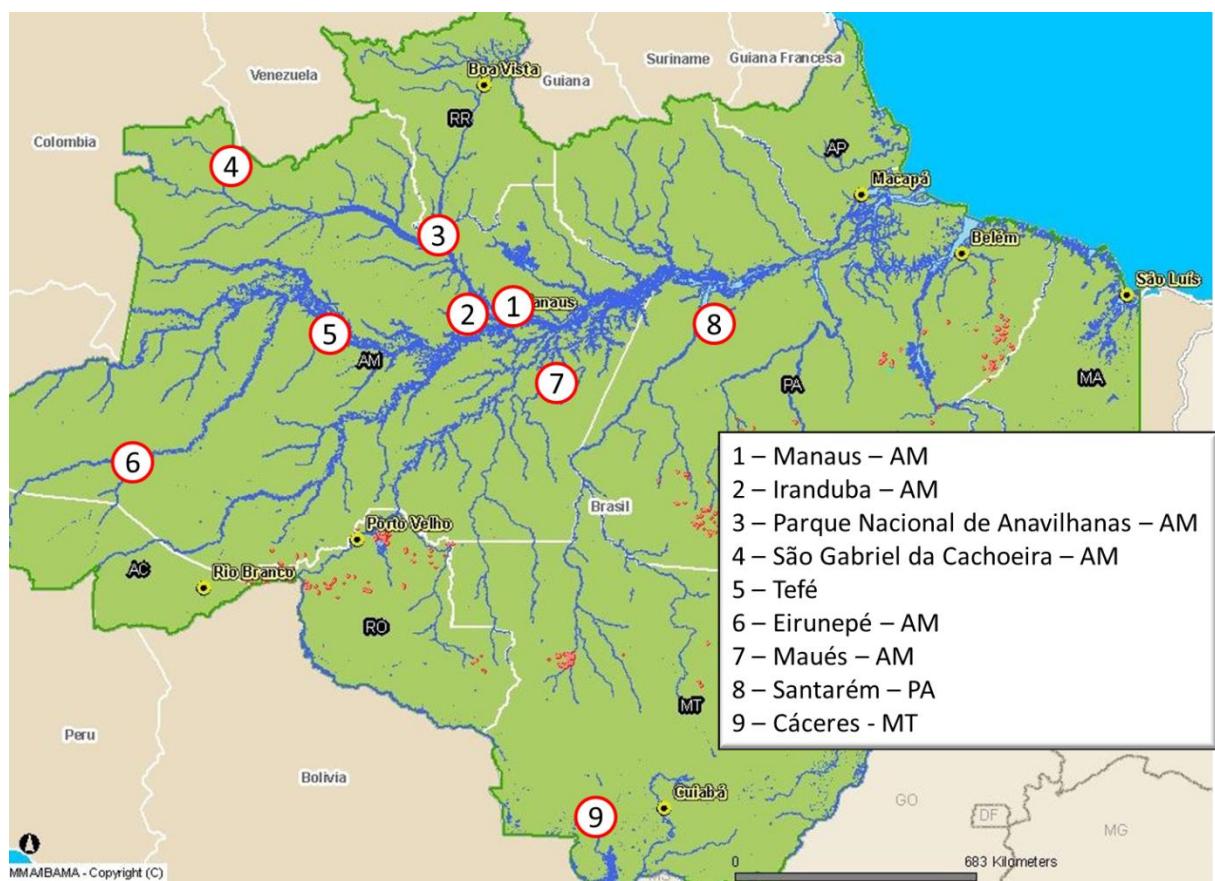


Figura 37: Locais onde foram realizadas coleta de esponjas.

Foram explorados rios com diferentes características (água preta, claras e brancas), buscando verificar a distribuição das espécies nos diferentes habitats.

A identificação do material ocorreu, em um primeiro momento com a presença da Dra. Cecília Volkmer-Ribeiro, especialista em taxonomia de esponjas de água doce, a qual orientou a preparação do material, e realizou a identificação *in loco* (Figura 38). Posteriormente, o material foi preparado segundo as orientações recebidas, tomando cuidado para garantir a presença de gêmulas, e enviado a mesma que realizou as identificações. Amostras *voucher* do material coletado foram depositados no Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (MCN-FZB) e no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).



Figura 38: Identificação taxonômica de esponjas realizada durante as coletas em Anavilhanas.

5.1.1. Estado do Amazonas

5.1.1.1. Rio Negro

O rio Negro foi alvo de numerosas excursões, tendo pontos de coleta no alto rio Negro em função de uma parceria estabelecida pelo grupo de pesquisa QBiomA. O arquipélago de

Anavilhanas foi alvo de extensa pesquisa da espongofauna em função de projeto aprovado especificamente para área. As proximidades de Manaus, baixo rio Negro em função da maior facilidade de acesso. Desta forma foi possível verificar a distribuição das espécies ao longo de seu curso.

Na praia do Cacau, localizada na margem direita do rio Negro, município de Manaus, Amazonas, $03^{\circ} 08' 47,01''$ S $60^{\circ} 07' 11,29''$ O, foram coletadas esponjas pertencentes à espécie *Metania reticulada* em 05 de setembro de 2007.

Em 22 de setembro de 2007 foram coletados espécimes de *Metania reticulata* no lago do Tupé, localizado em Manaus, Amazonas, $03^{\circ} 02' 59,66''$ S $60^{\circ} 15' 19,00''$ O.

As proximidades do lago Janauari, município de Iranduba, Amazonas, conhecido pela presença da Vitória-Régia sendo uma atração turística local, foram alvo de coleta em duas ocasiões, 05 de setembro de 2007, quando a coleta foi realizada nas coordenadas $03^{\circ} 13' 31,19''$ S $60^{\circ} 00' 09,89''$ O, e 17 de outubro de 2009, nesta ocasião a coleta se deu nas coordenadas $03^{\circ} 13' 29,32''$ S $60^{\circ} 00' 01,38''$ O. Em ambas as coletas foi observada grande quantidade de esponjas aderidas a árvores de pequeno porte na região entre o rio Negro e o lago, destacando a predominância da espécie *Drulia browni* (Metaniidae). Porém, alguns espécimes coletados apresentaram associação com as espécies *Metania reticulata* (Metaniidae), *Eunapius fragilis* (Spongillidae) e *Trochospongilla paulula* (Spongillidae) e *T. gregaria* (Spongillidae).

A espécie *Metania reticulata* (Metaniidae) foi encontrada na margem direita do rio Negro, aderida à vegetação arbustiva em local conhecido por “praia do Cachorro”, município de Iranduba, Amazonas, $03^{\circ} 09' 49,85''$ S e $60^{\circ} 01' 54,80''$ O, em 17 de outubro de 2009.

Nos pilares de sustentação da face norte do porto de Manaus, $03^{\circ} 08' 08,14''$ S $60^{\circ} 01' 48,02''$ O em 17 de outubro de 2009, foi possível observar uma espessa cobertura de esponjas (Figura 39) com predominância da espécie *Drulia uruguayensis* (Metaniidae). Outras espécies: *Trochospongilla paulula* (Spongillidae), *T. pensylvanica* (Spongillidae), *Spongilla* sp. (Spongillidae), *Corvospongilla seckti* (Spongillidae), *Acalle recurvata* (Metaniidae) e *Oncosclera intermedia* (Potamolepididae) ocorriam em associação à *D. uruguayensis*. Na região portuária foi possível observar impacto ambiental antrópico, com manchas de óleo na água e grande quantidade de lixo depositado na margem do rio sob o porto (Figura 40). No entanto foi observada grande diversidade na espongofauna.



Figura 39: Pilastras do porto de Manaus cobertas por esponjas dulcícidas.



Figura 40: Lixo acumulado nas margens do rio Negro, nas proximidades ao porto de Manaus.

As excursões no rio Negro, nas proximidades do município de Manaus podem ser observadas na Figura 41.



Figura 41: Locais de coleta no rio Negro, próximos ao município de Manaus, Amazonas (Fonte: Google Earth).

Em outubro de 2008 foi realizada uma coleta pontual no alto da bacia do rio Negro - igarapé Mapi, São Gabriel da Cachoeira –AM, $00^{\circ} 52' 26,00''$ N $66^{\circ} 51' 04,90''$ O - (Figura 42) permitindo a localização da espécie *Metania fittkaui*. As excursões ao rio Negro permitiram a coleta de diversas esponjas pertencentes a família Metaniidae (Quadro 1).



Figura 42: Igarapé Mapi, São Gabriel da Cachoeira, Amazonas (Fonte: Google Earth).

Quadro 1: Espécies de esponjas dulcícolas coletadas no rio Negro nas proximidades do município de Manaus.

Local de coleta	Data de coleta	Espécie	Número de Depósito (MCN-FZB)
Manaus – AM 03° 08' 47,01" S 60° 07' 11,29" O	05 de setembro de 2007	<i>M. reticulata</i>	8000
Iranduba – AM 03° 13' 31,19" S 60° 00' 09,89" O	05 de setembro de 2007	<i>D. browni</i>	7996
Manaus – AM 03° 02' 59,66" S 60° 15' 19,00" O	22 de setembro de 2007	<i>M. reticulata</i>	8001
Iranduba – AM 03° 13' 29,32" S 60° 00' 01,38" O	17 de outubro de 2009	<i>D. browni</i>	8366
		<i>D. browni</i> associada a <i>E. fragilis</i>	8368
		<i>D. browni</i> associada a <i>T. paulula</i>	8369
		<i>D. browni</i> associada a <i>E. fragilis</i> e <i>T. paulula</i>	8378
		<i>D. browni</i> associada a <i>M. reticulata</i>	8384
		<i>D. browni</i> associada a <i>T. gregaria</i>	8397
		<i>M. reticulata</i>	8409
Manaus – AM 03° 08' 08,14" S 60° 01' 48,02" O		<i>D. uruguayensis</i> associada a <i>T. paulula</i> , <i>T. pensylvanica</i> , <i>Spongilla</i> sp., <i>A. recurvata</i> , <i>O. intermédia</i> e <i>C. seckti</i>	8351 a 8365
São Gabriel da Cachoeira - AM 00° 52' 26,00" S 66° 51' 04,90" O	Outubro de 2008	<i>M. fittkaui</i>	8325 ^a

5.1.1.1.1. Anavilhanas

O Parque Nacional de Anavilhanas foi criado em 2008, em uma área que é refúgio de uma rica diversidade da fauna e flora. Segundo maior arquipélago fluvial do mundo, Anavilhanas é o resultado de uma alteração do curso do rio Negro, o maior rio de águas pretas do mundo, devido a um processo neo-tectônico. O complexo sistema composto por centenas de ilhas, lagos, canais, pântanos e bancos de areia parcialmente submersos ocupa uma área de 350.018 hectares, a aproximadamente 70 Km acima da confluência do rio Negro com o rio Solimões, onde se forma o rio Amazonas (Almeida-Filho e Miranda, 2007).

Foram coletadas esponjas no interior do arquipélago em duas excursões, a primeira realizada em março de 2010, na qual foram coletadas esponjas em 28 pontos; e a segunda em novembro de 2010, quando foram realizadas coletas em oito novos pontos. O total de 36 pontos de coleta tiveram a posição determinada por aparelho de GPS (Figura 43).

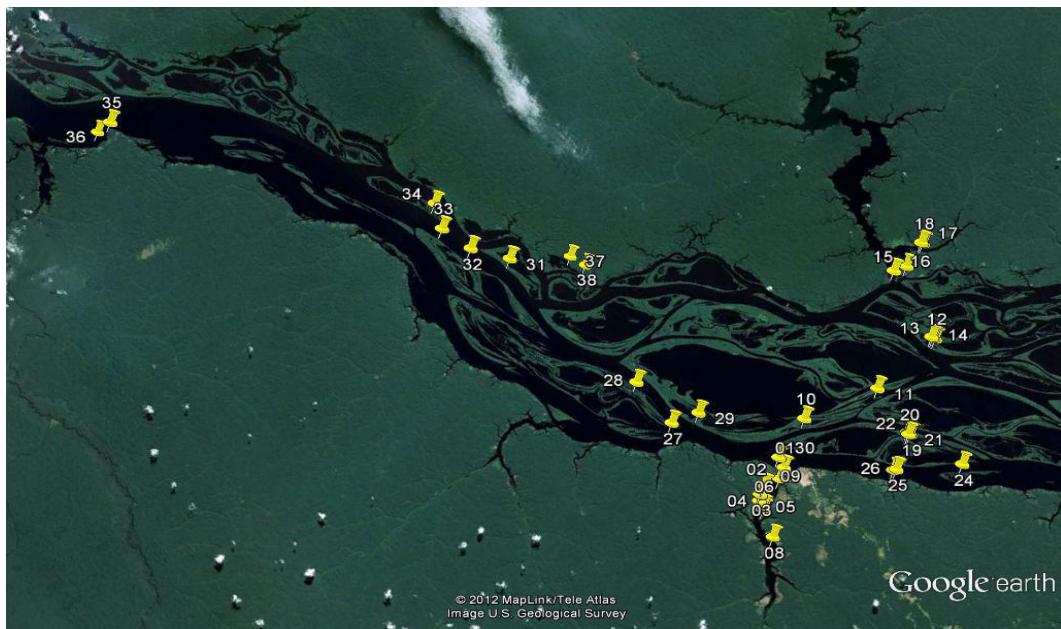


Figura 43: Locais de coleta no arquipélago de Anavilhanas (Fonte: Google Earth).

A identificação taxonômica do material coletado revelou a presença de nove espécies de três diferentes famílias. A família Spongillidae representada pelas espécies *Trochospongilla paulula*, *T. pennsylvanica* e *T. minuta*; família Potamolepidae com a espécie

Oncosclera novicella; e família Metaniidae, a qual se mostrou mais abundante, com as espécies *Metania reticulata*, *M. fittkaui*, *Drulia browni*, *D. uruguayensis* e *Acalle recurvata* (Quadro 2).

Quadro 2: Relação de material coletado no arquipélago de Anavilhasas.

	Coordenada de coleta	Data de coleta	Espécie	Número de Deposito (MCN-FZB)
01	02°37'08,76"S 60°57'28,26"O	07 de março de 2010	<i>M. reticulata</i>	8504
02	02°37'28,08"S 60°57'56,40"O		<i>M. reticulata</i>	8505
03	02°37'35,58"S 60°59'17,40"O		<i>M. reticulata</i>	8506
04	02°37'37,14"S 60° 59'03,00"O		<i>M. reticulata</i>	8507
05	02° 37'37,50"S 60° 59'14,52"O		<i>M. reticulata</i>	8508
06	02°38'06,90"S 60°59'17,04"O		<i>O. navicella</i>	8509
07	02° 38'15,42"S 60° 59'21,60"O		<i>D. uruguayensis</i> associada a <i>T. pensylvanica</i> e <i>M. reticulata</i>	8455
08	02°39'33,36" S 60°59'47,40"O		<i>T. paulula</i>	8456
09	02° 37'21,42" S 60°58'38,88" O		<i>M. fittkaui</i>	8457
			<i>D. uruguayensis</i>	8517
			<i>M. fittkaui</i> associada a <i>M. reticulata</i>	8459
			<i>D. uruguayensis</i>	8460
			<i>M. reticulata</i>	8461
			<i>M. fittkaui</i>	8510
			<i>M. fittkaui</i> associada a <i>M. reticulata</i>	8516

Quadro 2 (Continuação): Relação de material coletado no arquipélago de Anavilhanas.

	Coordenada de coleta	Data de coleta	Espécie	Número de Depósito (MCN-FZB)
10	02°35'46,98"S 60°55'24,18"O	07 de março de 2010	<i>M. reticulata</i>	8511
11	02°36'25,50"S 60°52'0,296'O		<i>M. reticulata</i>	8462
12	02°35'56,40"S 60°48'43,38"O		<i>D. uruguayensis</i> associada a <i>T. pensylvanica</i> e <i>T. minuta</i>	8463 e 8512
13	02°35'50,64"S 60°48'45,78"O		<i>D. uruguayensis</i>	8464
14	02° 35'46,98"S 60° 48'47,28"O		<i>D. uruguayensis</i> associada a <i>T. pensylvanica</i> , <i>A. recurvata</i> , <i>M. fittkauai</i> e <i>O. novicella</i>	8466, 8499 e 8500
15	02°32'26,70"S 60°47'39,66"O	08 de março de 2010	<i>M. fittkauai</i>	8467
			<i>M. reticulata</i>	8468
16	02°32'18,42"S 60°48'12,78"O		<i>M. recurvata</i> associada a <i>D. uruguayensis</i> e <i>M. fittkauai</i>	8469 e 8501
			<i>M. reticulata</i>	8470
			<i>D. uruguayensis</i> associada a <i>M. fittkauai</i> , <i>T. pensylvanica</i> e <i>O. novicella</i>	8471 e 8502
17	02° 35'46,98"S 60°55'24,18"O		<i>T. pensylvanica</i>	8472
			<i>D. browni</i>	8474
			<i>M. reticulata</i> associada a <i>T. pensylvanica</i>	8475

Quadro 2 (Continuação): Relação de material coletado no arquipélago de Anavilhas.

	Coordenada de coleta	Data de coleta	Espécie	Número de Deposito (MCN-FZB)
18	02°31'58,08"S 60°46'27,90O	08 de março de 2010	<i>M. reticulata</i>	8476
19	02°39"00,06"S 60°52'15,00"O	09 de março de 2010	<i>M. reticulata</i>	8477
20	02°38'57,78"S 60°52'18,42"O		<i>D. uruguayensis</i> associada a <i>T. pensylvanica</i> e <i>O. navicella</i>	8473
21	02°38'56,40"S 60°52'18,66"O		<i>M. reticulata</i>	8513
22	02°38'54,72"S 60°52'16,14"O		<i>M. reticulata</i>	8514
23	02°38'51,42"S 60°52'16,80"O		<i>M. reticulata</i> associada a <i>O. navicella</i>	8515
24	02°41'26,82"S 60°51'18,84"O	10 de março de 2010	<i>M. reticulata</i>	8478
25	02°40'00,36"S 60°53'41,94"O		<i>M. fittkaui</i>	8479
26	02°39'57,78"S 60°53'49,80"O		<i>M. reticulata</i>	8480
27	02°32'39,78"S 61°00'01,26"O	11 de março de 2010	<i>D. uruguayensis</i> associado a <i>T. pensylvanica</i> e <i>O. navicella</i>	8481
28	02° 30'13,56"S 61° 00'04,14"O		<i>M. reticulata</i>	8482
29	02°32'56,34"S 60°58'49,50"O		<i>M. reticulata</i>	8483
30	02°36'37,98"S 60°57'21,84"O		<i>M. fittkaui</i>	8484
31	02°22'14,34"S 61°00'53,88"O	05 de novembro de 2010	<i>D. uruguaensis</i>	8485
			<i>D. uruguayensis</i> associada a <i>O. navicella</i>	8486

Quadro 2 (Continuação): Relação de material coletado no arquipélago de Anavilhanas.

	Coordenada de coleta	Data de coleta	Espécie	Número de Deposito (MCN-FZB)
32	02°20'59,46"S 61°01'56,10"O	05 de novembro de 2010	<i>D. uruguayensis</i> associada a <i>O. navicella</i> , <i>O. spiünifera</i> e <i>M. reticulata</i>	8694
			<i>M. reticulata</i>	8695
			<i>D. uruguayensis</i>	8696
33	02°19'31,26"S 61°02'21,12"O		<i>M. reticulata</i>	8697
34	02°18'22,26"S 61°01'53,60"O		<i>M. fittkaui</i>	8698
35	02°07'13,02"S 61°10'37,74"O		<i>M. reticulata</i>	8687
36	02°07'15,12"S 61°11'17,82"O		<i>D. uruguayensis</i>	8686
37	02°23'43,80"S 60°58'44,94"O	06 de novembro de 2010	<i>D. uruguayensis</i>	8685
37	02°23'43,80"S 60°58'44,94"O		<i>M. reticulata</i> associada a <i>O. navicella</i> e <i>A. recurvata</i>	8690
			<i>M. reticulata</i>	8689
38	02°24'26,16"S 60°58'28,80"O		<i>D. uruguayensis</i>	8684

Em determinadas áreas foi possível observar grande quantidade de esponjas aderidas à vegetação arbórea/arbustiva localizada em região de floresta inundada, e nestes ambientes foi observada quase que exclusivamente a espécie *Metania reticulata*, formando o que poderia ser chamado de “cauxizal” (Figura 44). Em pontos mais baixos, no leito do rio e lagos, apenas acessíveis nos períodos de vazante, foi possível observar vastos “tapetes” de esponjas aderidas a pequenas pedras ou gramíneas, com enorme predominância da espécie *Drulia uruguayensis* (Figura 45). Com uma frequência menor também foi possível observar esponjas com aspecto

globular aderidas a galhos das copas das árvores sujeitas a inundação, identificadas como *Drulia browni*.



Figura 44: *Metania reticulata* fixada a vegetação sujeita a flutuação sazonal das águas do rio Negro.



Figura 45: “Tapetes” de *Drulia uruguayensis* encontrados em Anavilhanas.

As demais espécies observadas foram coletadas aderidas a raízes aéreas, com espécimes de tamanho diminuto e extremamente delicados, ou no interior de esponjas maiores de outras espécies.

Foram encontradas nove diferentes espécies das três famílias descritas para a região neotropical, Spongillidae, Potamolepidae e Metaniidae (Quadro 3). É marcante a maior abundância da espécie *Metania reticulata* aderida à vegetação nas regiões sujeitas às inundações mais elevadas. Em função da flutuação do nível das águas, foi possível acessar trechos do leito do rio onde foi encontrada grande abundância da espécie *Drulia uruguayensis*. Essa composição é semelhante à relatada para o lago Tupé localizado na margem esquerda do rio Negro a aproximadamente 30 Km a noroeste de Manaus (Volkmer-Ribeiro e Almeida, 2005).

Quadro 3: Espécies encontradas no arquipélago de Anavilhanas

Família	Espécies
Spongillidae	<i>Trochospongilla paulula</i> <i>T. pennsylvanica</i> <i>T. minuta</i>
Potamolepidae	<i>Oncosclera navicella</i>
Metaniidae	<i>Metania reticulata</i> <i>M. fittkaui</i> <i>Drulia browni</i> <i>D. uruguayensis</i> <i>Acalle recurvata</i>

A predominância de espécies da família Metaniidae observada no arquipélago de Anavilhanas também foi observada encontrada nos demais pontos de coleta situados na bacia do rio Negro.

5.1.1.2. *Demais locais de coleta no Estado do Amazonas*

Algumas excursões ao interior do estado permitiram coletas pontuais no rio Maués-Açu (água pretas), lago Tefé (água pretas) e no rio Juruá (água brancas).

Em dois de novembro de 2009, foram coletadas esponjas na ilha de Vera Cruz, rio Maués-Açu, município de Maués, Amazonas ($03^{\circ} 25' 11,13''$ S $57^{\circ} 44' 47,00''$ O, Figura 46), as quais foram identificadas como *Metania reticulata* e *Drulia uruguayensis*, sendo que a *D. uruguayensis* também foi encontrada associada a *Trochospongilla paulula*, *T. pensylvanica* e *Oncosclera navicella*. As águas do rio Maués-Açu são classificadas como pretas, da mesma forma que as do rio Negro, desta forma a observação do mesmo padrão de distribuição encontrado no arquipélago de Anavilhanas com predominância dos gêneros *Drulia* e *Metania* da família Metaniidae é condizente com as observações anteriores.



Figura 46: Local de coleta na Ilha de Vera Cruz, município de Maués, Amazonas.

Esponjas da espécie *Drulia browni* foram coletadas no dia 27 de novembro de 2011 aderidas à vegetação arbustiva no lago Tefé, na margem oposta a o município de Tefé ($03^{\circ} 17' 25,31''$ S $64^{\circ} 44' 49,24''$ O). Mais uma vez foi observada a predominância da família Metaniidae nos ambientes de águas pretas.

Excursão ao município de Eirunepé, Amazonas, em julho de 2011, possibilitou a coleta de esponjas da espécie *Trochospongilla paulula* no igarapé do Taruacá Velho, margem direita do rio Juruá ($06^{\circ} 43' 07,78''$ S $69^{\circ} 58' 28,57''$ O), e no igarapé do Soldado, também situado na margem esquerda do rio Juruá ($06^{\circ} 42' 55,49''$ S $69^{\circ} 48' 54,12''$ O) onde foram encontradas esponjas da espécie *T. paulula* associada a outras espécies deste gênero, além de

esponjas da espécie *Metania reticulata*. Nos ambientes de águas pretas os espécimes do gênero *Trochospongilla* coletados se resumiam a espécimes delicados ou em associação a esponjas da família Metaniidae.

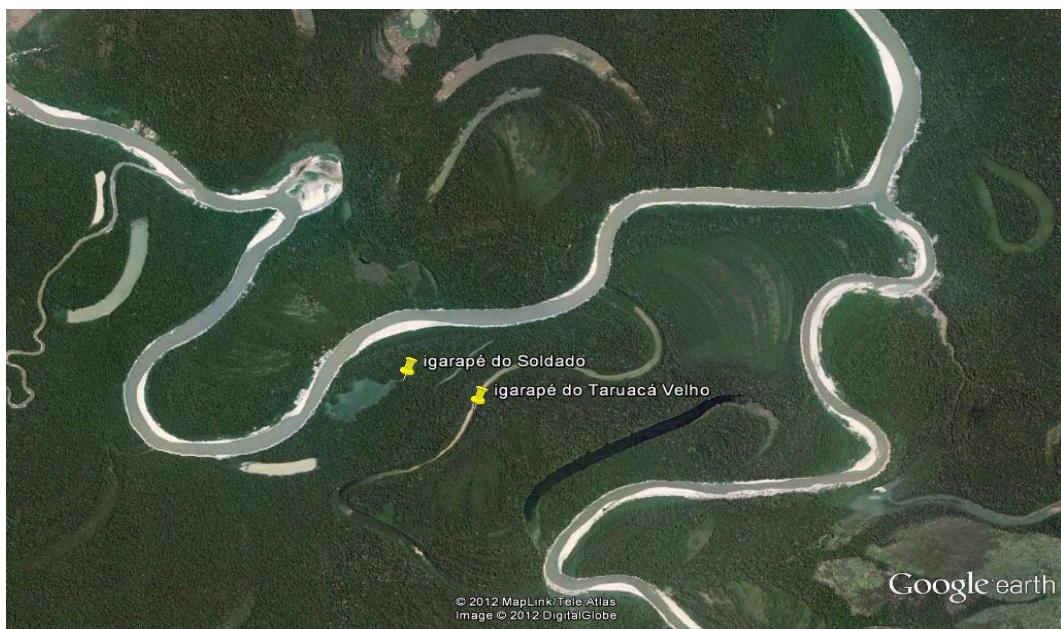


Figura 47: Locais de coleta no município de Eirunepé, Amazonas (Fonte: Google Earth).

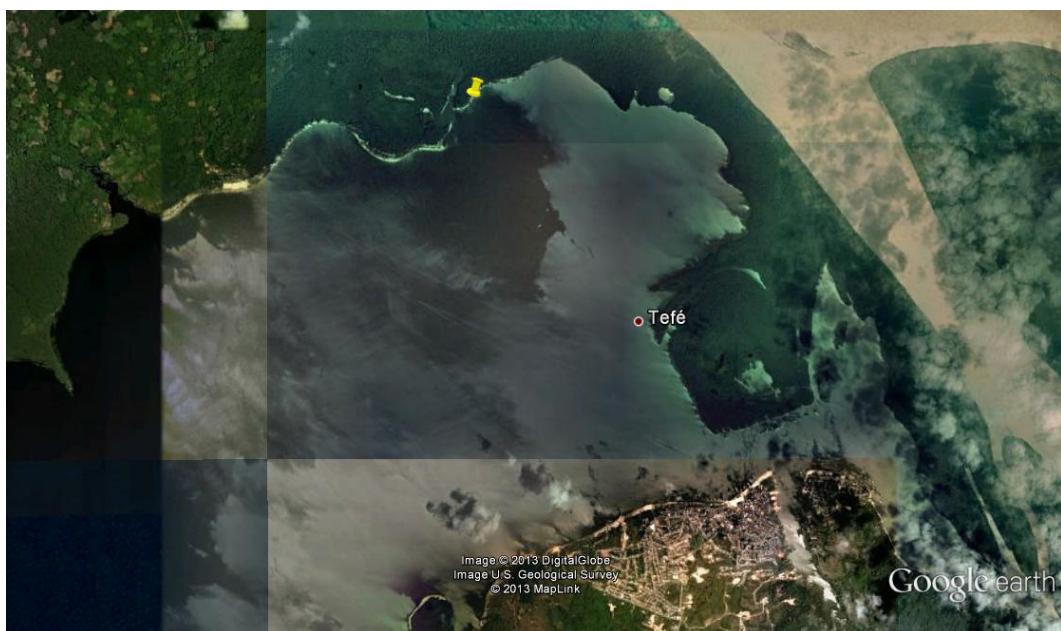


Figura 48: Local de coleta no município de Tefé, Amazonas (Fonte: Google Earth).

O Quadro 4 apresenta, de forma concisa, as espécies coletadas no estado do Amazonas excetuando o rio Negro.

Quadro 4: Esponjas coletadas no estado do Amazonas excetuando o rio Negro.

Local de coleta	Data de coleta	Espécie	Número de Depósito
Maués – AM 03° 25' 11,13" S 57° 44' 47,00" O	23 de novembro de 2011	<i>D. uruguayensis</i>	8422 ^a
		<i>M. reticulata</i>	8423 ^a
		<i>D. uruguayensis</i> associada a <i>T. pensylvanica</i> e <i>T. paulula</i>	8429 ^a
		<i>D. uruguayensis</i> associada a <i>O. navicella</i> e <i>T. paulula</i>	8438 ^b
Eirunepé – AM 06° 43' 07,78" S 69° 58' 28,57" O	10 de julho de 2011	<i>T. paulula</i>	0079 ^b
Eirunepé – AM 06° 42' 55,49" S 69° 48' 54,12" O		<i>T. paulula</i> associada a <i>Trochospongilla</i> sp.	0080 ^b
<i>M. reticulata</i>		0081 ^b	
Tefé – AM 03° 17' 25,31" S 64° 44' 49,24" O	27 de novembro de 2011	<i>D. browni</i>	0082 ^b

a – MCN-FZB

b – INPA

5.1.2. Estado do Pará

O rio Tapajós (água clara), nas proximidades da cidade de Santarém, foi alvo de ampla coleta de esponjas com financiamento específico.

Em setembro de 2007 foi realizada excursão ao município de Belterra, Pará, onde foram coletadas esponjas da espécie *Drulia cristata* na praia no rio Tapajós, ao sul da vila Aramanaí (02° 43' 03,55" S 55° 00' 07,00" O), *D. uruguayensis* em barrancos ao norte da vila do Aramanaí (02° 42' 17,87" S 55° 00' 00,00" O), sendo que as duas espécies também foram encontradas na antiga boca do Igarapé do Encanto (02° 43' 07,31" S 55° 00' 09,27" O). A

espécie *Metania fittkaui* foi coletada no igarapé do Encanto, próximo à saída sul para o rio Tapajós ($02^{\circ} 43' 01,19''$ S $55^{\circ} 00' 04,62''$ O).

No mesmo mês, a praia da Salvação, em Santarém ($02^{\circ} 25' 51,06''$ S $54^{\circ} 46' 15,14''$ O) foi alvo de uma excursão, na qual as espécies *D. uruguayensis* e *M. fittkaui* foram encontradas.

Em janeiro de 2008, a espécie *Drulia cristata* foi encontrada em associação com as espécies *Drulia uruguayensis*, *Spongilla spoliata*, *Trochospongilla paulula*, *Oncosclera spinifera* e *Corvospongilla seckti* na praia da Salvação, onde também foi encontrada a espécie *Spongilla spoliata*.

Em setembro de 2009, uma nova expedição ao rio Tapajós permitiu a coleta de esponjas da espécie *Drulia uruguayensis* na entrada do igarapé do Encanto ($02^{\circ} 43' 07,31''$ S $55^{\circ} 00' 09,27''$ O), município de Belterra, Pará. A mesma espécie também foi encontrada na praia da Salvação, município de Santarém, Pará.

Em 21 de outubro de 2011 foram coletadas esponjas da espécie *Drulia cristata* aderidas á vegetação arbustiva e grandes rochas na praia do Maracanã, localizada no município de Santarém ($02^{\circ} 25' 35,70''$ S $54^{\circ} 45' 25,80''$ O).

Em 22 de outubro de 2011, na praia da Salvação, município de Santarém, às margens do rio Tapajós foi localizado um ponto ($02^{\circ} 25' 50,64''$ S $54^{\circ} 46' 14,34''$ O) onde encontravam-se numerosas esponjas de aspecto globular, que foram identificadas como *Drulia cristata*, aderidas a pequenas rochas no chão. A noroeste na mesma praia ($02^{\circ} 25' 23,34''$ S $54^{\circ} 46' 34,62''$ O) foram encontradas esponjas muito próximas à linha da água as quais foram identificadas como pertencentes as espécies *Drulia cristata*, *Oncosclera navicella* e *Trochospongilla paulula*. Ainda na mesma praia, em um canal que liga um lago ao rio Tapajós ($02^{\circ} 25' 43,98''$ S $54^{\circ} 46' 24,48''$ O) foi coletato um pequeno fragmento de esponja que flutuava na água, esta esponja foi identificada como *Drulia uruguayensis*.

Também foram coletadas esponjas em uma praia de areia branca no município de Alter do Chão ($02^{\circ} 30' 12,90''$ S $54^{\circ} 57' 31,56''$ O) no dia 23 de outubro de 2011, as quais foram identificadas como *Trochospongilla paulula*. Na mesma praia, aderida a vegetação a aproximadamente 1,5 m do nível da água foram encontradas esponjas da espécie *Drulia cristata*.

A identificação do material coletado nos diferentes pontos do rio Tapajós (Figura 49) encontra-se sumarizada no Quadro 5.

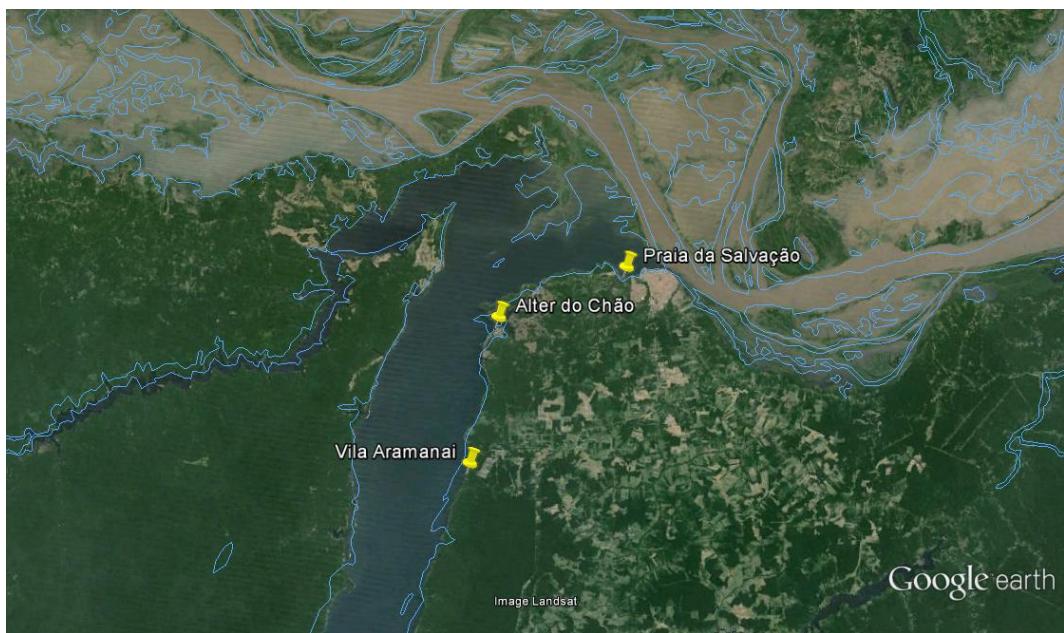


Figura 49: Locais de coleta no estado do Pará (Fonte: Google Earth).

Quadro 5: Identificação do material coletado no Pará.

Local de coleta	Data de coleta	Espécie	Número de Deposito
Vila do Aramanaí – PA 02° 43' 03,55" S 55° 00' 07,00" O	17 de setembro de 2007	<i>D. cristata</i>	8003 ^a
02° 42' 17,87" S 55° 00' 00,00" O		<i>D. uruguayensis</i>	8004 ^a
02° 43' 01,19" S 55° 00' 04,62" O	18 de setembro de 2007	<i>M. fittkaui</i>	8005 ^a
02° 43' 07,31" S 55° 00' 09,27" O		<i>D. cristata</i>	8006 ^a
Santarém – PA 02° 25' 51,06" S 54° 46' 15,14" O	20 de setembro de 2007	<i>D. uruguayensis</i>	8008 ^a
		<i>M. fittkaui</i>	8009 ^a
Santarém – PA 02° 25' 51,06" S 54° 46' 15,14" O	10 de janeiro de 2008	<i>D. cristata</i>	8010 ^a
		<i>D. cristata</i> associada a <i>S. spoliata</i> , <i>C. seckti</i> , <i>T. paulula</i> e <i>O. spinifera</i>	8327 ^a
		<i>S. spoliata</i>	8031 ^a
Santarém – PA 02° 25' 35,70" S 54° 45' 25,80" O	21 de outubro de 2011	<i>D. cristata</i>	0071 ^b
Santarém-PA 02° 25' 50,64" S 54° 46' 14,34" O	22 de outubro de 2011	<i>D. cristata</i>	0072 ^b
		<i>O. navicella</i>	0074 ^b
		<i>T. paulula</i>	0075 ^b
		<i>D. cristata</i>	0073 ^b
		<i>D. uruguayensis</i>	0076 ^b
Alter do Chão – PA 02° 30' 12,90" S 54° 57' 31,36" O	23 de outubro de 2011	<i>D. cristata</i>	0077 ^b
		<i>T. paulula</i>	0078 ^b

^a – MCN_FZB^b – INPA

No do rio Tapajós foram encontradas esponjas das três famílias descritas para a região neotropical: Spongillidae, Potamolepidae e Metaniidae (Quadro 6).

Quadro 6: Espécies coletadas no rio Tapajós.

Família	Espécies
Spongillidae	<i>Corvospongilla seckti</i> <i>Spongilla spoliata</i> <i>Trochospongilla paulula</i>
Potamolepidae	<i>Oncosclera navicella</i> <i>O. spinifera</i>
Metaniidae	<i>Drulia cristata</i> <i>D. uruguayensis</i> <i>Metania fittkaui</i>

Nas águas claras do rio Tapajós foram encontradas espécimes de tamanho significativo de esponjas do gênero *Trochospongilla* (Spongillidae) (Figura 50), assim como havia ocorrido nas águas brancas do rio Juruá.



Figura 50: *Trochospongilla paulula* coletada as margens do rio Tapajós

Esponjas do gênero *Oncosclera* (Potamolepidae), com tamanho significativo (Figura 51), foram encontradas apenas no rio Tapajós.



Figura 51: *Oncosclera navicella* coletada as margens do rio Tapajós.

5.1.3. Estado do Mato Grosso

Uma parceria do grupo QBiomA permitiu a coleta de esponjas em dois rios de águas brancas no estado do Mato Grosso, rios Paraguai e Bento Gonçalves (Figura 52).

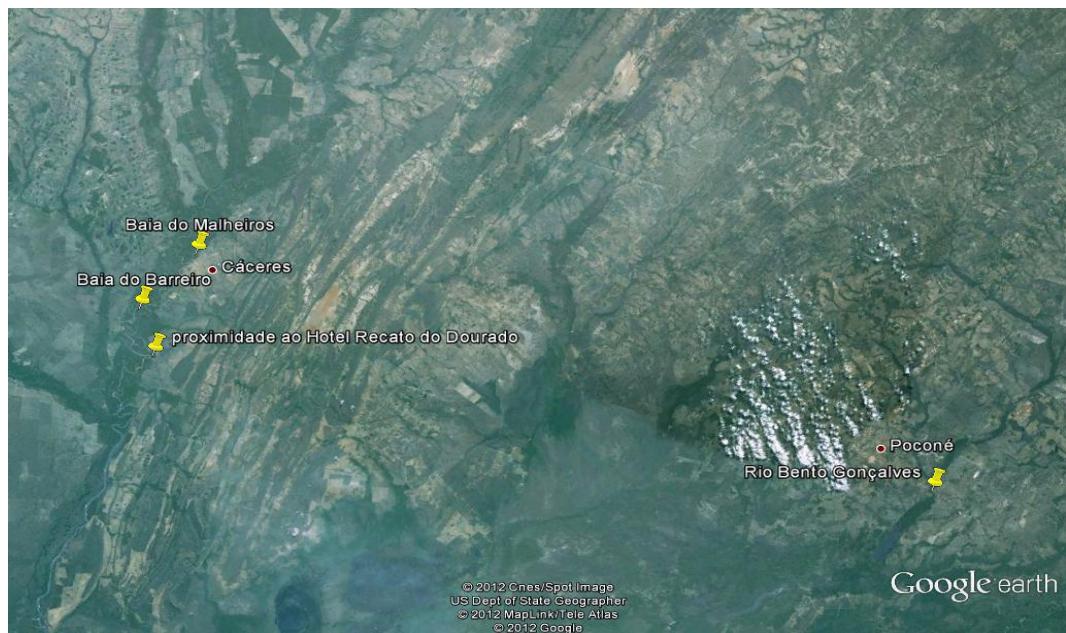


Figura 52: Locais de coleta no estado do Mato Grosso.

Em 12 de setembro de 2009, a espécie *Drulia browni* foi coletada na baia do Malheiros ($16^{\circ} 03' 08,53''$ S $57^{\circ} 41' 19,62''$ O), margem esquerda do rio Paraguai, município de Cáceres, Mato Grosso. A mesma espécie foi encontrada também na baia do Barreiro ($16^{\circ} 09' 02,96''$ S $57^{\circ} 45' 46,62''$ O) e nas proximidades do Hotel Recanto do Dourado ($16^{\circ} 13' 33,03''$ S $57^{\circ} 44' 04,03''$ O), rio Paraguai, Cáceres, em coleta realizada em 12 de novembro de 2009.

No município de Poconé, Mato Grosso, no rio Bento Gomes ($16^{\circ} 19' 09,04''$ S $56^{\circ} 32' 23,26''$ O), a mesma espécie foi coletada em primeiro de novembro de 2009.

A identificação do material coletado em quatro diferentes pontos no estado do Mato Grosso é apresentada de forma condensada no Quadro 7.

Quadro 7: Identificação do material coletado no Mato Grosso.

Coordenada de coleta	Data de coleta	Espécie	Número de Depósito (MCN-FZB)
Cáceres – MT $16^{\circ} 03' 08,53''$ S $57^{\circ} 41' 19,62''$ O	12 de setembro de 2009	<i>D. browni</i>	8413
		<i>D. browni</i> associada a <i>T. paulula</i> e <i>A. recurvata</i>	8412
Poconé – MT $16^{\circ} 19' 09,04''$ S $56^{\circ} 32' 23,26''$ O	01 de novembro de 2009	<i>D. browni</i>	8420
Cáceres – MT $09^{\circ} 09' 02,96''$ S $57^{\circ} 45' 46,62''$ O	12 de novembro de 2009	<i>D. browni</i>	8418
		<i>D. browni</i> associada a <i>T. paulula</i>	8421

Os espécimes do gênero *Trochospongilla* encontrados nos rios Paraguai e Bento Gonçalves foram de tamanho reduzido, sempre associados a esponjas da espécie *Drulia*

browni, não sendo observado espécimes maiores como ocorrido para o rio Juruá (Amazonas), também de águas brancas.

Após as sucessivas coletas foi possível observar a grande variedade de substratos aos quais as esponjas podem ser encontradas (Figura 53), mostrando a grande adaptabilidade destes animais. Além de uma preferência por ambientes sombreados, como já havia sido relatado anteriormente para esponjas dulcícolas (Jewell, 1935; Frost, Reiswig e Ricciardi, 2001) e mesmo marinhas (Maldonado e Uriz, 1998).



Figura 53: Diferentes substratos nos quais foram encontradas esponjas.

Ficou evidente a grande abundância de esponjas na região amazônica, com a predominância de espécies pertencentes à família Metaniidae, as quais podem atingir grandes

dimensões, podendo ser facilmente acessadas durante a baixa dos rios. Seus estudos se restringem a trabalhos taxonômicos e ecológicos, e, mesmo no mundo, estudos químicos com esponjas dulcícolas não são numerosos, sendo este um viés a ser explorado.

5.2. Composição Inorgânica

As esponjas são conhecidas por acumular metais do ambiente, inclusive com alguns estudos avaliando a possibilidade de usar esses animais como biomonitoras (Patel, Balani e Patel, 1985; Hansen, Weeks e Depledge, 1995; Philp, 1999). Essa absorção pode ocorrer tanto diretamente dos metais dissolvidos na água que circula através das esponjas, quanto das partículas suspensas coletadas e ingeridas como alimento por estes animais (Cebrian *et al.*, 2003; Perez *et al.*, 2005).

Para invertebrados aquáticos é documentado o acúmulo tanto de metais essenciais quanto não essenciais, portanto ocorre uma grande variação em suas concentrações (Rainbow, 2002; Wang e Rainbow, 2008). Em um mesmo ambiente, invertebrados podem apresentar diferentes concentrações de elementos traço inclusive entre espécies do mesmo gênero (Moore e Rainbow, 1987; Hare, 1992).

A incorporação de materiais pelas esponjas apresenta mecanismos de seleção através da composição mineral e tamanho das partículas. Esses mecanismos apresentam relação com o substrato ao qual a esponja está aderida (Bavestrello *et al.*, 1998; Cerrano *et al.*, 2007).

Foram analisadas amostras pertencentes a sete espécies englobando as três famílias registradas para a região neotropical, Família Metaniidae: *Metania reticulata*, *M. fittkaui*, *Drulia cristata*, *D. uruguayensis* e *D. browni*; Família Spongillidae: *Trochospongilla paulula*; e Família Potamolepidae: *Oncosclera navicella*.

Em todas as amostras aqui estudadas, o silício foi observado, fato que já era esperado, pois todas as esponjas dulcícolas pertencem à classe Demospongiae, e uma de suas características são as espículas de sílica (Sandford, 2003; Uriz *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2007; Schröder *et al.*, 2008).

Outro elemento que foi comum a todas as amostras analisadas, independente de espécie ou local de coleta, foi o ferro, que é frequentemente relatado nas águas da bacia amazônica (Küchler, Miekeley e Forsberg, 2000; Seyler e Boaventura, 2003) e em esponjas

marinhas da classe Demospongiae (Sandford, 2003; Uriz *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2007; Schröder *et al.*, 2008). Em esponjas da família Lubormiiskidae, endêmicas do lago Baikal esse elemento também se faz presente (Kulikova *et al.*, 2013).

Outros dois elementos comuns a esponjas marinhas da classe Demospongiae (Sandford, 2003; Uriz *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2007; Schröder *et al.*, 2008), o cloro e enxofre, foram detectados em ao menos uma das amostras de cada uma das espécies estudadas, *Metania reticulata*, *M. fittkaui*, *D. cristata*, *D. uruguayensis*, *D. brownii*, *Trochospongilla paulula* e *Oncosclera navicela*. Para as esponjas dulcícolas da família Lubormiiskidae o enxofre também é relatado (Kulikova *et al.*, 2013). No entanto o cloro, embora descrito para as águas do lago Baikal (Falkner *et al.*, 1991; Falkner *et al.*, 1997), não é observado em suas esponjas (Paradina *et al.*, 2003; Paradina *et al.*, 2004; Kulikova *et al.*, 2013).

O alumínio também mostrou um comportamento peculiar, pois não foi detectado em nenhuma das amostras de esponjas pertencentes ao gênero *Metania*, enquanto que para os demais gêneros analisados: *Drulia*, *Trochospongilla* e *Oncosclera*, esse elemento foi detectado em todas as amostras analisadas. Sendo relatado também para as espécies da família Lubormiskidae (Paradina *et al.*, 2003; Paradina *et al.*, 2004; Kulikova *et al.*, 2013).

Essa característica é observada inclusive em amostras coletadas em um mesmo ambiente, como nas amostras provenientes do arquipélago de Anavilhanas, rio Negro, onde foram coletadas esponjas das espécies *Metania reticulata* e *Drulia uruguayensis*. Amostras coletadas no rio Juruá em Eirunepé – AM de *M. reticulata* e *Trochospongilla paulula* e para as amostras provenientes do rio Tapajós coletadas em Belterra – PA de *M. fittkaui* e *D. uruguayensis* também mostram esse comportamento. Considerando que nestes exemplos as esponjas estavam expostas ao mesmo ambiente, a ausência do alumínio nas amostras do gênero *Metania* indica a presença de um mecanismo específico, como os propostos por Rainbow (2002), que não permite o acúmulo do alumínio.

O cálcio é observado em todas as amostras com exceção da espécie *Metania fittkaui*. Na bacia do rio Negro foram coletadas em São Gabriel da Cachoeira e Anavilhanas amostras de *M. reticulata* quanto *M. fittkaui*, e o Ca aparece apenas na primeira espécie. Amostras de *M. fittkaui* advindas do Tapajós (Belterra-PA), rio no qual o cálcio é relatado (Seyler e Boaventura, 2003) também não apresentam este elemento, embora detectado nas amostras de *D. uruguayensis* coletadas no mesmo ambiente. Mostrando, como já descrito (Moore e Rainbow, 1987; Hare, 1992), que há diferenças dentro de espécies de um mesmo gênero.

Esse comportamento observado para o cálcio se repete para o potássio e titânio, não sendo detectado nas amostras de *M. fittkaui* e presente nas demais espécies estudadas.

O vanádio apresenta também um comportamento análogo, não sendo detectado para a espécie *Oncosclera navicella*, coletada no rio Tapajós, Santarém-PA. No mesmo rio foram coletadas amostras das espécies *Trochospongilla paulula*, *Metania fittkaui*, *Drulia cristata* e *D. uruguayensis* nas quais o vanádio foi observado.

Estes comportamentos observados para cálcio, potássio, titânio e vanádio possibilita inferir a presença de um mecanismo específico determinando que os mesmos não sejam acumulados por determinadas espécies, a ausência destes podendo representar uma informação quimitaxonomica.

O zinco e o estrôncio foram detectados em ao menos uma das amostras de cada uma das espécies do gênero *Drulia*, e ausentes nos demais gêneros analisados.

O cobre só não foi detectado nas espécies *Metania reticulata*, *Trochospongilla paulula* e *Oncosclera navicella*, sendo detectado em ao menos uma das amostras de *Drulia cristata*, *D. browni* e *D. uruguayensis*.

A Tabela 1 sumariza a concentração dos diferentes elementos nas esponjas dulcícolas analisadas. A concentração de alguns elementos não foi possível determinar por estarem fora das faixas de concentração das curvas de calibração.

Tabela 1: Composição elementar das esponjas de água doce (n – número de amostras).

n	Elemento (% m/m)													
	Al	Si	Ca	S	Cl	K	Ti	V	Mn	Fe	Cu	Zn	Sr	
FAMILIA METANIIDAE														
<i>Metania reticulata</i>														
Manaus-AM ^a	1	0,00	35,09	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,17	0,00	0,44	0,00	0,00	0,00
Cacau Pirera-AM ^a	1	0,00	43,57	0,00	0,22	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00	0,45	0,00	0,00	0,00
Maués-AM ^a	1	0,00	32,91	0,00	0,06	0,60	0,00	0,08	0,00	0,00	0,87	0,00	0,00	0,00
Anavilhanas-AM ^a	15	0,00±0,00	36,27±6,02	0,00±0,00	0,35±0,09	0,60±0,36	0,00±0,00	0,00±0,00	0,20±0,09	0,00±0,00	0,27±0,11	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Eirunepé-AM ^b	1	0,00	26,89	0,21	0,01	0,03	3,05	0,19	0,03	0,08	3,40	0,00	0,00	0,00
<i>Metania fittkauui</i>														
Belterra-PA ^c	3	0,00±0,00	33,12±0,21	0,00±0,00	0,18±0,25	0,08±0,03	0,00±0,00	0,00±0,00	0,17±0,01	0,00±0,00	0,46±0,01	0,04±0,06	0,00±0,00	0,00±0,00
São Gabriel da Cachoeira-AM ^a	3	0,00±0,00	42,30±2,69	0,00±0,00	0,12±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,16±0,00	0,00±0,00	0,04±0,00	0,07±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
<i>Drulia cristata</i>														
Belterra-PA ^c	3	6,27±2,42	36,75±0,45	0,03±0,04	0,21±0,04	0,07±0,02	0,00±0,00	0,14±0,016	0,18±0,00	0,04±0,01	0,21±0,01	0,08±0,00	0,59±0,83	0,09±0,00
Santarém-PA ^c	3	5,43±1,23	33,85±1,22	0,00±0,00	0,14±0,07	0,02±0,02	0,11±0,00	0,05±0,00	0,17±0,00	0,00±0,00	0,18±0,03	0,32±0,042	0,00±0,00	0,09±0,00
Santarém-PA ^c	3	15,79±1,91	31,33±1,75	0,04±0,03	0,01±0,01	0,03±0,01	0,58±0,19	0,12±0,02	0,02±0,00	0,05±0,04	0,92±0,18	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
<i>Drulia uruguayensis</i>														
Belterra-PA ^c	3	5,36±2,25	37,18±0,61	NQ	0,11±0,16	0,01±0,01	0,00±0,00	0,04±0,02	0,09±0,12	0,01±0,02	0,34±0,11	0,08±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Santarém-PA ^c	3	2,31±1,14	34,78±1,79	NQ	0,10±0,13	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,18±0,00	0,02±0,02	0,16±0,03	0,08±0,00	0,00±0,00	0,05±0,07
Manaus-AM ^a	3	17,70±0,49	28,08±0,49	0,05±0,00	0,02±0,00	0,02±0,02	0,92±0,03	0,15±0,00	0,01±0,01	0,04±0,00	2,83±0,38	0,00±0,00	0,01±0,00	0,00±0,00
Maués-AM	1	4,72	31,87	0,00	0,03	0,00	0,00	0,07	0,16	0,04	0,81	0,00	0,00	0,00
Anavilhanas ^a	1	16,33	29,63	0,00	0,01	0,00	2,36	0,33	0,00	1,05	1,50	0,00	0,00	0,00
<i>Drulia brownii</i>														
Iranduba-AM ^a	3	3,52±1,00	35,86±0,63	1,71±2,41	0,10±0,11	0,01±0,00	0,11±0,01	0,00±0,00	0,18±0,00	0,02±0,03	0,32±0,05	0,08±0,00	0,59±0,083	0,51±0,059
Iramduba-AM ^a	3	4,88±0,39	36,19±1,56	3,82±0,42	0,25±0,09	0,39±0,55	0,35±0,12	0,03±0,04	0,10±0,15	0,00±0,00	0,92±0,09	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Caceres-MT ^b	3	11,41±3,06	32,67±3,20	0,12±0,03	0,03±0,02	0,04±0,01	2,51±0,73	0,16±0,09	0,02±0,02	0,15±0,07	1,67±0,31	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Poconé-MT ^b	1	13,01	31,40	0,13	0,02	0,03	2,20	0,14	0,02	0,15	1,94	0,00	0,00	0,00
Tefé-AM ^a	3	12,89±0,03	31,52±0,07	0,21±0,00	0,01±0,00	0,02±0,02	2,81±0,04	0,11±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	1,44±0,07	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

Tabela 1(Continuação): Composição elementar das esponjas de água doce (n – número de amostras).

N	Elemento (% m/m)													
	Al	Si	Ca	S	Cl	K	Ti	V	Mn	Fe	Cu	Zn	Sr	
FAMILIA SPONGILLIDAE														
<i>Trochospongilla paulula</i>														
Eirunepé - AM ^b	3	19,60±0,22	22,58±0,32	0,20±0,00	0,01±0,00	4,14±0,11	0,02±0,00	0,32±0,01	0,05±0,00	0,08±0,00	3,77±0,21	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
Alter do Chão-PA ^c	3	9,50±0,48	36,57±0,65	0,04±0,01	0,04±0,00	0,05±0,00	0,37±0,03	0,08±0,01	0,01±0,00	0,10±0,03	0,73±0,18	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
FAMILIA POTAMOLEPIDAE														
<i>Oncosclera navicella</i>														
Santarém - PA ^c	3	5,70±2,29	41,43±2,19	0,01±0,01	0,01±0,00	0,03±0,02	0,08±0,07	0,04±0,02	0,00±0,00	0,00±0,01	0,20±0,11	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00

NQ – não quantificado

^a – águas pretas^b – águas brancas^c – águas claras

O diagrama de caixa, *boxplot*, é uma forma eficiente para ilustrar um conjunto de dados. A linha central caracteriza a mediana do conjunto de dados (Figura 54). A caixa é delimitada pelo quartil inferior (Q_1) e superior (Q_3), e compreende 50% das amostras. A haste superior se estende até o valor máximo não superior a $Q_3 + 1,5(Q_3 - Q_1)$, enquanto a inferior até o valor mínimo não inferior a $Q_1 - 1,5(Q_3 - Q_1)$. Os pontos fora destes limites são considerados discrepantes, e ilustrados individualmente. O diagrama de caixas possibilita verificar a simetria dos dados sendo adequado para comparação de conjuntos de dados.

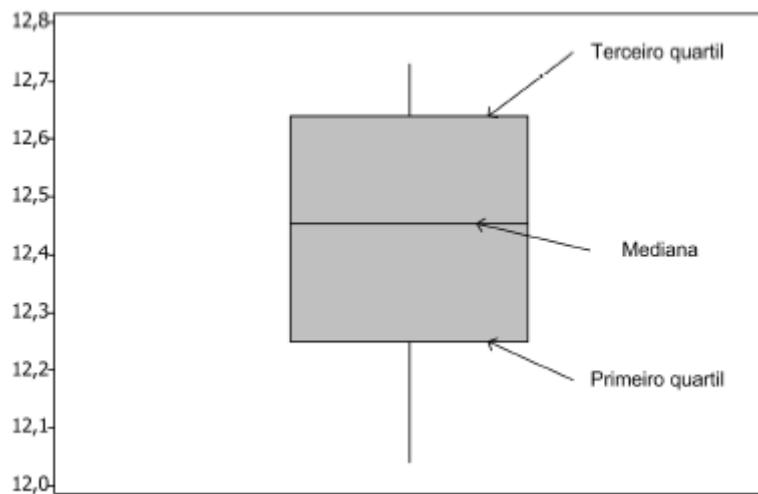


Figura 54: Exemplo de diagrama de caixa.

O silício, como esperado, aparece como elemento mais abundante em todas as amostras analisadas, embora apresente variação em sua concentração (Figura 55). A maior concentração observada foi de 44,53% para uma amostra de *Metania reticulata* coletada no arquipélago de Anavilhanas (Rio Negro). Esponjas marinhas de seis espécies das classes Demospongiae e Hexactinellida não mostraram grande variação no teor de sílica (SiO_2) o qual foi relatado em média na concentração de 85,2% (m/m) de suas espículas (Sandford, 2003), o que é equivalente 39,8% de silício nestas amostras. A menor concentração observada foi de 22,34% para uma amostra de *Trochospongilla paulula* coletada no rio Juruá, de águas claras, essa valor aparentemente baixo é superior ao relatado para espículas da esponja dulcícola *D. uruguayensis*, provenientes do rio Tapajós, 18,86% (Magalhães *et al.*, 2011).

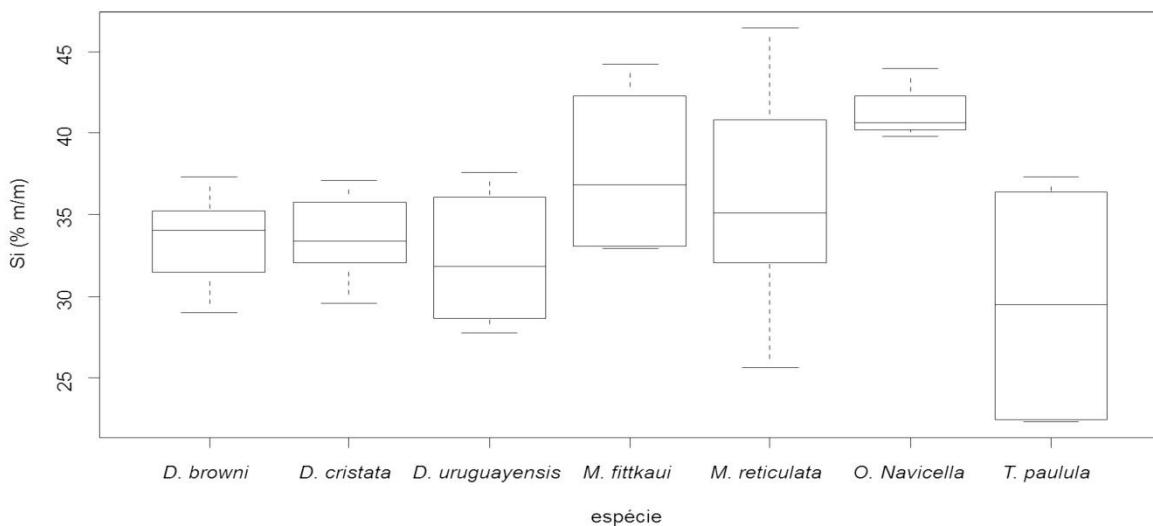


Figura 55: Diagrama de caixas da concentração de silício (% m/m) nas diferentes espécies de esponja dulcícola analisadas.

Para a espécie *Metania reticulata*, todos os espécimes analisados apresentaram em sua composição Fe e S. Trabalho realizado na bacia dos rios Parauari – Maués-Açu relata o ferro em concentrações superiores a encontrada em outros trabalhos realizados na região Amazônica (Bringel *et al.*, 1984). Desta forma explica-se a maior concentração deste elemento na amostra proveniente do rio Maués-Açu, município de Maués AM (Figura 56).

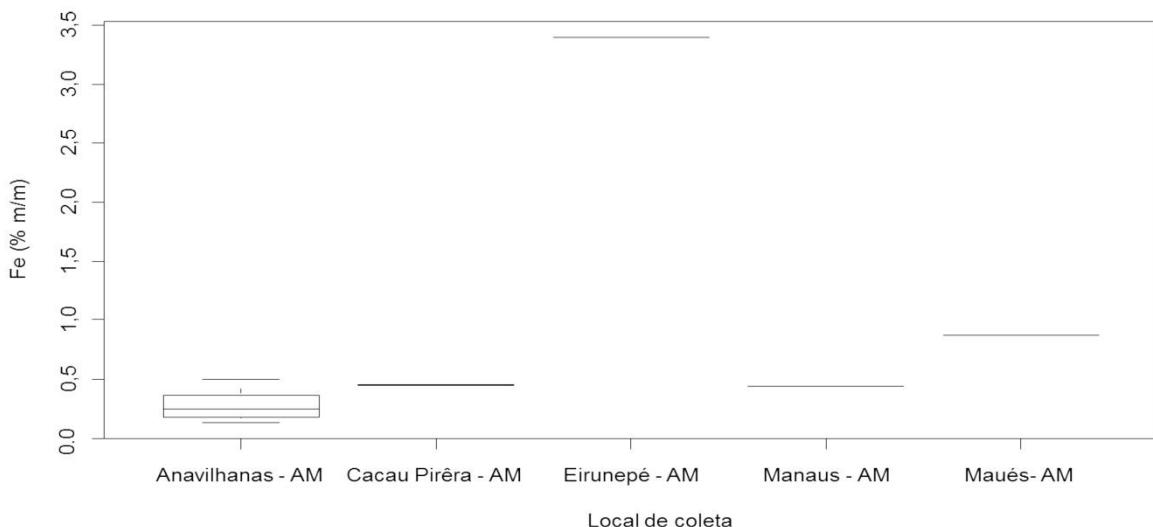


Figura 56: Diagrama de caixa da concentração de ferro (% m/m) nas amostras de *Metania reticulata* nos diferentes pontos de coleta.

O vanádio aparece em concentração superior nas amostras de *Metania reticulata* provenientes do rio Negro (Anavilhanas e Cacau Pirera, AM), $0,19 \pm 0,10\%$, quando comparadas às amostras da mesma espécie provenientes dos municípios de Eirunepé, rio Juruá, e Maués, rio Maués-Açu (Figura 57).

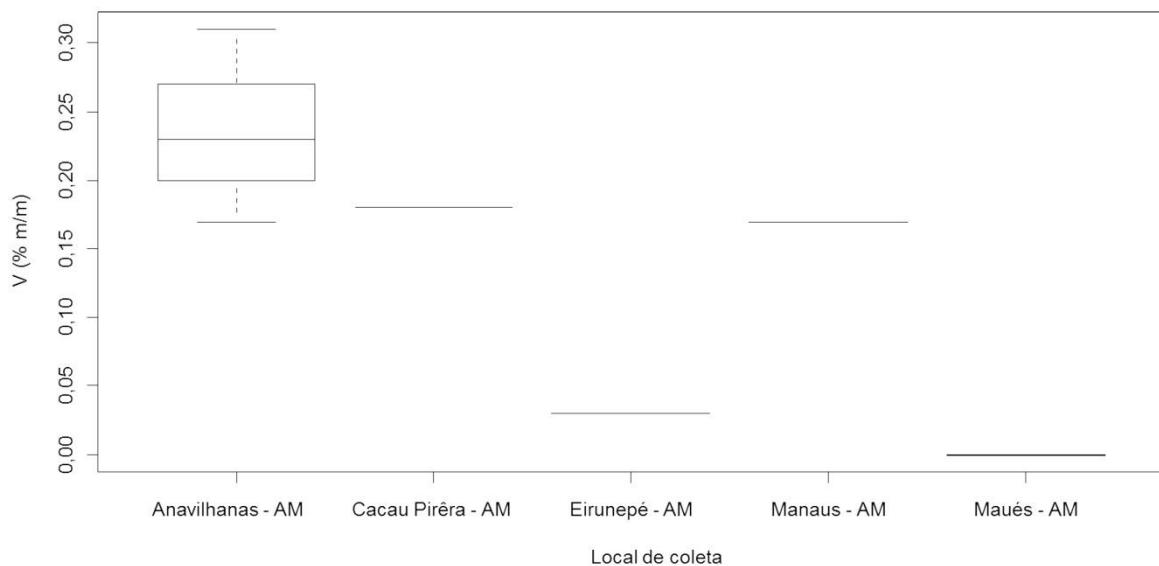


Figura 57: Diagrama de caixa da concentração de vanádio (% m/m) nas amostras de *Metania reticulata* nos diferentes pontos de coleta.

Para outra espécie do mesmo gênero, *Metania fittkaui*, foram observadas concentrações de vanádio similares, $0,16 \pm 0,00\%$ para as amostras coletadas no rio Negro, e $0,17 \pm 0,01\%$ para as amostras coletadas no rio Tapajós. Para a bacia do rio Negro, o vanádio é relatado em concentração superior à encontrada para o rio Tapajós (Seyler e Boaventura, 2003). Desta forma a concentração semelhante nos organismos da mesma espécie sugere a presença de um mecanismo de acúmulo e eliminação (Rainbow, 2002) deste elemento para a espécie *M. fittkaui*.

Já para a espécie *Trochospongilla paulula* nas amostras provenientes do rio Tapajós - Alter do Chão, PA – o vanádio aparece em concentração superior à encontrada para os espécimes do rio Juruá - Eirunepé, AM - (Figura 58). Como a concentração do vanádio é superior nas águas do Juruá em comparação as águas do Tapajós (Seyler e Boaventura, 2003), este elemento provavelmente está sendo acumulado por esta espécie, no entanto o mecanismo de eliminação não está presente como o sugerido para a amostra *M. fittkaui*.

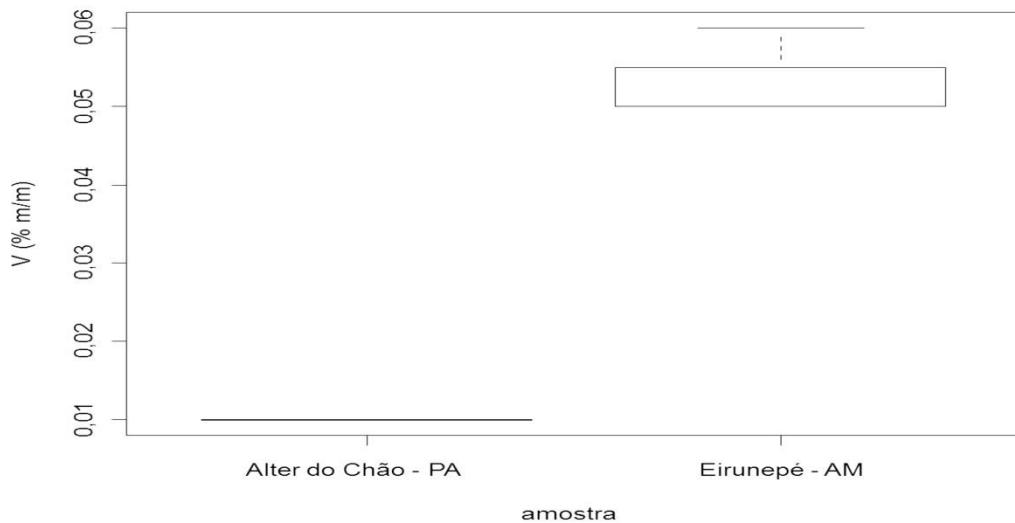


Figura 58: Diagrama de caixa da concentração de vanádio (% m/m) nas amostras de *Trochospongilla paulula* nos diferentes locais de coleta.

O elemento ferro foi encontrado em todos os espécimes analisados, embora também apresente certa variação (Figura 59), principalmente para as espécies *Drulia uruguayensis* e *Trochospongilla paulula*. Para a espécie *Metania reticulata* duas amostras mostraram concentrações superiores às demais.

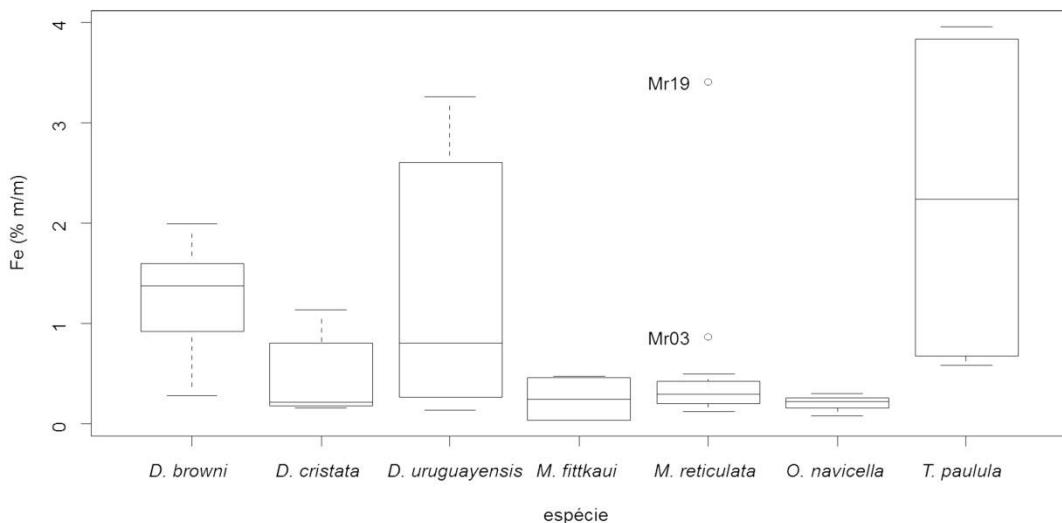


Figura 59: Diagrama de caixas da concentração de ferro (% m/m) nas diferentes espécies de esponjas dulcícolas analisadas.

Analizando apenas as amostras de *D. uruguayensis*, nota-se que os espécimes provenientes de Manaus, que foram coletados aderidos aos pilares de sustentação do porto, apresentam concentração especialmente superior de ferro que as amostras coletadas no rio Tapajós, estado do Pará (Figura 60). Os dados para a concentração de ferro nas águas dos rios Tapajós são conflitantes (Küchler, Miekeley e Forsberg, 2000; Seyler e Boaventura, 2003; Miranda *et al.*, 2009) não permitindo relacionar a concentração de Fe nas esponjas com a água dos rios. A amostra coletada no arquipélago de Anavilhanas, também no rio Negro, apresenta teores inferiores ao das amostras do porto de Manaus, mostrando que estas realmente estão com teores de ferro elevados.

A bioerosão gerada pelas esponjas, atacando carbonato, desempenha importante papel ecológico (Rützler, 1975; Nicol e Reisman, 1976; Bell, 2008; Nava e Carballo, 2008; Hernández-Ballesteros *et al.*, 2013). O concreto, amplamente utilizado em construções marinhas, também pode sofrer com a bioerosão causada pelas esponjas, principalmente quando apresentam teores elevados de calcário (Winkler, 1966; Jadkowski e Wiltsie, 1985). Portanto, possivelmente, o acúmulo de ferro nas esponjas coletadas aderidas aos pilares do porto de Manaus tenha relação com a composição destes.

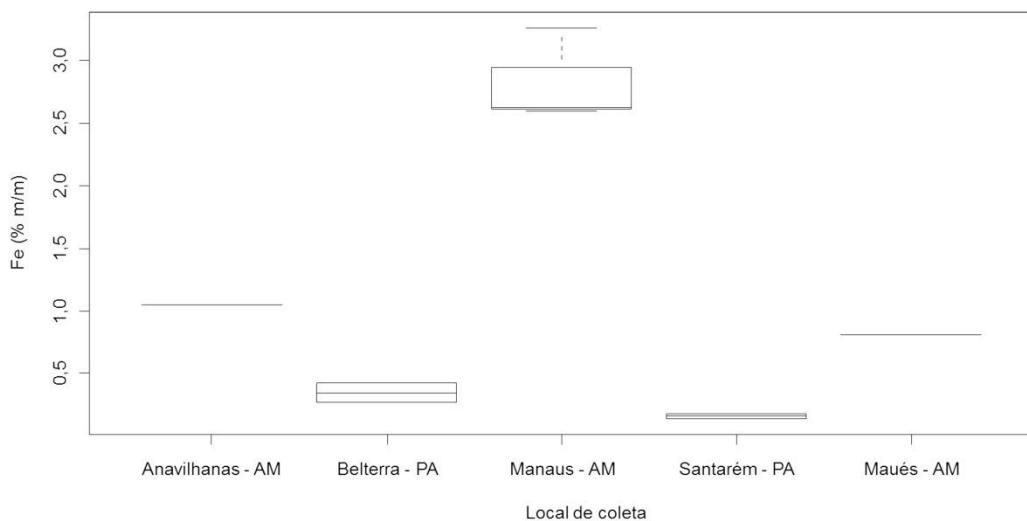


Figura 60: Diagrama de caixa da concentração de ferro (% m/m) nas amostras de *Drulia uruguayensis* nos diferentes pontos de coleta.

Observando a concentração de ferro nas amostras de *Metania reticulata* que apresentam maior concentração são as provenientes do rio Juruá, Eurunepé - AM e rio Maués-Açu, Maués-AM (Figura 61). No rio Juruá, a concentração de ferro é superior à relatada para o rio Negro (Seyler e Boaventura, 2003) que banha o arquipélago de Anavilhanas, Manaus e Cacau Pereira. Da mesma forma para a bacia dos rios Paruari-Maués-Açu também são relatadas concentrações de ferro superiores às encontradas nos demais rios da bacia amazônica (Bringel *et al.*, 1984). Como as amostras com concentrações mais elevadas de Fe coincidem com os rios no qual este elemento se encontra em concentrações superiores sugere a presença de um mecanismo de acúmulo (Rainbow, 2002).

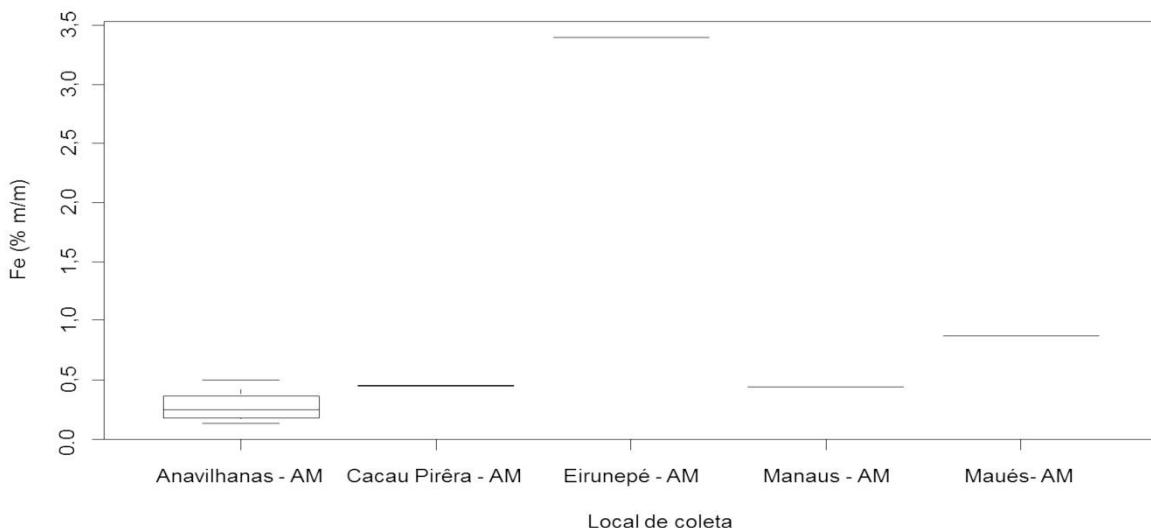


Figura 61: Diagrama de caixa da concentração de Fe (% m/m) nas amostras de *Metania reticulata* nos diferentes locais de coleta.

O cálcio não foi detectado nas amostras de *M. fittkaui*, e apenas em uma das amostras de *M. reticulata*. Nos demais gêneros, Ca é encontrado em algumas amostras, porém em concentrações bastante baixas, sendo encontrado em concentrações maiores apenas em alguns espécimes de *D. browni*.

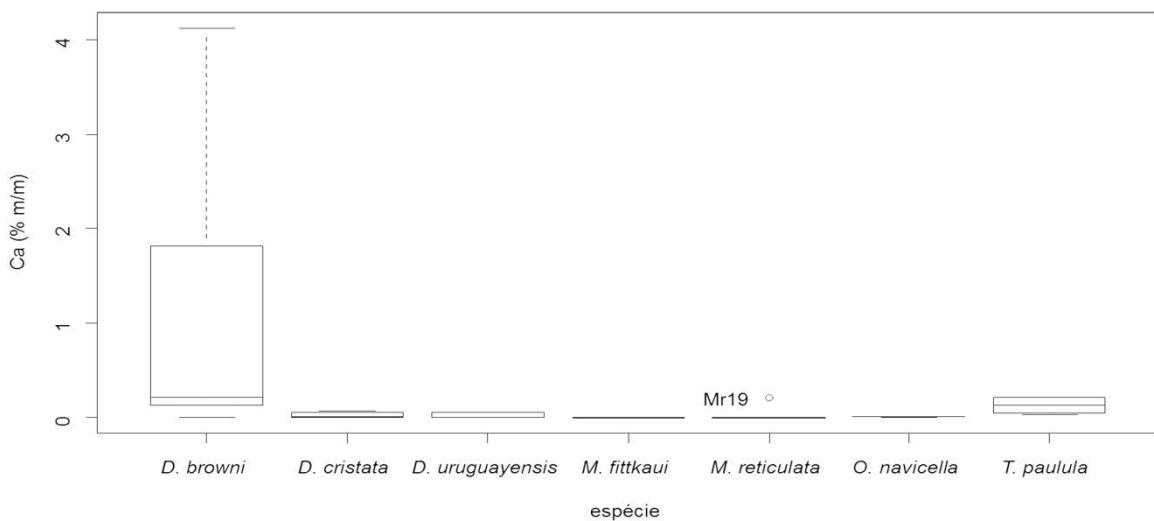


Figura 62: Diagrama de caixa da concentração (% m/m) de Ca nas diferentes espécies de esponjas dulcícolas analisadas.

Para as espécies de *D. browni* coletadas no município de Iranduba, rio Negro, foram registrados os maiores teores de cálcio, enquanto que nas amostras provenientes da bacia do rio Paraguai, coletadas no estado do Mato Grosso, essa concentração foi显著antemente menor (Figura 63). Para a bacia do rio Paraguai, são relatadas concentrações de cálcio inferiores à relatada para o rio Negro (Küchler, Miekeley e Forsberg, 2000; Rezende Filho *et al.*, 2012), explicando essa grande diferença na concentração deste elemento entre as amostras coletadas nestas bacias.

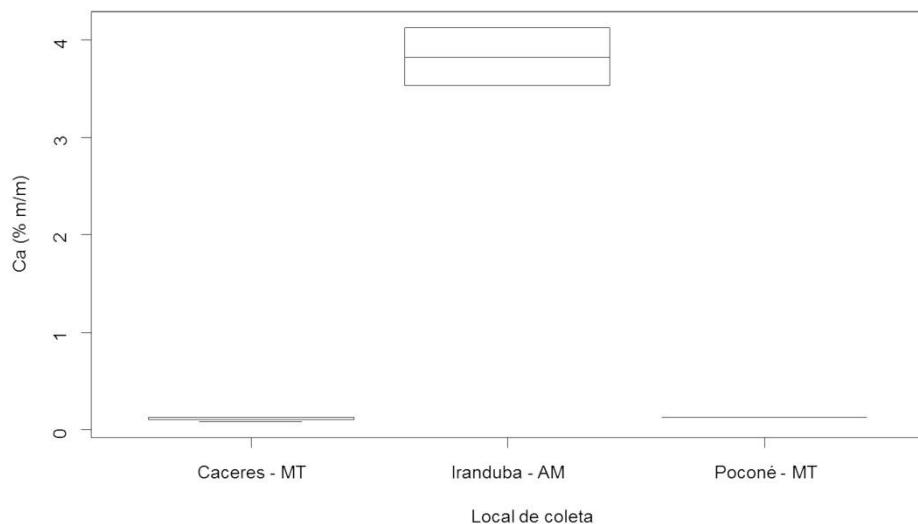


Figura 63: Diagrama de caixas da concentração (% m/m) de Ca nas amostras de *Drulia browni* nos diferentes pontos de coleta.

O manganês não foi detectado nas amostras de *Metania fittkaui* e em apenas uma das amostras de *M. reticulata*, proveniente do rio Juruá (Eirunepé-AM). Nas demais espécies foi detectado em todas as amostras (Figura 64).

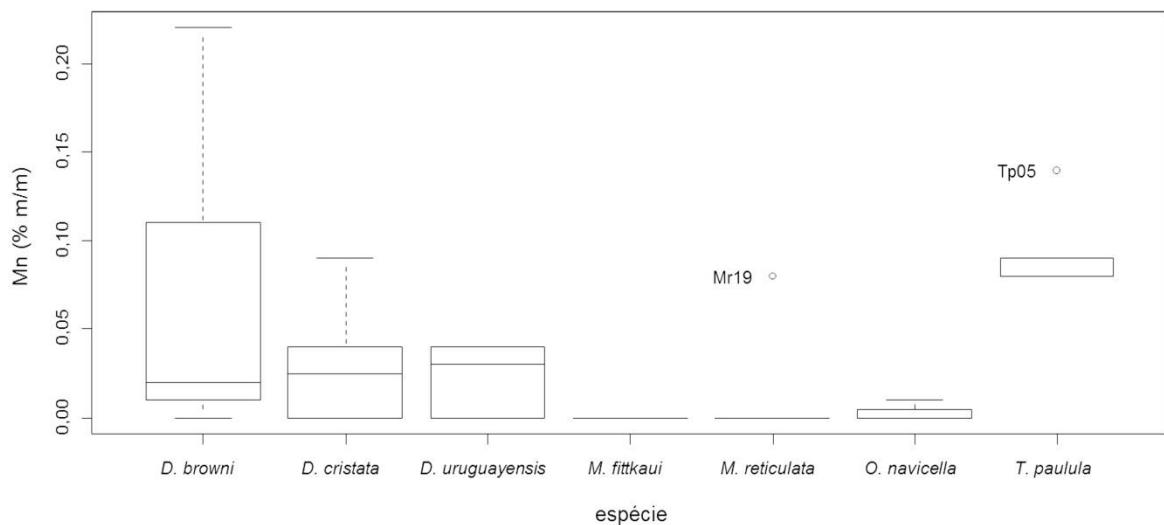


Figura 64: Diagrama de caixa da concentração de manganês (% m/m) nas diferentes espécies de esponjas dulcícolas analisadas.

O resultado observado para as amostras de *M. reticulata* apresentam uma incoerência, pois o manganês é relatado para as águas dos rios Juruá, Maués Açu e Negro (Bringel *et al.*, 1984; Seyler e Boaventura, 2003), no entanto só foi detectado nas amostras provenientes do segundo coletadas no município de Eirunepé – AM.

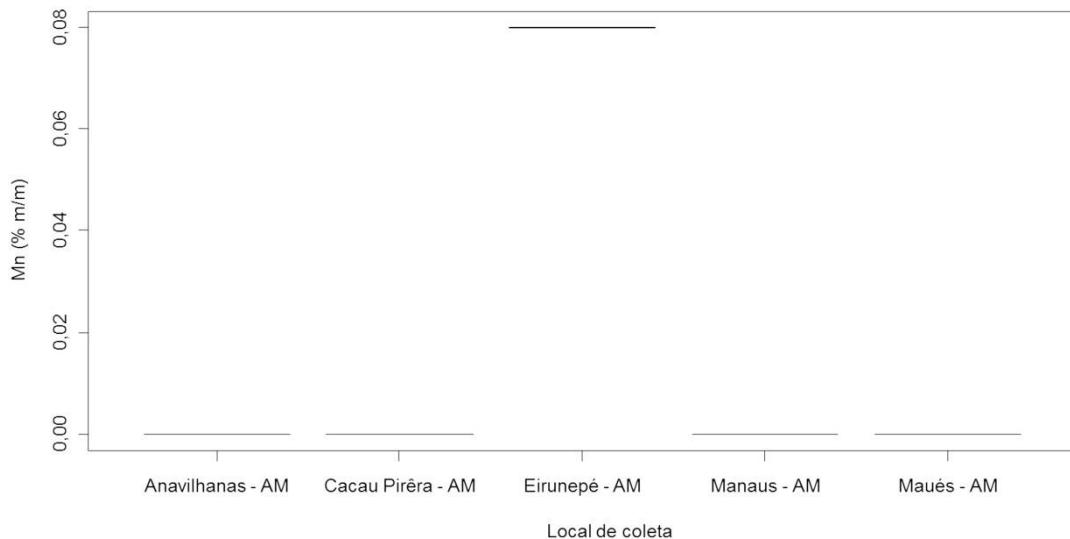


Figura 65: Diagrama de caixa para a concentração de manganês (% m/m) nas amostras de *Metania reticulata* nos diferentes pontos de coleta.

A variação na composição elementar de invertebrados aquáticos já é bem documentada em função dos diversos mecanismos de acúmulo e eliminação presentes nestes organismos (Rainbow, 2002; Wang e Rainbow, 2008). Foi observada uma grande variação na concentração de metais nas esponjas aqui analisadas. Estas flutuações não possibilitaram a separação das espécies estudadas em função de sua composição, no entanto algumas características presentes em grupos de amostras foram notadas.

A ausência de alumínio nas amostras do gênero *Metania*, sendo este elemento detectado em todas as demais amostras analisadas e também reportado em esponjas dulcícolas endêmicas do lago Baikal (Paradina *et al.*, 2003; Paradina *et al.*, 2004; Kulikova *et al.*, 2013), mostra uma característica do gênero. Cálcio, potássio e titânio não são detectados em *M. fittkaui*, o que ajuda a caracterizar a espécie.

O acúmulo do vanádio foi observado para a espécie *Trochospongilla paulula*, que mostrou uma concentração maior para este elemento nas amostras provenientes da bacia em que é relatado em maior concentração. O acúmulo de um metal específico por esponjas

marinhas já foi documentado, como por exemplo, para ouro (Bowen, 1968; Inbakandan, Venkatesan e Ajmal Khan, 2010) e ferro (Le Pennec *et al.*, 2003).

5.3. Purificação de sílica

A relativa abundância de esponjas encontradas nas áreas sujeitas aos pulsos de alagamento característicos do regime das águas na bacia Amazônica possibilita fácil acesso a esse recurso natural inexplorado. Deve-se ainda destacar a predominância de espécies dos gêneros *Metania* e *Drulia* da família Metaniidae.

Sendo o silício o principal componente dos esqueletos destes animais, elemento este amplamente empregado pela sociedade, a purificação deste na forma de seu óxido, pode significar uma nova fonte de renda para a população local, sendo mais um recurso a ser explorado de forma sustentável.

Para a purificação do sílico foi selecionada uma amostra de *Metania reticulata* coleta no arquipélago de Anavilhanas em função do teor de sílico elevado nesta amostra ($45,65 \pm 0,10\%$).

Trabalhos visando à obtenção de sílica a partir de casca de arroz, ou mesmo suas cinzas apontam dois caminhos para a purificação desta, um seria a solubilização da sílica em uma solução básica seguida de precipitação seletiva, e outra alternativa é a oxidação da matéria orgânica presente no material bruto, que pode ser tanto realizada química quanto termicamente.

Um exemplo do potencial tecnológico de espículas de esponjas foi demonstrado ao empregar espículas de formato ovoide provenientes de esponjas do gênero *Geodia*, como suporte em coluna para cromatografia em fase gasosa, obtendo desempenho satisfatório, na separação de uma mistura de alcoóis e cetonas (Webb, Smith e Wells, 1965).

A solubilização da sílica seguida da precipitação seletiva foi empregada nas espículas de *M. reticulata* da mesma forma que Kamath e Proctor (1998) descrevem para o trabalho com cinzas de casca de arroz. A metodologia possibilitou certo incremento na concentração de sílica que originalmente era de $97,68 \pm 0,19\%$, para $99,60 \pm 0,07\%$ da massa da amostra I.

Observando que a matéria-prima do trabalho original da primeira metodologia tratava-se de cinzas de casca de arroz (Kamath e Proctor, 1998), e, portanto havia sido previamente

incinerado foi proposta a segunda metodologia baseada em trabalho com a casca de arroz *in natura* (Da Silva Jr *et al.*, 2010).

A primeira etapa da segunda metodologia, originalmente consistia na imersão da amostra em água régia por uma hora com agitação constante (da Silva Jr, 2010). Buscando um melhor resultado a água régia foi substituída por ácido nítrico concentrado, como empregado na preparação do material para a identificação taxonômica (Volkmer-Ribeiro, 1985) e também no trabalho que relata o tratamento das espículas empregadas para empacotar a coluna de cromatografia em fase gasosa (Webb, Smith e Wells, 1965).

A amostra II, obtida através de metodologia adaptada de da Silva Jr e colaboradores (Da Silva Jr *et al.*, 2010), apresentou um teor mais elevado de sílica, $99,92 \pm 0,01\%$, atingindo valor superior ao observado na sílica comercial, $99,71 \pm 0,03\%$ (Figura 66), embora no trabalho original feito com casca de arroz não sejam detectados contaminantes na sílica obtida. Além da alta concentração de silício no produto obtido destaca-se a uniformidade do material obtido refletido no baixo desvio observado.

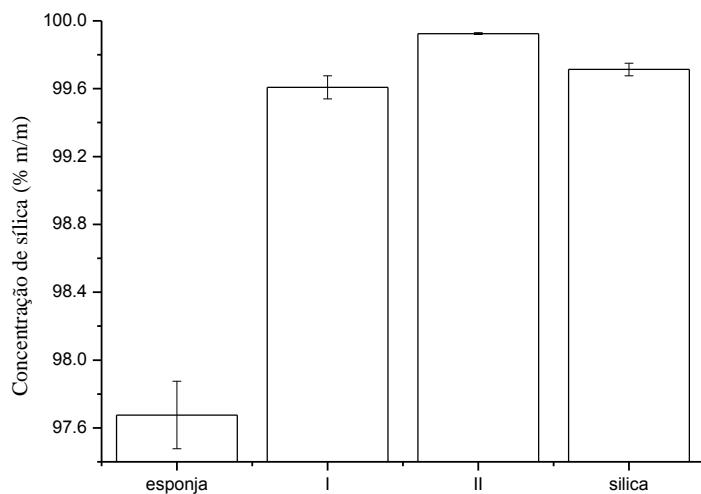


Figura 66: Concentração de sílica nas amostras analisadas.

Além do incremento na concentração de silício do produto obtido com a segunda metodologia testada, também foi observado um pequeno ganho de rendimento, que nesta metodologia foi de $62,12 \pm 0,02\%$, frente aos $55,89 \pm 0,04\%$ na primeira metodologia. A

eficiência na remoção de determinados elementos como Ca, Fe e Mn cresce com o aumento da acidez da solução empregada (Kalapathy, Proctor e Shultz, 2002). Essa relação pode ser observada (Figura 67).

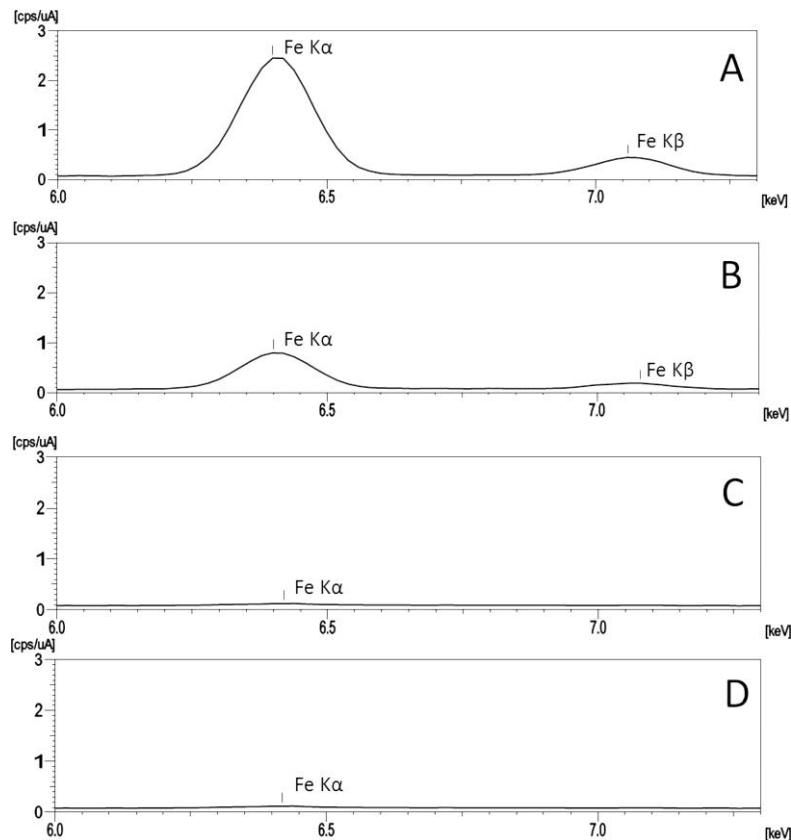


Figura 67: Ampliação do espectro de fluorescência de raios-X por dispersão de energia mostrando a redução na concentração de ferro obeservado na esponja (A), para a sílica purificada método I (B), método II (C) e sílica comercial (D).

No material de partida, o elemento Fe correspondia a $1,09 \pm 0,12\%$ no material de partida, enquanto que na amostra I, submetida a uma lavagem com solução contendo ácido clorídrico, a concentração deste elemento foi reduzida para $0,25 \pm 0,03\%$. Enquanto na amostra II, a concentração de ferro encontrada foi a mesma da sílica comercial $0,02 \pm 0,001\%$ (Figura 68).

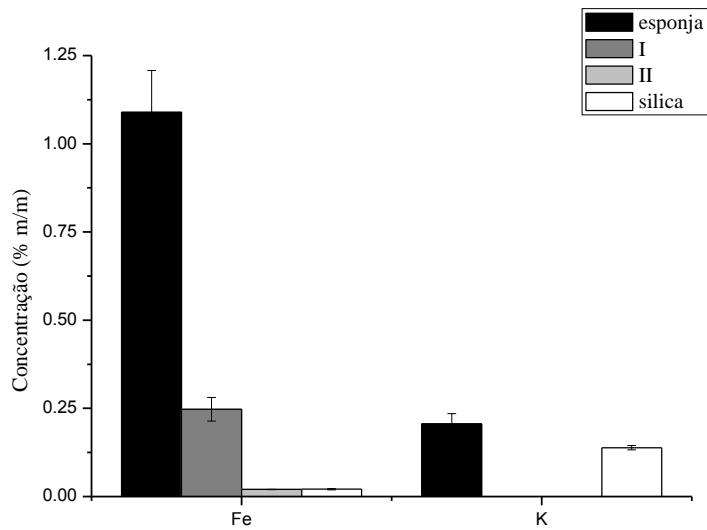


Figura 68: Concentração de ferro e potássio nas amostras analisadas.

Potássio foi encontrado naturalmente na esponja. No entanto, o processo de purificação diminuiu sua concentração, de forma que não foi detectado nas amostras obtidas, embora esteja presente na sílica comercial. O mesmo comportamento foi observado para o cálcio e titânio (Figura 69).

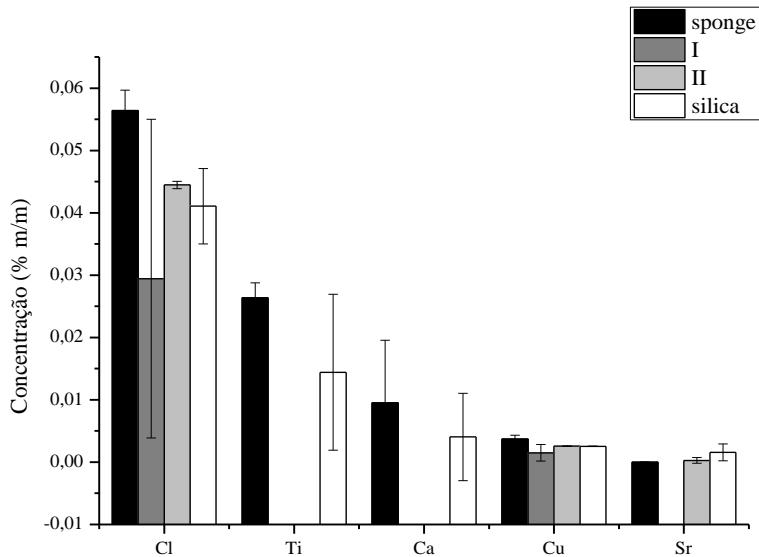


Figura 69: Concentração elementos minoritários presentes nas amostras analisadas.

O cobre foi encontrado na mesma concentração em todas as amostras, incluindo o material de partida e a sílica ($0,003 \pm 0,001\%$).

Fósforo e bromo foram encontrados apenas nas amostras *in natura*, não sendo detectado nas amostras purificadas, assim como na sílica comercial usada para comparação.

O enxofre, que corresponde a 0,03% do material de partida, teve sua concentração reduzida não sendo detectado nas amostras purificadas (Figura 70), também ausente na sílica comercial.

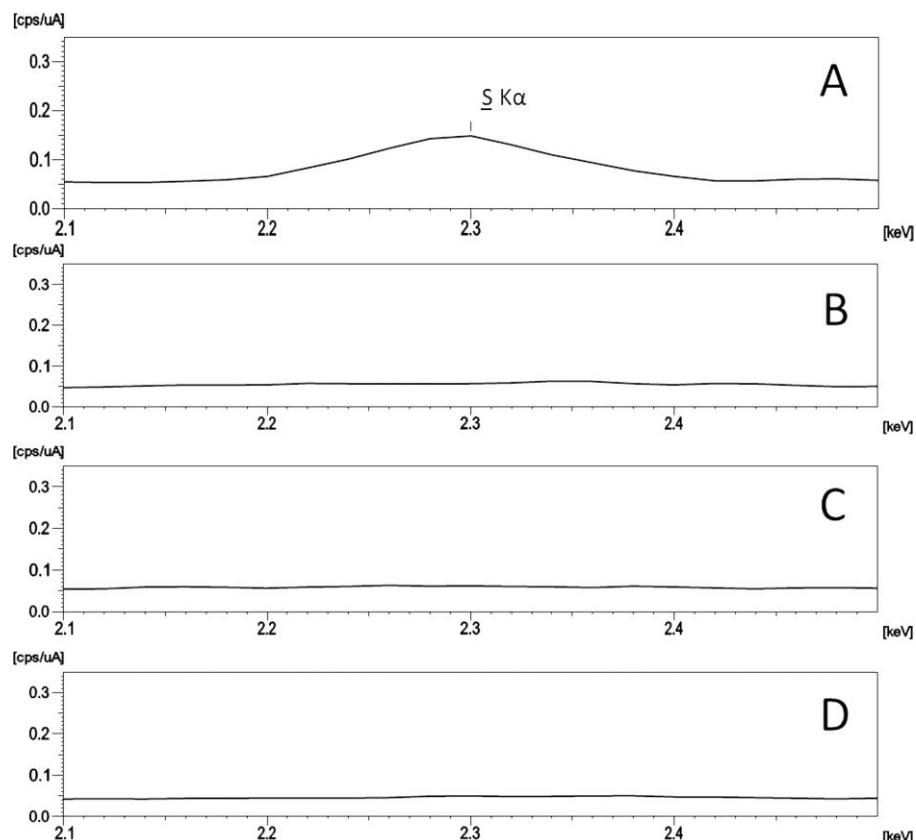


Figura 70: Ampliação do espectro de fluorescência de raios-X por dispersão de energia mostrando a redução na concentração do enxofre observado na esponja (A), para a sílica purificada método I (B), método II (C) e sílica comercial (D).

Para possibilitar o uso das espículas como suporte para catalisadores a remoção de contaminantes encontrados na esponja *in natura* como Fe, K, Ca, Ti, P e S é de grande importância, pois estes podem influenciar a cinética de diversas reações, podendo atuar como inibidores ou catalisando reações secundárias (Brown, Hargreaves e Rijniersce, 1998; Bulushev *et al.*, 2000; Xue *et al.*, 2009; Croston, Grant e Walker, 2010; Lagaditis, Lough e

Morris, 2010; Ramesh *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2010; Von Deak *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Amirkhiz *et al.*, 2011; Mitsuoka *et al.*, 2011; Ammendola *et al.*, 2012).

As espículas *in natura*, ao serem avaliadas em difração de raios-X, apresentaram um teor de cristalinidade de 57,42%, indicando a presença de contaminantes cristalinos, visto que a sílica presente nas esponjas é amorfa. Ao se proceder em sua purificação, nas duas metodologias testadas, não se observa mais cristalinidade alguma nas amostras.

Os resultados obtidos indicam que a segunda metologia, adaptada Silva Junior e colaboradores (2010), é a mais indicada para se obter sílica de alta pureza a partir das esponjas dulcícolas da Amazônia, pois originou um produto com maior grau de pureza e maior redimento quando comparada a metodologia adaptada Kamath e Proctor (1998).

A metodologia escolhida também apresenta características que favorecem a implantação de processos em maior escala, por usar insumos de baixo valor agregado e de uso comum em muitos processos industriais. Os volumes de ácido nítrico e da solução de peróxido de hidrogênio e ácido sulfúrico empregados no processo, que podem gerar grande impacto ambiental, podem ser otimizados e reciclados.

Outro fator que pode significar um problema ambiental é a coleta de grande volume de esponjas, no entanto podem-se aproveitar as estruturas das pontes e barragens que estão se proliferando pelos rios da Amazônia, que podem atuar como fonte para esse recurso haja vista o grande volume de esponjas presentes nos pilares do porto de Manaus. A proliferação destes organismos nas estruturas de concreto pode representar ainda um problema em função de processos de bioerosão (Winkler, 1966; Jadkowski e Wiltsie, 1985), tornando a retirada destes organismos duplamente vantajosa.

A aquacultura também é uma alternativa, visto que a produção de esponjas marinhas já apresenta bons resultados há séculos em função das esponjas de banho, e a técnica tem evoluído em função da produção de fonte para alguns metabólitos (Duckworth, Battershill e Bergquist, 1997; Müller *et al.*, 1999; Page *et al.*, 2005; Duckworth, 2009; Ruiz *et al.*, 2013).

Como as sílicas amorfas não são exatamente iguais, apresentando, por exemplo, diferentes atividades catalíticas, embora idênticas em análises de ressonância magnética de ^{29}Si e difração de raios-X (Hamdan *et al.*, 1997), uma nova fonte de sílica amorfa significa um novo material que deve ter suas propriedades investigadas, a fim de determinar suas possíveis aplicações.

5.4. Esteróis majoritários dos extratos em hexano.

Os extratos em hexano foram analisados por cromatografia em fase gasosa com detectores de ionização de chama (CG-DIC) e espectrometria de massas (CG-EM). A análise direta dos espectros de massas obtidos evidenciou a presença de hidrocarbonetos, ácidos graxos e esteróis, pois foi possível identificar diversos padrões característicos destas classes.

As primeiras análises realizadas permitiram a visualização de cinco esteróis majoritários nos extratos apolares das esponjas dulcícolas da família Metaniidae que foram as primeiras a serem analisadas. Este perfil já se mostra diferente dos relatados para outras espécies de esponjas dulcícolas, onde o colesterol aparece como grande majoritário, além de diversos outros esteróis em concentrações bastante reduzidas (Manconi *et al.*, 1988; Makarieva *et al.*, 1991; Kolesnikova, Makarieva e Stonik, 1992).

Desta forma os extratos em hexano foram submetidos a uma coluna de cromatografia com sílica impregnada com KOH com o intuito de se obter uma fração livre dos ácidos graxos presentes no extrato. As frações não ácidas obtidas foram então submetidas à cromatografia de coluna aberta com hexano e acetato de etila em gradiente crescente de polaridade. As frações reunidas que apresentavam *Rf* similar ao do colesterol foram submetidas a cromatografia flash e as frações obtidas, ricas em esteróis, foram analisadas por CC-EM e CG-DIC.

Diversos esteróis já têm seus espectros de massas amplamente estudados (Friedland *et al.*, 1959; Knights, 1967; Wyllie, Amos e Tökés, 1977), embora nem todos os mecanismos envolvidos nas reações de fragmentação sejam bem compreendidos.

A eliminação da água em esteróis 3β hidroxilados com insaturação no carbono 5 envolve predominantemente o hidrogênio 1β , no entanto os estudos com marcação isotópica indicam a participação significativa dos hidrogênios nas posições 6 , 8β , 9α e provavelmente a metila C19 (Figura 71) (Wyllie, Amos e Tökés, 1977). O íon referente a perda de água na fragmentação destas moléculas é bastante evidente em seus espectros de massa, e diversos picos importantes na identificação destes compostos envolvem a eliminação de água (Friedland *et al.*, 1959).

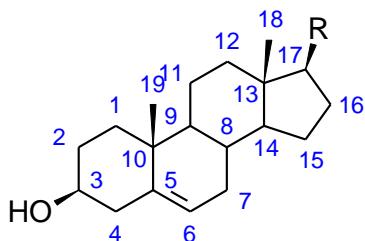


Figura 71: Esqueleto básico de esterol 3β hidroxilado com insaturação no carbono 5;

Enquanto que nos espectros de massas dos esteróis acetilados o pico do íon molecular não é observado devido à facilidade de ocorrer à eliminação do ácido acético originando o íon $[M-60]^+$, através de um mecanismo 1,2 envolvendo um hidrogênio adjacente, preferencialmente ligado ao carbono 4 (Partridge e Djerassi, 1977).

A perda de um grupo metil também é frequentemente observada em esteróis, tanto a partir do íon molecular quanto do íon $[M-18]^+$. No caso dos derivados acetilados essa fragmentação é observada a partir do íon $[M-60]^{+}$. A marcação isotópica das metilas indica que essa eliminação envolve preferencialmente o carbono 19 em detrimento ao 18 (Partridge e Djerassi, 1977; Wyllie, Amos e Tökés, 1977).

A perda da cadeia lateral no carbono 17 (m/z 273) e da combinação da cadeia lateral e uma molécula de água (m/z 255) também são fragmentações comuns em esteróis (Figura 72), embora não muito significantes no colesterol (Wyllie, Amos e Tökés, 1977).

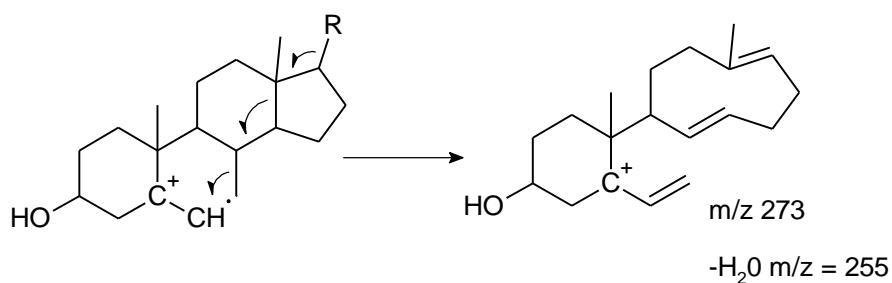


Figura 72: Formação dos íons m/z 273 e 255.

Os picos m/z 231, e seu produto de desidratação m/z 213, são gerados pela perda do anel D com a cadeia lateral e um hidrogênio extra, também são característicos de esteróis com substituição no carbono 17 (Figura 73). Estudos com marcação isotópica não foram capazes de identificar a origem do hidrogênio extra envolvido nessa fragmentação, indicando uma

origem randômica com maior contribuição das posições 7, 8β , 9α , 12, 14α e 18, sendo que a maior contribuição viria do 14α (Tokes, Jones e Djerassi, 1968; Wyllie, Amos e Tökés, 1977).

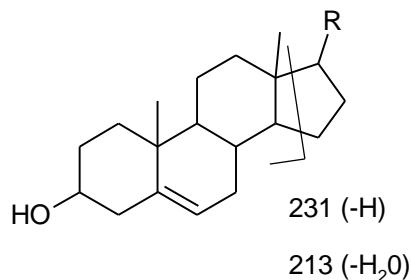


Figura 73: Formação dos íons m/z 231 e 213 em esteróis 3β hidroxilados com cadeia lateral no carbono 17.

A formação do íon $[\text{M}-139]^+$ para os esteróis 3β hidroxilados ocorre de forma análoga a formação do íon $[\text{M}-181]^+$ para seus derivados acetilados, com a perda dos anéis A e B (Figura 74) (Partridge e Djerassi, 1977; Wyllie, Amos e Tökés, 1977).

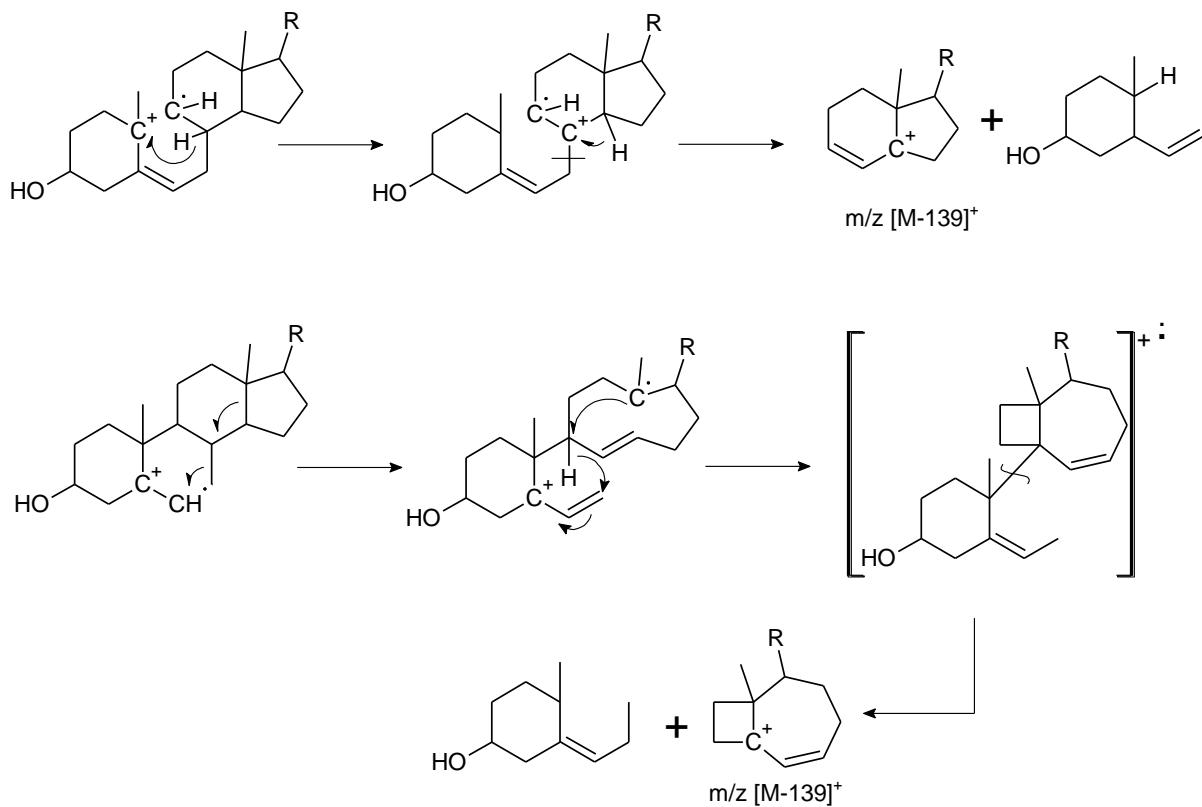


Figura 74: Formação do íon $m/z [M-139]^+$.

Conhecendo essa pluralidade de mecanismos de fragmentação presentes nos esteróis, ao observarmos o espectro de massas obtido para o colesterol podemos identificar a presença de diversos destes íons, como ilustrado na Figura 75.

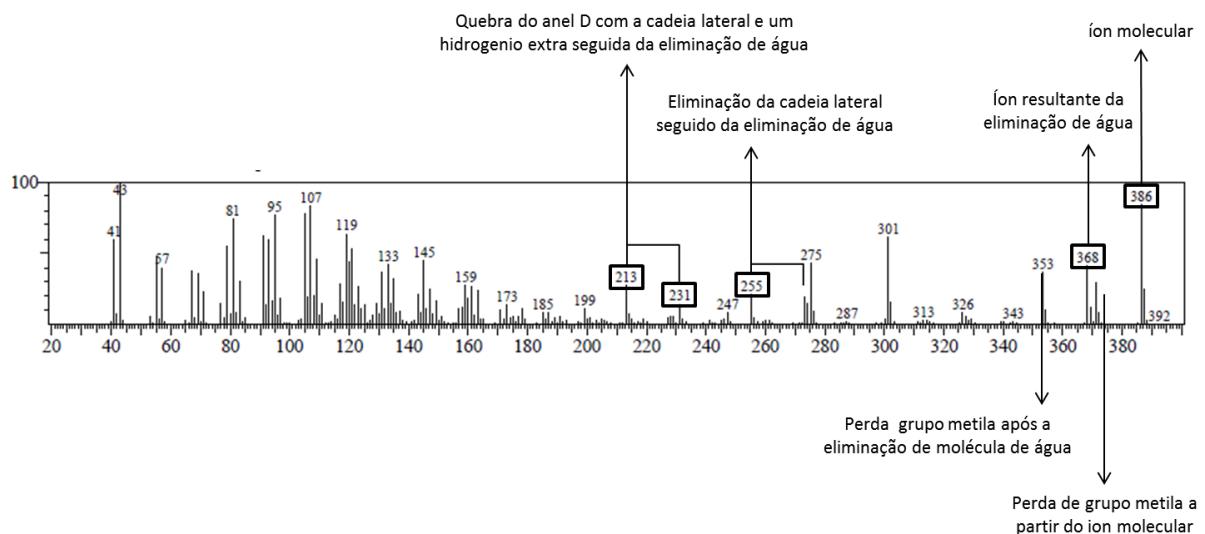


Figura 75: Íons característicos identificados no espectro de massas do colesterol.

O comportamento cromatográfico também é explorado na identificação de compostos por cromatografia em fase gasosa, tendo como exemplo o uso do índice de retenção amplamente utilizado na identificação de componentes de óleos essenciais (Adams, 2009).

Na identificação dos esteróis presentes nas esponjas foi empregada uma programação isotérmica a 280 °C para análise de esteróis acetilados e o cálculo do tempo de retenção relativo ao colesterol acetilado (Kolesnikova, Makarieva e Stonik, 1992; Santalova *et al.*, 2004). Além disso, a co-eluição com um padrão de colesterol acetilado foi empregada para eliminar dúvidas quanto a identidade do mesmo (Figura 76).

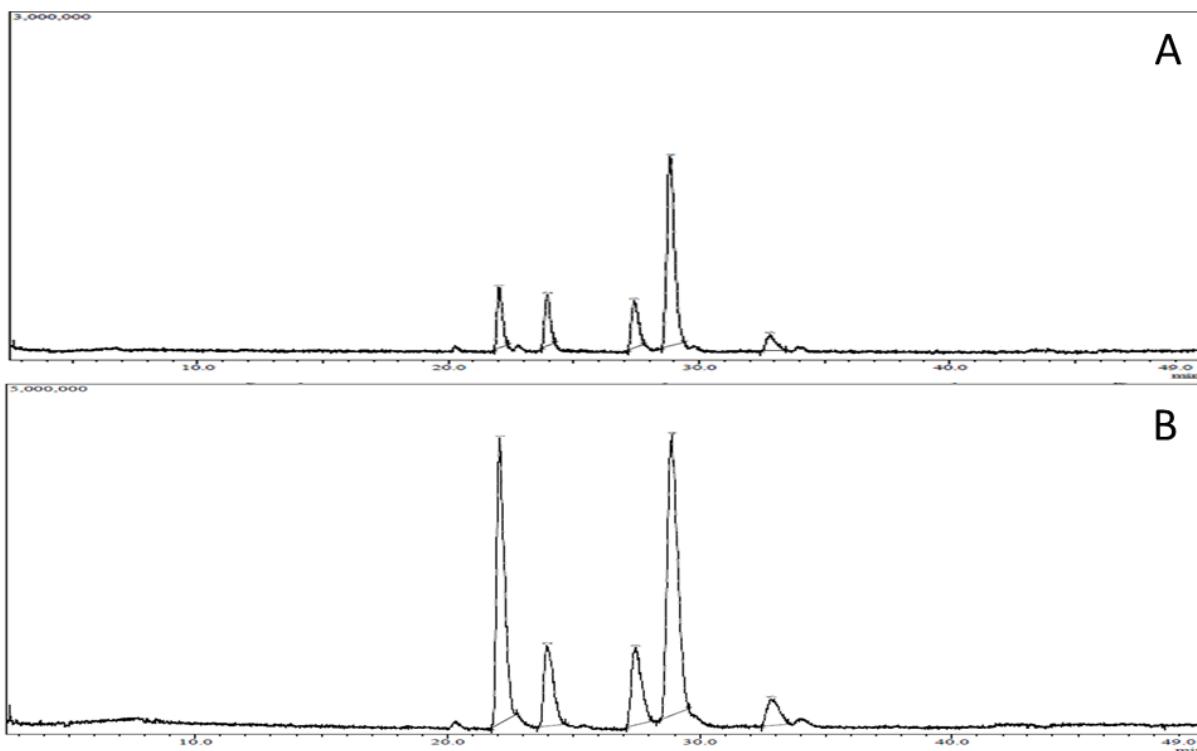


Figura 76: Cromatograma de uma fração esteroidica acetilada (A) e B cromatograma da mesma fração com adição de colesterol acetilado.

Comparando o conjunto de dados obtidos das análises em CG-DIC e CG-EM, com os dados de fragmentação de esteróis acetilados e tempos de retenção relativa (Kolesnikova, Makarieva e Stonik, 1992; Santalova *et al.*, 2004), que se encontram na Tabela 2, foi possível identificar os esteróis majoritários (Figura 77) nas frações esteroidais dos extratos em hexano e quantificá-los nestes extratos.

Tabela 2: Dados utilizados na identificação dos esteróis majoritários.

	Esterol	Fragmentos típicos ⁱ	TRR ^{i:ii}
I	$C_{27}\Delta^5$	368, 353, 260, 255, 247, 213	1,00
II	$C_{28}\Delta^{5,22}$	380, 365, 282, 267, 255, 213	1,09
III	$C_{28}\Delta^5$	382, 367, 261, 255, 213	1,24
IV	$C_{29}\Delta^{5,22}$	394, 282, 267, 255, 213, 69	1,31
V	$C_{29}\Delta^5$	396, 381, 275, 255, 213	1,49

TRR – tempo de retenção relativo

i (Kolesnikova, Makarieva e Stonik, 1992; Santalova *et al.*, 2004)

ii Tempo de retenção relativo

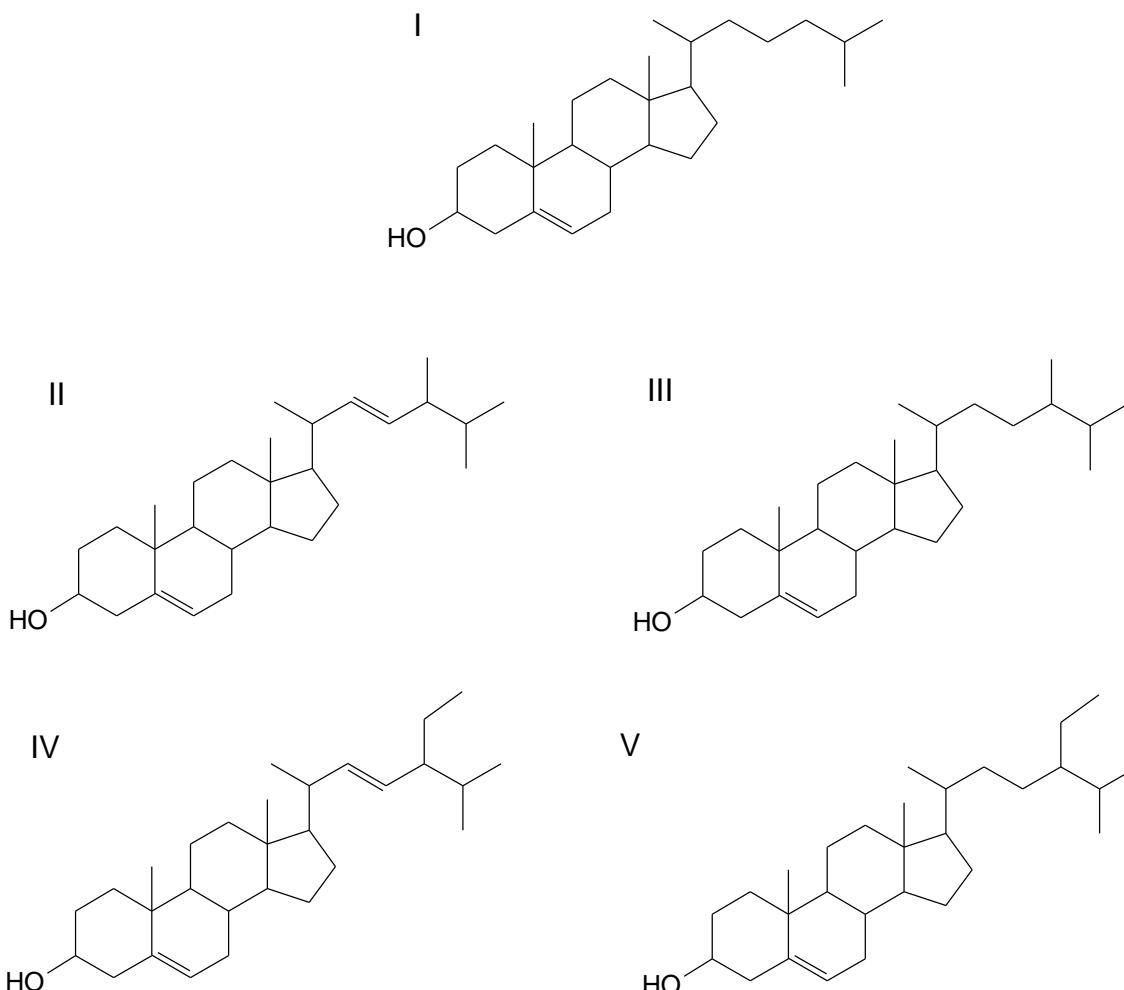


Figura 77: Estrutura dos esteróis identificados: colesterol (I); 24-metil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol (II), 24-metil-colesta-5-eno-3 β -ol (III); 24-etil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol (IV); 24-etil-colesta-5-eno-3 β -ol (V).

O colesterol é o principal marcador químico de esponjas dulcícolas segundo os estudos já realizados (Manconi *et al.*, 1988; Kolesnikova, Makarieva e Stonik, 1992; Hu *et al.*, 2009). Nas análises aqui realizadas foram observados resultados distintos para as espécies *Metania reticulata*, *M. fittkaui*, *Drulia cristata*, *D. uruguayensis* e *D. browni* pertencentes a família Metaniidae e na espécie *Oncosclera navicela* (família Potamolipidae), nas quais o esterol majoritário é o 24-etil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol (Tabela 3). Apenas para *Trocospongilla paulula* da família Spongillidae o colesterol (I) foi o esterol majoritário, resultado este que corrobora os dados encontrados na literatura que se referem a espécies desta família (Manconi *et al.*, 1988; Kolesnikova, Makarieva e Stonik, 1992; Hu *et al.*, 2009).

Tabela 3: Esteróis presentes nos extratos em hexano das esponjas de água doce.

	Concentração no extrato em hexano (%)				
	I	II	III	IV	V
FAMILIA METANIIDAE					
<i>Metania reticulata</i>					
Lago do Cacau ^a	2,24	2,30	4,64	15,26	2,23
Lago do Tupé ^a	7,97	10,30	11,33	27,61	7,71
Praia do Cachorro ^a	10,60	6,30	8,10	21,10	6,40
Anavilhanas ^a	8,20	5,65	9,90	23,60	8,38
Anavilhanas ^a	7,32	4,13	7,50	17,68	7,54
Igarapé do Soldado ^c	3,17	1,06	6,00	11,06	6,51
<i>Metania fittkaui</i>					
Lago do Encanto ^b	1,07	0,00	1,09	3,66	1,01
Iagarapé Mapi ^a	2,12	1,16	2,27	5,86	3,50
<i>Drulia cristata</i>					
Lago do Juá ^b	7,48	6,35	8,31	31,10	5,27
Igarapé do Encanto ^b	8,24	7,24	9,21	24,10	5,86
<i>Drulia brownii</i>					
Lago Janauari ^a	14,39	5,96	14,85	28,45	11,42
Lago Janauari ^a	11,92	6,02	16,53	28,03	12,61
Baia do Malheiros ^c	6,11	7,38	15,68	35,05	18,62
Anavilhanas ^a	11,85	8,09	13,59	31,97	6,43
<i>Drulia uruguayensis</i>					
Igarapé do Encanto	2,09	1,79	4,69	11,40	3,27
Porto de Manaus ^a	14,87	4,69	6,73	26,87	3,62
Ilha de Vera Cruz ^a	7,91	4,29	14,20	56,75	10,42
Anavilhanas ^a	7,88	5,17	13,86	51,88	11,49
Anavilhanas ^a	5,45	5,94	6,78	23,68	4,02
FAMILIA SPONGILLIDAE					
<i>Trochospingilla paulula</i>					
Alter do Chão ^b	32,11	3,27	10,53	20,32	8,16
Turuacá Velho ^b	4,93	2,27	0,72	4,67	4,01
FAMILIA POTAMOLIPIDAE					
<i>Oncosclera navicella</i>					
Praia do Maracanã ^b	9,58	0,00	6,54	13,43	4,53

ND – não detectado

^a - águas pretas^b - águas claras^c - águas brancas

A incorporação de lanosterol e cicloartenol, marcados isotopicamente, em esponjas de diferentes famílias da classe Demospongiae, incluído as espécies dulcícolas *Ephydatia fluviatilis* e *Eunapius fragilis* da família Spongillidae, demonstrou que muitos destes organismos possuem capacidade de biossintetizar esteróis *de novo* (Kerr *et al.*, 1989).

Para as esponjas marinhas *Axinella polypoides* e *Axinella verrucosa*, nas quais não foi observado a incorporação do lanosterol e cicloartenol (Kerr *et al.*, 1989), foi observado a incorporação de um outro percurso, o esqualeno, demonstrando que também eram capazes de produzir esteróis *de novo* (Silva, Wunsche e Djerassi, 1991), levando os autores do trabalho a sugerir que todas as esponjas possuem essa capacidade.

A produção de colesterol (I), através da dealquilação de um precursor com insaturação no C₂₄₍₂₈₎, foi demonstrada para esponjas marinhas da classe Demospongiae (Malik, Kerr e Djerassi, 1988) A presença de C₂₇ norergostanos e C₂₆ 24-nor-esterois em esponjas marinhas já indicava a presença de mecanismos como estes, já documentados em outros invertebrados, como: insetos. (Robbins *et al.*, 1971; Ikekawa, 1985), moluscos (Khalil e Idler, 1976; Teshima, Kanazawa e Miyawaki, 1979), crustáceos (Teshima e Kanazawa, 1971; Kanazawa, Guary e Ceccaldi, 1976) e coelenterados (Saliot e Barbier, 1973).

Posteriormente foi demonstrado que o mecanismo, presente em esponjas, de dealquilação de esteróis, adquiridos por ingestão, se assemelha ao presente nos insetos, envolvendo a oxidação com instauração na posição 24(28). Inclusive foi demonstrada a existência de um mecanismo inverso, através do emprego de múltiplos precursores marcados isotopicamente, com competição entre as duas vias do mecanismo (Kerr *et al.*, 1990; Kerr *et al.*, 1992). Desta forma, especificamente em relação aos esteróis, o mesmo organismo pode biossintetizar ou transformar moléculas que absorve para suprir suas necessidades, expondo a grande adaptabilidade das esponjas.

O esterol encontrado em maior abundância nas espécies das famílias Metaniidae e Potamolepidae 24-etil-colesta-5,22-dieno-3β-ol (IV), já foi relatado para a espécie dulcicola *Lubomirskia baicalensis*, onde representa apenas 3,6% da mistura esteroídica (Kolesnikova, Makarieva e Stonik, 1992).

Os outros três esteróis encontrados 24-metil-colesta-5,22-dieno-3β-ol (II), 24-metil-colesta-5-eno-3β-ol (III) e 24-etil-colesta-5-eno-3β-ol (V) também são relatados como minoritários nas espécies *Lubomirskia baicalensis* (Kolesnikova, Makarieva e Stonik, 1992), *Spongilla lacustris* e *Ephydatia fluviatilis* (Manconi *et al.*, 1988).

Os esteróis Δ⁵ e Δ^{5,22} geralmente ocorrem de forma associada, assim como a predominância de um esterol C₂₉ com a presença dos esteróis C₂₈ e C₂₇ de mesmo esqueleto em concentração significante indica biotransformações específicas, já relatadas em esponjas (Bergquist, Hofheinz e Oesterhelt, 1980).

Um conjunto de esteróis ou de determinados esqueletos caracterizam algumas ordens e famílias do filo Porifera (Bergquist, Hofheinz e Oesterhelt, 1980; Bergquist, Lavis e Cambie, 1986; Bergquist *et al.*, 1991). A presença de esteróis com uma característica específica, anéis ciclopropânicos nas cadeias laterais, como majoritários em algumas esponjas da classe Haplosclerida embasou a criação de uma nova classe Petrosia (Bergquist, 1980). Posteriormente observou-se que nem todas as esponjas da classe Petrosia apresentavam essa característica (Bergquist, Hofheinz e Oesterhelt, 1980; Bergquist, Lavis e Cambie, 1986; Bergquist *et al.*, 1991).

Na tentativa de avaliar um possível efeito de agrupamento taxonômico em função da composição dos esteróis presentes nas esponjas aqui analisadas, foi realizado um agrupamento hierárquico utilizando o software R, versão 3.01. Na análise foi observada a formação de três grupos principais (Figura 78). O gênero *Trochospongilla* destacou-se dos demais com agrupamento dos dois indivíduos da espécie *T. paulula* (Tp01 e Tp02) coletados em diferentes bacias hidrográficas. A característica que difere esta espécie das demais é a presença do colesterol como esterol majoritário.

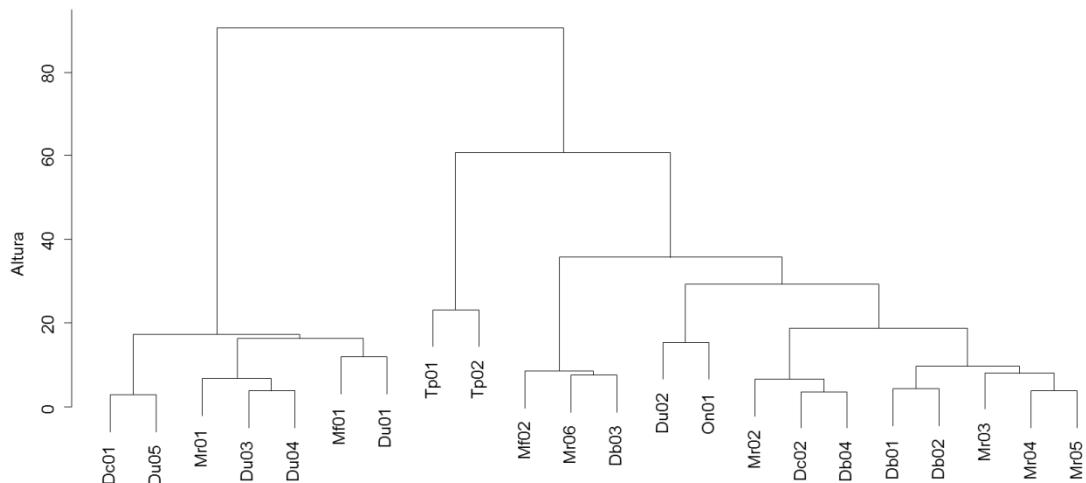


Figura 78: Agrupamento hierárquico das esponjas dulcícidas em função dos esteróis presentes. Db – *Drulia browni*; Dc – *D. cristata*; Du – *D. uruguayensis*; Mf – *Metania fittkaui*; Mr – *M. reticulata*; Oc – *Oncosclera navicella* e Tp – *Trochospongilla paulula*.

Nos grupos maiores não foi possível observar uma separação das espécies estudadas. A evidente dificuldade presente na quimiotaxonomia das esponjas foi explorada em revisão de Epenbeck e van Soest (2007), abordando as dificuldades envolvidas. Embora a substituição

da taxonomia baseada na morfologia das esponjas pela quimiotaxonomia esteja muito distante ainda para as esponjas, informações relevantes podem ser obtidas por análises químicas auxiliando na caracterização dos animais.

Esse resultado indica o 24-etil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol (IV) como um valioso candidato a marcador quimiotaxonômico para a família Metaniidae, e reforça a condição do colesterol como marcador para as famílias Sonpongillidae e Lubomirskiidae. As famílias Malawispongidae, Metschnikowiidae não apresentam estudos químicos registrados na literatura.

Os esteróis encontrados na espécie *Oncosclera navicella* mostram composição semelhante a encontrada nas espécies da família Metaniidae. Como não existem estudos referentes a composição química de esponjas da família Potamolepidae não podemos assumir esse padrão como comum a família.

A predominância de esteróis incomuns, em alguns casos pode ser associada à presença de agentes membranolíticos, funcionando como defesa dos organismos contra seus próprios metabólitos (Zimmerman *et al.*, 1989; Makarieva *et al.*, 1998; Santalova *et al.*, 2004; Aknin *et al.*, 2010), a esta interação entre os metabólitos de diferentes rotas de um mesmo organismo da se o nome de “coordenação bioquímica”.

A capacidade de 11 esponjas marinhas biossintetizar de novo esteróis foi avaliada, através do esqualeno isotopicamente marcado, comprovando a presença desta habilidade. No entanto, todas as espécies avaliadas apresentavam esteróis com instauração na posição 22, nos quais não foi detectada a incorporação do precursor marcado, indicando origem alimentar. Algumas espécies marinhas da ordem Halicondrida possuem grande quantidade de esterois com instauração na cadeia lateral localizadas no C-22, com singularidades e abundancia que sugerem excluir a origem por ingestão, tornando a habilidade de produzir essa particularidade restrita a algumas espécies (Silva e Djerassi, 1992). A presença dos esteróis 24-metil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol (II) e 24-etil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol (IV) entre os majoritários das esponjas dulcícolas encontradas na Amazônia indica que pertencem a esse grupo.

De forma análoga a empregada na identificação dos esteróis, foi possível detectar a presença de três cetosteroides no extrato em hexano das esponjas *Metania reticulata* provenientes do lago Tupé e *Drulia uruguayensis* coletada no arquipélago de Anavilhanas: colesta-4-eno-3-oná (VI), 24-metil-colesta-4,22-dieno-3oná (VII) e 24-etil-colesta-4,22-dieno-3-oná (Figura 79). A presença de cetosteroides em esponjas, anteriores a este estudo, se

restringia aorganismos marinhos (Sheikh e Djerassi, 1974; Migliuolo, Piccialli e Sica, 1990; Santalova *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2012).

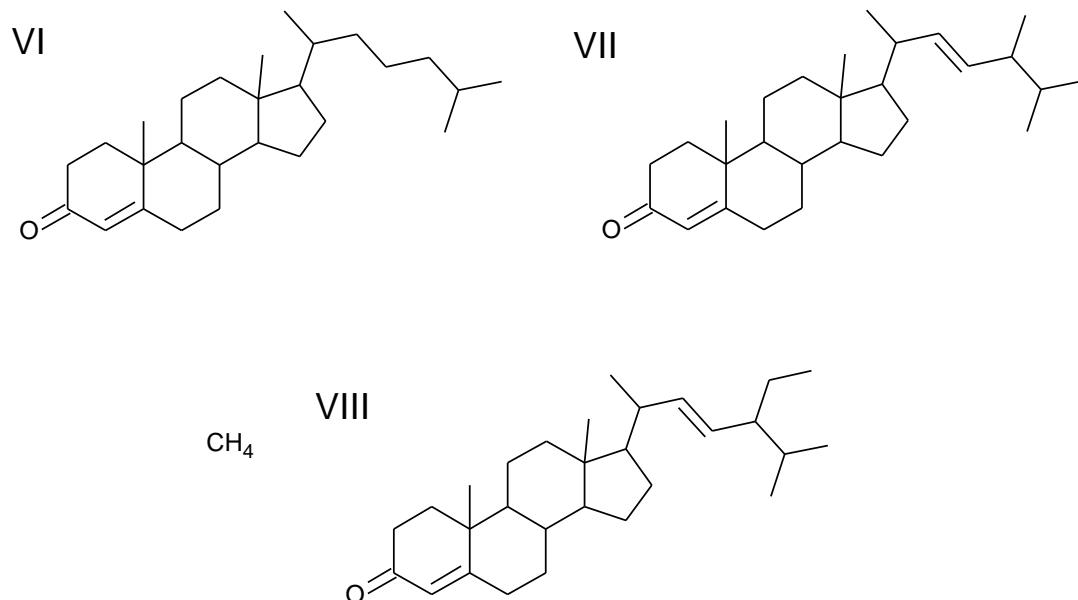


Figura 79: Estrutura dos cetoesteroides detectados: colesta-4-eno-3-ona (VI), 24-metil-colesta-4,22-dieno-3-ona (VII) e 24-etil-colesta-4,22-dieno-3-ona (VIII).

A eliminação da cadeia lateral juntamente com mais três átomos de carbono (Figura 80) é característica para 3-cetosterois (Friedland *et al.*, 1959). Um mecanismo de fragmentação (Figura 81) foi proposto para a 24-metil-colesta-4,22-dieno-3-ona (VII) (Zhou, Zhou e Xiao, 2005).

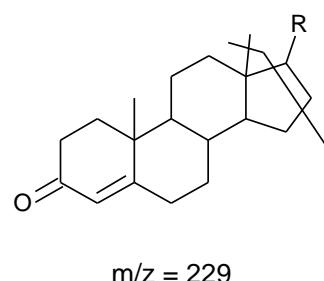


Figura 80: Eliminação da cadeia lateral em conjunto com mais três átomos de carbono para cetoesteroides.

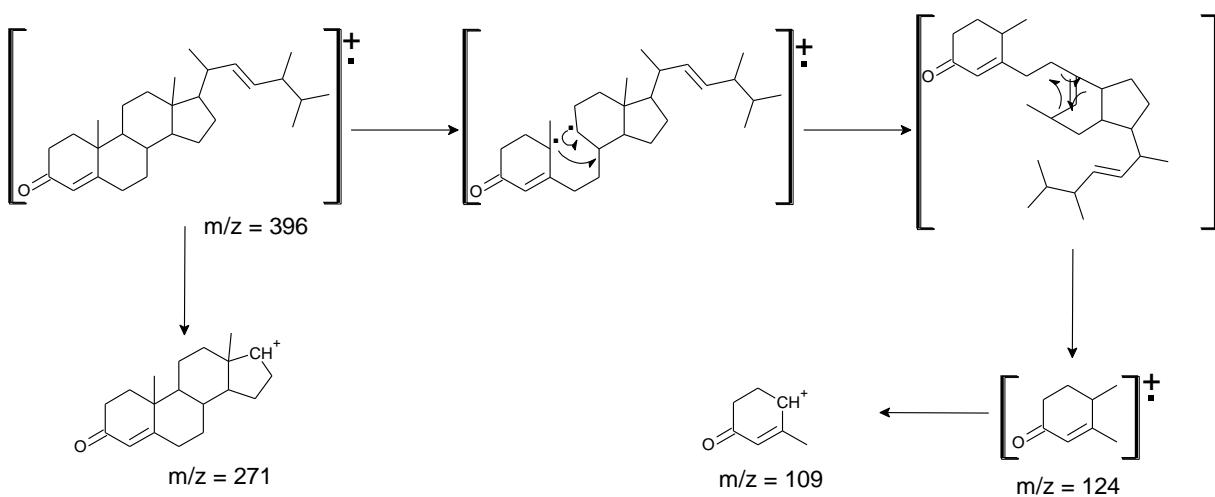


Figura 81: Proposta de fragmentação para a 24-metil-coesta-4,22-dieno-3-ona (VII).

A Tabela 4 resume os valores de m/z dos íons empregados na identificação dos cetosterois.

Tabela 4: Fragmentos característicos observados para identificação dos cetoesteroides.

Cetosteroide	Fragmentos típicos ⁱ
VI $C_{27}\Delta^4$	384, 369, 342, 271, 261, 260, 229, 147, 135, 124
VII $C_{28}\Delta^{4,22}$	396, 353, 298, 283, 271, 269, 253, 245, 229, 149, 55
VIII $C_{29}\Delta^{4,22}$	410, 367, 298, 271, 269, 247, 229, 149, 55

ⁱ - (Sheikh e Djerassi, 1974)

A coesta-4-eno-3-ona (VI) foi detectada na *D. cristata* coletada no Igarapé do Encanto. Já a 24-etil-coesta-4,22-dieno-3-ona (VIII) foi detectada nas amostras de *M. reticulata* coletadas em Anavilhanas e na Praia do Cachorro, nas duas amostras de *D. cristata* analisadas, *D. browni* provenientes de Anavilhanas e baía de Malheiros além da *T. paulula* do Taruacá Velho.

A transformação do colesterol (I) para coprastanol tem o coesta-4-eno-3-ona (VI) como intermediário (Figura 82) para alguns microorganismos (Björkhem e Gustafsson, 1971; Eyssen e Parmentier, 1974; Parmentier e Eyssen, 1974; Ren *et al.*, 1996). Possibilitando sugerir a presença de microrganismos associados a esponjas dulcícolas, fato bastante

documentado para esponjas marinhas. Tanto o colesta-4-eno-3-ona (VI) quanto o 24-metil-colesta-4,22-dieno-3-ona (VII) já foram relatados para a esponja marinha *Stelletta clarella* (Sheikh e Djerassi, 1974).

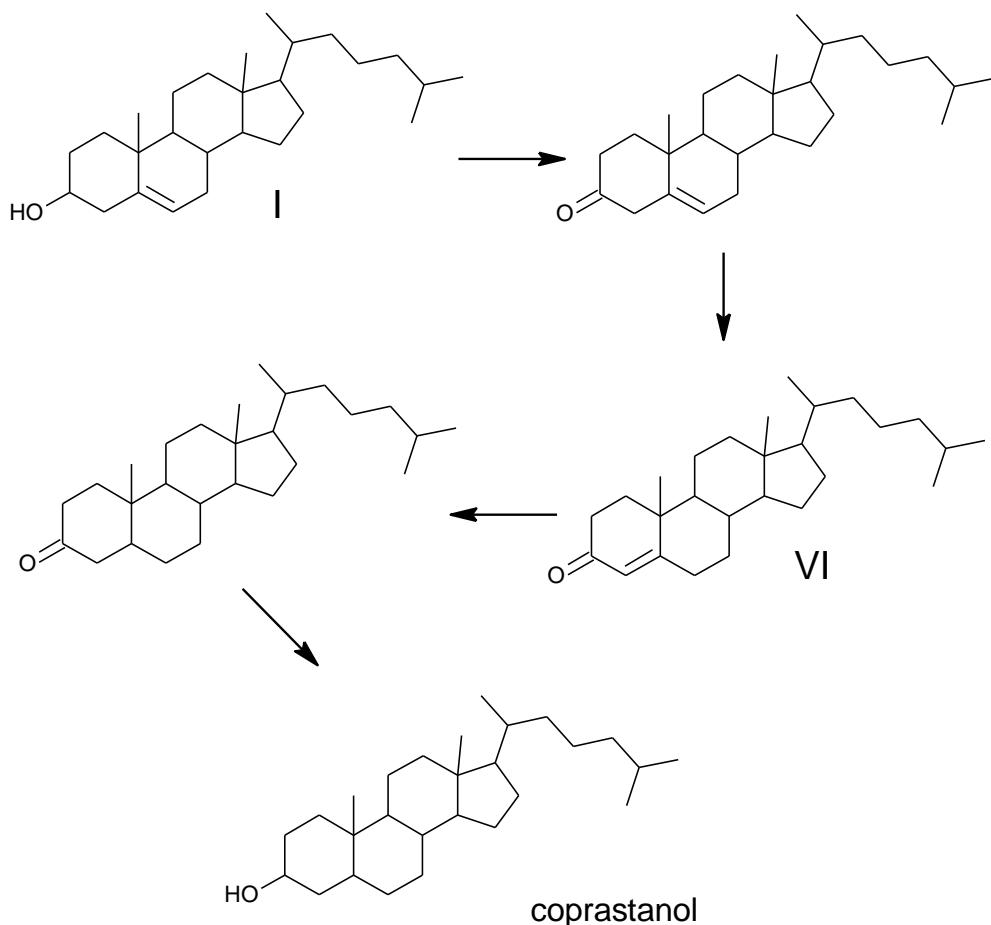


Figura 82: Proposta de rota da transformação do colesterol (I) para coprastanol com a colesta-4-eno-3-ona (VI) como intermediário.

Como as esponjas frequentemente apresentam microorganismos simbiontes, como explorado em revisões recentes (Hentschel *et al.*, 2012; Webster e Taylor, 2012). Desta forma podemos imaginar que estes cetoesteroides encontrados em baixas concentrações podem ser frutos da interação entre as esponja e microrganismos.

5.5. Composição da fração volátil de *Trochospongilla paulula*.

A pesquisa com compostos voláteis está centrada em plantas terrestres nas quais estas substâncias podem exercer diversas funções como atrair ou repelir insetos e alelopática entre outras (Jiang, Ridsdill-Smith e Ghisalberti, 1997; Wang, Ghisalberti e Ridsdill-Smith, 1999; Maffei, Gertsch e Appendino, 2011). Assim como ocorre em terra, a comunicação entre organismos aquáticos pode ocorrer através de substâncias voláteis (Whittaker e Feeny, 1971).

A comunicação entre organismos aquáticos através de compostos voláteis é documentada para diversos organismos (Akakabe e Kajiwara, 2008; Jüttner *et al.*, 2010). Para esponjas são propostos mecanismos de interação ecológica através de aleloquímicos exsudados (Jackson e Buss, 1975; Sullivan, Faulkner e Webb, 1983). Não há registros de estudos de compostos voláteis para esponjas dulcícolas.

A análise dos compostos voláteis da esponja marinha *Ircinia felix* permitiu a identificação de 59 compostos, além de atribuir à presença de: tiobismetano, isocetonitrila e metil isotiocianato o cheiro nauseante deste animal (Duque *et al.*, 2001). Os autores também atribuíram a estas substâncias propriedades de proteção química para esta espécie. No entanto, posteriormente foi demonstrado que os verdadeiros responsáveis pela proteção contra a predação destes organismos são os ácidos furanosesterpeno tetrônicos presentes em elevadas concentrações (Pawlik, Mcfall e Zea, 2002).

O SDE é um método que proporciona alta recuperação para amplo conjunto de substâncias (Chaintreau, 2001). Em estudo com esponjas marinhas do gênero *Plakortis* foram observados rendimentos entre 0,5 e 0,6% na obtenção de compostos voláteis empregando essa técnica (Roussis *et al.*, 1995). No presente estudo, que também utilizou o SDE, foi observado um rendimento do óleo volátil da esponja dulcícola *T. paulula* bastante baixo, inferior a 0,1%. Rendimentos baixos também são relatados para algumas plantas como as partes aéreas de *Stachys recta* L. para as quais é relatado o rendimento de 0,014% (Chalchat *et al.*, 2000).

O baixo rendimento obtido, em um primeiro momento inviabilizou a identificação dos componentes da fração em função da baixa intensidade dos picos observados no cromatograma obtido da mesma (Figura 83).

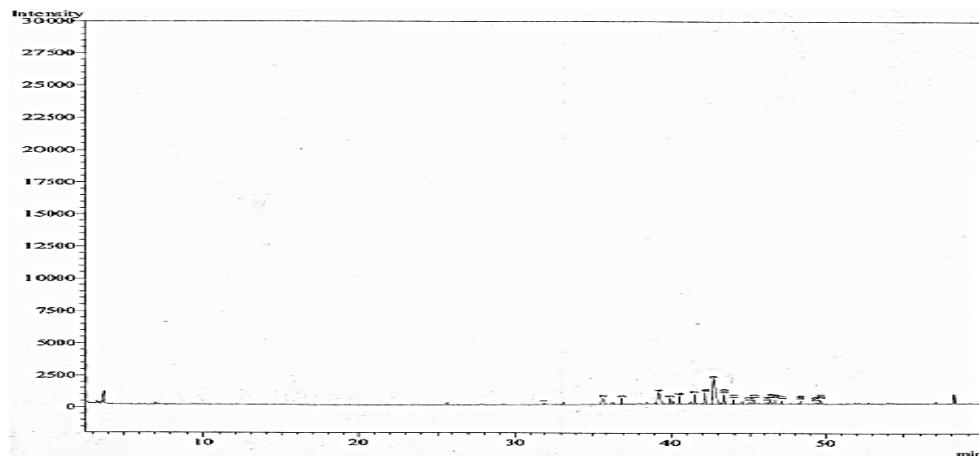


Figura 83: Cromatograma obtido para a fração volátil da esponja *Trochospongilla paulula*.

Com o intuito de possibilitar essa análise foi empregado um inserte (Figura 84) que reduzia o volume do vial para 250 μ L, possibilitando o aumento da concentração da amostra permitindo a obtenção de um cromatograma (Figura 85) com picos melhor definidos e a identificação dos voláteis da esponja *Trochospongilla paulula*.



Figura 84: Inserte empregado para aumentar a concentração da fração volátil de *Trochospongilla paulula* para analise por cromatografia em fase gasosa.

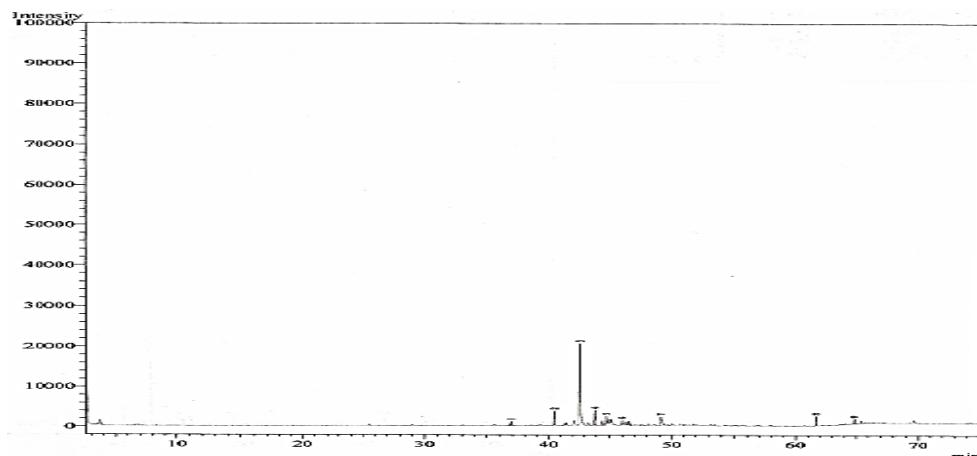


Figura 85: Cromatograma obtido, empregando o inserte, para a fração volátil da esponja *Trochospongilla paulula*.

Foi possível identificar sete substâncias voláteis na esponja *T. paulula*, representando 69,71% de sua composição (Tabela 5). Esse percentual é próximo (e até superior) ao observado em estudos similares realizados com esponjas marinhas. Para as espécies marinhas *Plakortis angulospiculatus* e *P. lita* os percentuais de substâncias identificadas dos óleos voláteis foram de 37,56% e 66,36%, respectivamente (Roussis *et al.*, 1995). Já para espécie *Siphonodictyon coralliphagum* foram identificados 99,61% da composição de seus voláteis (Mishra, P M e Sree, A, 2009b). Enquanto que na espécie *Geodia cydonium* foram identificados 85,5%. Em um trabalho que avaliou os voláteis de esponjas do gênero *Tednia* sem espécie definida foram identificados entre 39,8 e 71,4% dos compostos (De Rosa *et al.*, 2008).

Tabela 5: Composição da fração volátil de *Trochospongilla paulula*.

Substancia	Indice de retenção experimental	referencia ^a	Concentração (%)
tetradecanol	1675	1671	6,28
tetradecanal	1712		1,30
pentadecanol	1775		14,22
hexadecanal	1813	1819	2,15
ácido pentadecanoico	1865		5,02
hexadecanol	1879	1874	31,15
ácido hexadecanoico	1960	1959	9,30

^a - (Adams, 2009)

O composto majoritário encontrado na fração, o hexadecanol, corresponde a 31,15% da fração, e, somado aos dois outros álcoois presentes, totalizam 51,65%. Resultado similar foi relatado para um dos espécimes de esponjas marinhas do gênero *Phycopsis*, no qual o dodecanol aparece como majoritário entre seus voláteis, representando 29,39% de sua composição. No entanto, em outro espécime do mesmo gênero não foram detectado álcoois (Mishra, P. M. e Sree, A., 2009a). Outros estudos de compostos voláteis de esponjas marinhas relatam a presença de álcoois, muitas vezes aromáticos, como componentes minoritários (Nechev, *et al.*, 2002a; 2002b; De Rosa *et al.*, 2003; Nechev *et al.*, 2004; Mishra, P M e Sree, A, 2009b).

Dois ácidos graxos de cadeia linear saturada foram identificados, os ácidos pentadecanóico (5,02%) e hexadecanóico (9,30%). Tais substâncias já foram relatadas na fração volátil de esponjas marinhas (Nechev, *et al.*, 2002a; 2002b). A presença de ácidos graxos livres é associada à degradação de lipídios. No entanto, a forma de extração branda empregada do SDE não é associada à produção de artefatos.

Ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbono são associados à presença de bactérias (Řezanka e Sigler, 2009). A associação de esponjas com microrganismos é bastante documentada (Taylor *et al.*, 2007; Piel, 2009; Webster e Taylor, 2012), inclusive em ambientes dulcícolas (Parfenova *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2013). Outra justificativa para a presença de metabólitos de bactérias nas esponjas, é que ao filtrar a água, esses microrganismos são absorvidos como alimento (Wilkinson, Garrone e Vacelet, 1984; Leys *et al.*, 2011).

5.6. Ensaio Biológicos e Enzimáticos.

5.6.1. Atividade antimicrobiana

Os extratos obtidos em hexano, acetato de etila e metanol de esponjas pertencentes às espécies *Metania reticulata*, *Drulia uruguayensis*, *Drulia browni* e *Trochospongilla paulula* foram avaliadas quanto a sua atividade antimicrobiana frente sete espécies de bactérias gram-positivas: *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* (ATCC 6051), *Listeria monocytogenes* (ATCC

15313), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591), *Streptococcus oralis* (ATCC 10557), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 12344) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 14506); e três espécies de bactérias gram-negativas: *Escherichia coli* (CDC EDL-933), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (ATCC 13076) e *Shigella flexneri* (ATCC 12022), por difusão em ágar.

Não foi possível observar a formação de halo de inibição por nenhuma das amostras ensaiadas, caracterizando ausência de atividade inibitória.

5.6.2. Atividade antiproliferativa.

Extratos obtidos de esponjas das espécies *Metania reticulata*, *M. fitikai*, *Drulia cristata*, *D. uruguensis* e *D. browni* foram avaliados quanto às suas atividades citotóxicas frente a linhagens celulares tumorais: HCT-8 (cólon - humano), MDA/MB-435 (melanoma - humano) e SF-295 (glioblastoma - humano). Apenas as amostras com valores de inibição $\geq 90\%$ em pelo menos duas linhagens tumorais são consideradas com elevado potencial citotóxico e conduzida para avaliações subsequentes, sendo considerado o valor de corte para varredura de novas substâncias com potencial antitumoral.

Entre as amostras avaliadas (Tabela 6) destaca-se o extrato em acetato de etila de *Metania reticulata*, sendo que foram avaliados os extratos desta espécie provenientes de dois locais distintos de coleta, Anavilhanas e lago Tupé, ambos no rio Negro, com maior atividade citotóxica frente as linhagens celulares avaliadas, embora não tenha atingido o valor de corte.

Tabela 6: Percentual de inibição do crescimento celular (IC%) das amostras em três linhagens tumorais. Os valores apresentados são média \pm desvio padrão.

Amostra	Linhagem celular		
	HCT-8 (%)	MDA/MB-435 (%)	SF-295 (%)
<i>M.. reticulata</i> – Lago Tupé			
Hexano	21,96 \pm 0,98	-20,68 \pm 3,56	2,17 \pm 14,62
Acetato de etila	58,09 \pm 2,33	53,76 \pm 3,43	56,34 \pm 8,56
Metanol	15,53 \pm 2,51	10,59 \pm 1,06	23,26 \pm 16,92
<i>M. reticulata</i> – Anavilhanas			
Hexano	3,92 \pm 5,56	-35,58 \pm 7,73	-0,01 \pm 5,80
Acetato de etila	84,74 \pm 5,61	89,38 \pm 3,82	75,69 \pm 5,14
Metanol	56,38 \pm 9,49	70,90 \pm 18,93	21,81 \pm 23,73
<i>M. fitikaui</i> Igarapé do Encanto			
Hexano	18,78 \pm 4,29	-17,15 \pm 0,57	22,01 \pm 7,32
Acetato de etila	19,39 \pm 7,59	-19,52 \pm 4,58	19,98 \pm 2,35
Metanol	31,77 \pm 0,98	83,24 \pm 6,87	32,96 \pm 6,73
<i>D. cristata</i> – Igarapé do Encanto			
Hexano	12,63 \pm 11,27	-5,30 \pm 7,19	16,47 \pm 0,00
Acetato de etila	35,58 \pm 4,53	-0,62 \pm 1,72	22,75 \pm 1,18
Metanol	5,88 \pm 15,18	8,86 \pm 8,58	15,27 \pm 24,44
<i>D. cristata</i> – Lago do Juá			
Hexano	20,65 \pm 1,33	-10,81 \pm 0,98	6,22 \pm 26,52
Diclorometano	29,13 \pm 5,32	-12,57 \pm 12,71	10,74 \pm 14,84
Acetato de etila	15,21 \pm 1,39	-23,51 \pm 6,67	-17,21 \pm 2,35
<i>D. uruguayensis</i> Igarapé do Encanto			
Hexano	-32,14 \pm 1,47	-45,82 \pm 26,24	4,92 \pm 10,85
Acetato de etila	4,97 \pm 7,53	-21,43 \pm 6,13	6,31 \pm 19,73
Metanol	20,60 \pm 13,46	-0,46 \pm 7,86	19,72 \pm 1,88
<i>D. brownii</i> – Lago Janauari			
Hexano	17,59 \pm 0,23	-6,79 \pm 2,40	-1,99 \pm 20,50
Acetato de etila	-4,69 \pm 2,33	-17,09 \pm 5,88	8,48 \pm 2,03
Metanol	22,03 \pm 0,80	-27,09 \pm 43,07	3,16 \pm 11,24
<i>D. brownii</i> – Anavilhanas			
Hexano	12,84 \pm 1,74	-17,22 \pm 21,07	7,99 \pm 7,71
Acetato de etila	39,36 \pm 1,16	28,47 \pm 0,71	40,93 \pm 9,92
Metanol	23,27 \pm 0,29	-9,81 \pm 11,47	24,67 \pm 3,67

5.6.3. Ensaio de edema da pata de rato induzida por carragenina.

Foi realizado o ensaio de hipernocicepção térmica induzida em ratos pela administração subplantar de carragenina com os extratos obtidos em metanol das espécies *Metania reticulata* e *Drulia uruguayensis* coletadas no arquipélago de Anavilhas. Os extratos foram administrados por via oral na dose de $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ uma hora antes da administração subplantar do agente inflamatório carragenina 1% (0,1 ml por pata). Foi medida a formação do edema analisando-se a variação do volume das patas que receberam carragenina e das patas contralaterais (Figura 86). Para a avaliação da hiperalgesia térmica os mesmos animais foram colocados sobre uma placa aquecida a 51°C e cronometrou-se o tempo que os mesmos suportavam este estímulo térmico (Figura 87). Não foram observadas atividades nos extratos avaliados.

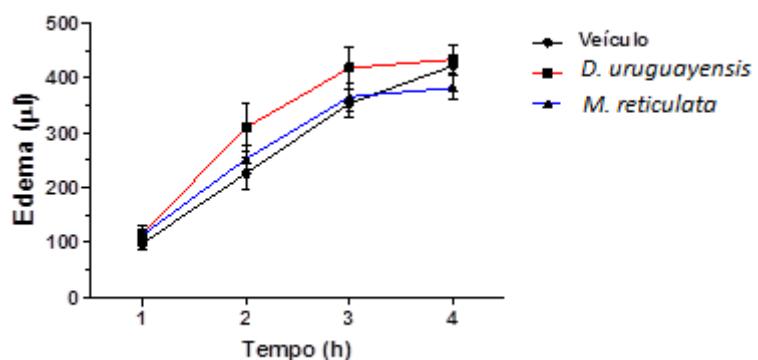


Figura 86: Variação de volume entre as patas que receberam administração subplantar de carragenina 1% (0,1 ml por pata) e salina em função do tempo.

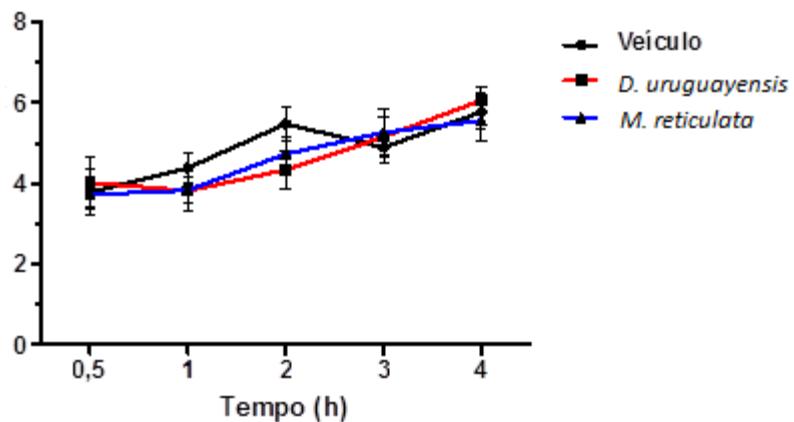


Figura 87: Variação de latência entre as patas que receberam administração de carragenina e salina quando submetidas ao estímulo térmico de 51°C.

5.6.4. Atividade inibitória da enzima tirosinase.

Extratos obtidos em hexano, acetato de etila e metanol de esponjas das espécies *Metania reticulata*, *M. fitikai*, *Drulia cristata*, *D. uruguensis* e *D. browni* foram avaliados quanto a atividade inibitória da enzima tirosinase porém todos apresentaram concentração inibitória mínima de 50% (CI_{50}) superior a $1.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo consideradas inativas.

As frações esteroídicas obtidas dos extratos em hexano das espécies *Metania reticulata*, *D. uruguensis* e *Trochospongila paulula* também foram avaliadas quanto sua capacidade de inibir a enzima tirosinase (Tabela 7), porém não foram observadas atividades significativas.

Tabela 7: Atividade de inibição da enzima tirosinase de frações esteroídicas de extratos em hexane de esponjas dulcicolas (% inibição a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Amostra	% inibição da enzima tirosinase
<i>M. reticulata</i> (Anavilhanas)	$5,25 \pm 1,20$
<i>D. uruguensis</i> (Anavilhanas)	$2,18 \pm 2,00$
<i>D. uruguensis</i> (Porto de Manaus)	$8,60 \pm 2,32$
<i>T. paulula</i> (Alter do chão)	$7,29 \pm 2,97$
Ácido kójico	$77,60 \pm 2,26$

6. CONCLUSÕES

As esponjas pertencentes à família Metaniidae, com destaque aos gêneros *Drulia* e *Metania*, são abundantes nos rios da Amazônia. As famílias Spongillidae e Potamolepidae, relatadas também para a região neotropical, foram encontradas frequentemente, porém, na maioria das vezes, com espécimes de tamanho reduzido e bastante delicado.

O levantamento da espongofauna do arquipélago de Anavilhanas permitiu a identificação de cenário semelhante ao relatado para a Reserva Sustentável Tupé, também situada no rio Negro. É notável a predominância da espécie *Metania reticulata* aderida à vegetação nas áreas mais elevadas sujeitas aos pulsos de inundação, e da espécie *Drulia uruguayensis* no solo. Em algumas regiões a presença das esponjas caracterizava o que chamamos “cauxizal”, em alusão ao nome vulgar das esponjas dulcícidas na região, “cauxi”. Esse mesmo cenário foi encontrado nos outros pontos de coleta nos rios de águas pretas. No rio Juruá (água branca) e Tapajós (água clara) foram encontrados espécimes das famílias Spongillidae e Potamolepidae de tamanho significativo, sendo este um diferencial nestes ambientes.

O estudo da composição inorgânica das esponjas dulcícidas sugere uma capacidade seletiva de acúmulo de metais por estes organismos. Exemplo evidente dessa característica é o alumínio que não foi detectado nas esponjas do gênero *Metania*, enquanto que nas esponjas do gênero *Drulia*, é o segundo elemento mais abundante. Nos outros gêneros estudados, *Trochospongilla* (Spongillidae) e *Oncosclera* (Potamolepidae), o alumínio também foi detectado. O silício, componente majoritário das espículas, representa em *M. reticulata* 36,27 ± 6,02% da massa das esponjas secas. Nas demais amostras analisadas da mesma espécie e em *M. fitikauui*, *D. cristata*, *D. uruguayensis*, *D. browni*, *Trochospongilla paulula* e *Oncosclera navicella* essa concentração ficou neste mesmo intervalo.

A ausência de alumínio nas esponjas do gênero *Metania*, é uma característica que as diferencia de todos os outros gêneros estudados e também da literatura. A espécie *Trochospongilla paulula* também mostrou a capacidade de acumular vanádio, podendo indicar a presença do elemento no habitat.

A purificação da sílica presente nas espículas das esponjas, através de soluções oxidantes e calcinação, possibilitou a obtenção de um material amorfo e com composição

semelhante à sílica empregada comercialmente como suporte para cromatografia líquida que pode representar um recurso a ser explorado.

O extrato em hexano permitiu a identificação de cinco esteróis majoritários em todas as amostras analisadas. A constatação do colesterol como majoritário na única espécie da família Spongillidae avaliada, *Trochospongilla paulula*, coincidiu com estudos de esponjas desta família registrados na literatura. Entretanto nas espécies da família Metaniidae avaliadas o 24-etil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol foi o esterol majoritário, sugerindo a utilização deste padrão como marcador quimiotaxonômico para a família. Para a única espécie da família Potamolepidae estudada, *Oncosclera navicella*, o 24-etil-colesta-5,22-dieno-3 β -ol também foi majoritário, no entanto a inexistência de referências bibliográficas para a espécie não permite comparações.

Foram detectadas três cetonas, colesta-4-eno-3-oná, 24-metil-colesta-4,22-dieno-3-oná e 24-etil-colesta-4,22-dieno-3-oná, em esponjas das espécies *Metania reticulata*, *Drulia uruguayensis*. Nas espécies *D. cristata*, *D browni* e *Trochospongilla paulula* também foi possível detectar ao menos uma destas cetonas. Sendo esta a primeira vez que cetonas são detectadas em esponjas dulcícolas.

Os ensaios de atividade antimicrobiana, antiproliferativa, antiinflamatória e inibição da enzima tirosinase não identificaram nenhuma atividade positiva.

Estabelecer uma metodologia para obter sílica de alto grau de pureza a partir das esponjas, pode representar uma nova riqueza a ser explorada na Amazônia. Além disso, os resultados aqui obtidos para a composição elementar e esteróis presentes nas esponjas dulcícolas da Amazônia, representam valiosas informações quimiotaxonômicas para espécies do filo Porifera. Indicam características específicas para diferentes níveis taxonômicos, permitindo estabelecer relações com esponjas de outros biomas.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MOHDY, F. A. et al. Rice straw as a new resource for some beneficial uses. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 1, p. 44-51, 2009.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4 ed. Illinois: Allured Business Media, 2009. 804.
- AICHER, T. D. et al. Total synthesis of halichondrin B and norhalichondrin B. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 8, p. 3162-3164, 1992.
- AJIKUMAR, P. K. et al. Terpenoids: Opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p. 167-190, 2008.
- AKAKABE, Y.; KAJIWARA, T. Bioactive volatile compounds from marine algae: feeding attractants. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, n. 5, p. 661-664, 2008.
- AKNIN, M. et al. Sterols from the madagascar sponge *Fascaplysinopsis* sp. **Marine Drugs**, v. 8, n. 12, p. 2961-2975, 2010.
- ALMEIDA, A. C. S. et al. Characterization and origin of spongillite-hosting sediment from João Pinheiro, Minas Gerais, Brazil. **Journal of South American Earth Sciences**, v. 29, n. 2, p. 439-453, 2010.
- _____. Domínios geomorfológicos na área de ocorrência dos depósitos de espongilito da região de João Pinheiro, Minas Gerais, Brasil. **Rem: Revista Escola de Minas**, v. 64, n. 3, p. 299-304, 2011.
- ALMEIDA-FILHO, R.; MIRANDA, F. P. Mega capture of the Rio Negro and formation of the Anavilhanas Archipelago, Central Amazônia, Brazil: Evidences in an SRTM digital elevation model. **Remote Sensing of Environment**, v. 110, n. 3, p. 387-392, 2007.

ALVAREZ, J. G. Clinical and Pharmaceutical Applications of Gas Chromatography. In: GROB, R. L. e BARRY, E. F. (Ed.). **Modern practice of gas chromatography**. 4 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. cap. 14, p.739-768.

AMIRKHIZ, B. S. et al. Synergy of elemental Fe and Ti promoting low temperature hydrogen sorption cycling of magnesium. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 11, p. 6711-6722, 2011.

AMMENDOLA, P. et al. Effect of sulphur on the performance of Rh–LaCoO₃ based catalyst for tar conversion to syngas. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 113–114, p. 11-18, 2012.

ANDRÁSI, N. et al. Derivatization and fragmentation pattern analysis of natural and synthetic steroids, as their trimethylsilyl (oxime) ether derivatives by gas chromatography mass spectrometry: Analysis of dissolved steroids in wastewater samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 14, p. 1878-1890, 2011.

ARAÚJO, M. F. et al. Elemental composition of marine sponges from the Berlengas natural park, western Portuguese coast. **X-Ray Spectrometry**, v. 32, n. 6, p. 428-433, 2003.

AUCOUR, A. M. et al. The Amazon River: Behaviour of metals (Fe, Al, Mn) and dissolved organic matter in the initial mixing at the Rio Negro/Solimões confluence. **Chemical Geology**, v. 197, n. 1-4, p. 271-285, 2003.

AUSTAD, B. C. et al. Commercial Manufacture of Halaven®: Chemoselective Transformations En Route to Structurally Complex Macrocyclic Ketones. **Synlett**, v. 24, n. 03, p. 333-337, 2013.

BATISTA, T. C. A. et al. Freshwater sponges as indicators of floodplain lake environments and of river rocky bottoms in Central Amazonia. **Amazoniana**, v. 17, n. 3-4, p. 525-549, 2003.

BAVESTRELLO, G. et al. Body Polarity and Mineral Selectivity in the Demosponge *Chondrosia reniformis*. **The Biological Bulletin**, v. 195, n. 2, p. 120-125, 1998.

BELL, J. J. The functional roles of marine sponges. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 79, n. 3, p. 341-353, 2008.

BENNETT, C. F. et al. Differential effects of manoalide on secreted and intracellular phospholipases. **Biochemical Pharmacology**, v. 36, n. 5, p. 733-740, 1987.

BERGMANN, W.; FEENEY, R. J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges I. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 981-987, 1951.

BERGQUIST, P. R. The ordinal and subclass classification of the Demospongiae (Porifera); appraisal of the present arrangement, and proposal of a new order. **New Zealand Journal of Zoology**, v. 7, n. 1, p. 1-6, 1980.

BERGQUIST, P. R.; HOFHEINZ, W.; OESTERHELT, G. Sterol Composition and the Classification of the Demospongiae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 8, n. 4, p. 423-435, 1980.

BERGQUIST, P. R. et al. Sterol composition and classification of the Porifera. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 19, n. 1, p. 17-24, 1991.

BERGQUIST, P. R.; LAVIS, A.; CAMBIE, R. C. Sterol composition and classification of the Porifera. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 14, n. 1, p. 105-112, 1986.

BJÖRKHEM, I.; GUSTAFSSON, J.-Å. Mechanism of microbial transformation of cholesterol into coprostanol. **European Journal of Biochemistry**, v. 21, n. 3, p. 428-432, 1971.

BJÖRNSTRÖM, J. et al. Signatures of a drying $\text{SiO}_2\cdot(\text{H}_2\text{O})_x$ gel from Raman spectroscopy and quantum chemistry. **Chemical Physics Letters**, v. 380, n. 1-2, p. 165-172, 2003.

BLAU, K. Acylation. In: BLAU, K. e HALKET, J. M. (Ed.). **Handbook of derivatives for Chromatography**. 2 ed. Chichester: John Wiley & Sons, 1993. cap. 3, p.31-50.

BLUNT, J. W. et al.. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 2, p. 196-268, 2011.

_____. Marine natural products. **Natural Products Reports**, v. 29, n. 1, p. 144-222, 2012.

_____. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 2, p. 237-323, 2013.

BONATO, P. S. Cromatografia Gasosa. In: COLLINS, C. H.;BRAGA, G. L., *et al* (Ed.). **Fundamentos de Cromatografia**. 1 ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006. cap. 8, p.203-272.

BOWEN, H. J. M. The uptake of gold by marine sponges. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 48, n. 2, p. 275-277, 1968.

BRASIER, M.; GREEN, O.; SHIELDS, G. Ediacaran sponge spicule clusters from southwestern Mongolia and the origins of the Cambrian fauna. **Geology**, v. 25, n. 4, p. 303-306, 1997.

BRAZIL, T. P. S. Caucy. In: (Ed.). **Relatório apresentado ao ministério das relações exteriores em 1936 pelo chefe da comissão demarcadora de limites do serviço de oeste**, 1938. p.11-23.

BRETTELL, T. A. Forensic Science Applications of Gas Chromatography. In: GROB, R. L. e BARRY, E. F. (Ed.). **Modern practice of gas chromatography**. 4 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. cap. 16, p.883-968.

BRINGEL, S. R. B. et al. Bacia do Rio Parauari-Maués-Açu. Aspectos Químicos Devidos as Alterações Hidrológicas da Bacia. **Acta Amazonica**, v. 14, n. 1-2, p. 77-85, 1984.

BROWN, A. S. C.; HARGREAVES, J. S. J.; RIJNERSCE, B. A study of the structural and catalytic effects of sulfation on iron oxide catalysts prepared from goethite and ferrihydrite precursors for methane oxidation. **Catalysis Letters**, v. 53, n. 1-2, p. 7-13, 1998.

BULUSHEV, D. A. et al. Effect of potassium doping on the structural and catalytic properties of V/Ti-oxide in selective toluene oxidation. **Applied Catalysis A: General**, v. 202, n. 2, p. 243-250, 2000.

BURGOYNE, D. L.; ANDERSEN, R. J.; ALLEN, T. M. Contignasterol, a highly oxygenated steroid with the unnatural 14. β . configuration from the marine sponge *Petrosia contignata* Thiele, 1899. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 525-528, 1992.

CÂNDIDO, J. L.; VOLKMER-RIBEIRO, C.; FÜRSTENAU-OLIVEIRA, K. Dosilia (Porifera, Demospongiae) redefined. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 100, p. 425-448, 2010.

CAPON, R. J.; MACLEOD, J. K.; WILLIS, A. C. Trunculins A and B, norsesterterpene cyclic peroxides from a marine sponge, *Latrunculia brevis*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 339-342, 1987.

CAPON, R. J.; TROTTER, N. S. N³,5'-Cycloanthosine, the first natural occurrence of a cyclonucleoside. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 11, p. 1689-1691, 2005.

CARBALLEIRA, N.; MALDONADO, L.; PORRAS, B. Isoprenoid fatty acids from marine sponges. Are sponges selective? **Lipids**, v. 22, n. 10, p. 767-769, 1987.

CARMELY, S.; KASHMAN, Y. Neviotine-A, a new triterpene from the red sea sponge *Siphonochalina siphonella*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 51, n. 6, p. 784-788, 1986.

CASSIDY, M. P. et al. New Tricyclic Diterpenes from the Sponge *Higginsia* sp. **Australian Journal of Chemistry**, v. 38, n. 8, p. 1187-1195, 1985.

CASTELLANOS, L. et al. Phylogenetic analysis of the order Halichondrida (Porifera, Demospongiae), using 3 β -hydroxysterols as chemical characters. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 10, p. 1163-1183, 2003.

CEBRIAN, E. et al. Sublethal effects of contamination on the Mediterranean sponge *Crambe crambe*: metal accumulation and biological responses. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, n. 10, p. 1273-1284, 2003.

CERRANO, C. et al. How and why do sponges incorporate foreign material ? Strategies in Porifera. In: CUSTÓDIO, M. R.; LÔBO-HAJDU, G., et al (Ed.). **Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability**, 2007. p.239-246.

CHA, J. N. et al. Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 2, p. 361-365, 1999.

CHAINTREAU, A. Simultaneous distillation-extraction: from birth to maturity—review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, n. 2, p. 136-148, 2001.

CHALCHAT, J.-C. et al. Essential Oil of the Herb of *Stachys recta* L., Lamiaceae from Serbia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, n. 4, p. 455-458, 2000.

CHO, J.-H.; DJERASSI, C. Sterols in marine invertebrates. Part 57. Stereostructure, synthesis, and acid-catalysed isomerization of hebesterol-a biosynthetically significant cyclopropyl-containing marine sterol. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 1307-1318, 1987.

CLARKE, H. T.; MAZUR, A. The lipids of diatoms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 283-289, 1941.

COLLINS, C. H. Princípio Básico de Cromatografia. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L., et al (Ed.). **Fundamentos de Cromatografia**. 1 ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006. cap. 1, p.17-46.

CORTES, J.; LORCA, R. Eribulin mesylate: a promising new antineoplastic agent for locally advanced or metastatic breast cancer. **Future Oncology**, v. 7, n. 3, p. 355-364, 2011.

COSTA, M. L. D. et al. The ceramic artifacts in archaeological black earth (terra preta) from lower Amazon region, Brazil: Mineralogy. **Acta Amazonica**, v. 34, n. 2, p. 165-178, 2004.

COSTA, R. et al. Evidence for Selective Bacterial Community Structuring in the Freshwater Sponge *Ephydatia fluviatilis*. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 1, p. 232-244, 2013.

COZZOLINO, R. et al. Biological Activities of Avarol Derivatives, 1. Amino Derivatives. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 3, p. 699-702, 1990.

CROSTON, D. L.; GRANT, D. M.; WALKER, G. S. The catalytic effect of titanium oxide based additives on the dehydrogenation and hydrogenation of milled MgH₂. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 492, n. 1–2, p. 251-258, 2010.

CURSINO, L. M. C. et al. Antibacterial activity of *Minquartia guianensis* extracts and phytochemical evaluation. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 23, n. 6, p. 505 - 510, 2011.

D'IPPOLITO, G. et al. Detection of short-chain aldehydes in marine organisms: the diatom *Thalassiosira rotula*. **Tetrahedron Letters**, v. 43, n. 35, p. 6137-6140, 2002.

_____. New birth-control aldehydes from the marine diatom *Skeletonema costatum*: characterization and biogenesis. **Tetrahedron Letters**, v. 43, n. 35, p. 6133-6136, 2002.

DA SILVA JR, J. et al. Obtaining high purity silica from rice hulls. **Química Nova**, v. 33, n. 4, p. 794-797, 2010.

DE LIMA, S. P. B. et al. Production of silica gel from residual rice husk ash. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 71-75, 2011.

DE ROSA, S. et al. Volatile and polar compounds from *Geodia cydonium* and two *Tedania* species. **Bulgarian Chemical Communications**, v. 40, n. 1, p. 48-53, 2008.

_____. Composition of the lipophilic extract from the sponge *Suberites domuncula*. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 68, n. 4-5, p. 249-256, 2003.

DE SILVA, E. D. et al. Neamphine, a sulfur containing aromatic heterocycle isolated from the marine sponge *Neamphius huxleyi*. **Tetrahedron Letters**, v. 32, n. 24, p. 2707-2710, 1991.

DE SILVA, E. D.; SCHEUER, P. J. Manoalide, an antibiotic sesterterpenoid from the marine sponge *Luffariella variabilis* (Polejæff). **Tetrahedron Letters**, v. 21, n. 17, p. 1611-1614, 1980.

DELLA, V. P. et al. Comparative study of silica obtained from acid leaching of rice husk and the silica obtained by thermal treatment of rice husk ash. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1175-1179, 2006.

DEMBITSKY, V. M. Fatty acids composition of class Demospongiae freshwater sponges. II. Genera *Swartchewskia* and *Baicalospongia*. **Khim. Prirod. Soed. (USSR)**, v. 4, p. 513-515, 1981.

DEMBITSKY, V. M.; KASHIN, A. G.; KARAGANOVA, M. V. Phospholipid and fatty acid composition of the freshwater sponge *Euspongilla lacustris* from the volga river estuary. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 100, n. 1, p. 185-187, 1991.

DEMBITSKY, V. M.; REZANKA, T. Unusually high levels of eicosatetraenoic, eicosapentaenoic, and docosahexaenoic fatty acids in Palestinian freshwater sponges. **Lipids**, v. 31, n. 6, p. 647-650, 1996.

DEMBITSKY, V. M.; REZANKA, T.; KASHIN, A. G. Comparative study of the endemic freshwater fauna of Lake Baikal - II. Unusual lipid composition of two sponge species *Baicalospongia bacillifera* and *Baicalospongia intermedia* (family Lubomirskiidae, class Demospongiae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 106, n. 4, p. 825-831, 1993.

_____. Comparative study of the endemic freshwater fauna of Lake Baikal - VI. Unusual fatty acid and lipid composition of the endemic sponge *Lubomirskia baicalensis* and its

amphipod crustacean parasite *Brandtia (Spinacanthus) parasitica*. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 109, n. 2-3, p. 415-426, 1994.

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

DEVRIESE, L. A. et al. Pharmacokinetics of eribulin mesylate in patients with solid tumors and hepatic impairment. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 70, n. 6, p. 823-832, 2012.

DJERASSI, C.; SILVA, C. J. Sponge sterols: Origin and biosynthesis. **Accounts of Chemical Research**, v. 24, n. 12, p. 371-378, 1991.

DOBSON, G.; CHRISTIE, W. W. Spectroscopy and spectrometry of lipids — Part 2, Mass spectrometry of fatty acid derivatives. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 104, n. 1, p. 36-36, 2002.

DOŁOWY, M. Separation of Selected Bile Acids by TLC. IX. Separation on Silica Gel 60 and on Silica Gel 60F₂₅₄ Aluminum Plates Impregnated with Cu(II), Ni(II), Fe(II), and Mn(II) Cations. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, n. 3, p. 405-418, 2007.

DOUGLAS, A. G.; POWELL, T. G. The rapid separation of fatty acids from fossil lipids by impregnated adsorbent thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 43, p. 241-246, 1969.

DOŁOWY, M. Separation of Selected Bile Acids by TLC. IX. Separation on Silica Gel 60 and on Silica Gel 60F₂₅₄ Aluminum Plates Impregnated with Cu(II), Ni(II), Fe(II), and Mn(II) Cations. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, n. 3, p. 405-418, 2007.

DUCKWORTH, A. Farming Sponges to Supply Bioactive Metabolites and Bath Sponges: A Review. **Marine Biotechnology**, v. 11, n. 6, p. 669-679, 2009.

DUCKWORTH, A. R.; BATTERSHILL, C. N.; BERGQUIST, P. R. Influence of explant procedures and environmental factors on culture success of three sponges. **Aquaculture**, v. 156, n. 3–4, p. 251-267, 1997.

DUQUE, C. et al. Exudation of low molecular weight compounds (thiobismethane, methyl isocyanide, and methyl isothiocyanate) as a possible chemical defense mechanism in the marine sponge *Ircinia felix*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 5, p. 459-467, 2001.

EBERZ, W. F. et al. The Hydration of Unsaturated Compounds. IV. The Rate of Hydration of Isobutene in the Presence of Silver Ion. The Nature of the Isobutene—Silver Complex I. **Journal of the American Chemical Society**, v. 59, n. 1, p. 45-49, 1937.

ERPENBECK, D.; SOEST, R. M. Status and Perspective of Sponge Chemosystematics. **Marine Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 2-19, 2007.

EVERSHEDE, R. P. Advances in Silylation. In: BLAU, K. e HALKET, J. M. (Ed.). **Handbook of Derivatives for Chromatography**. 2 ed. Chichester: John Wiley & Sons, 1993. cap. 4, p.51-108.

EYSEN, H.; PARMENTIER, G. Biohydrogenation of sterols and fatty acids by the intestinal microflora. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 27, n. 11, p. 1329-1340, 1974

FAIR, J. D.; KORMOS, C. M. Flash column chromatograms estimated from thin-layer chromatography data. **Journal of Chromatography A**, v. 1211, n. 1–2, p. 49-54, 2008.

FALKNER, K. K. et al. The major and minor element geochemistry of Lake Baikal. **Limnology and Oceanography**, v. 36, n. 3, p. 413-423, 1991.

_____. Minor and trace element chemistry of Lake Baikal, its tributaries, and surrounding hot springs. **Limnology and Oceanography**, v. 42, n. 2, p. 329-345, 1997.

FATOKI, O. et al. Bioaccumulation of metals in black mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in Cape Town Harbour, South Africa. **The Environmentalist**, v. 32, n. 1, p. 48-57, 2012.

FATTORUSSO, E. et al. Calysterol: A C29 cyclopropene-containing marine sterol from the sponge *Calyx nicaensis*. **Tetrahedron**, v. 31, n. 15, p. 1715-1716, 1975.

FERREIRA, A. B. et al. Use of passive biomonitoring to evaluate the environmental impact of emissions from cement industries in Sergipe State, northeast Brazil. **Microchemical Journal**, v. 103, n. 0, p. 15-20, 2012.

FOLETTI, E. L. et al. Applicability of rice husk ash. **Química nova**, v. 28, n. 6, p. 1055-1060, 2005.

FOLMER, F. et al. Marine natural products targeting phospholipases A₂. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, n. 12, p. 1793-1800, 2010.

FOWLIS, I. A. **Gas chromatography: analytical chemistry by open learning**. 2 ed. Baffins Lane, Chichester: John Wiley & Sons, 1994. 278.

FRIEDLAND, S. S. et al. Mass spectra of steroids. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 169-174, 1959.

FROST, T. M.; REISWIG, H. M.; RICCIARDI, A. 4 - Porifera. In: JAMES, H. T. e ALAN, P. C. (Ed.). **Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 2001. p.97-133.

FUSARI, L. M.; ROQUE, F. O.; HAMADA, N. *Oukuriella pesae*, new species of sponge-dwelling chironomid (Insecta: Diptera) from Amazonia, Brazil. **Zootaxa**, n. 2146, p. 61-68, 2009.

FUSETANI, N.; MATSUNAGA, S.; KONOSU, S. Bioactive marine metabolites II. Halistanol sulfate, an antimicrobial novel steroid sulfate from the marine sponge *Halichondria cf. moorei* Bergquist. **Tetrahedron Letters**, v. 22, n. 21, p. 1985-1988, 1981.

GAILLARDET, J. et al. Chemical and physical denudation in the Amazon River Basin. **Chemical Geology**, v. 142, n. 3–4, p. 141-173, 1997.

GAO, G.-M. et al. Preparation of silica aerogel from oil shale ash by fluidized bed drying. **Powder Technology**, v. 197, n. 3, p. 283-287, 2010.

GARSON, M. et al. The distribution of brominated long-chain fatty acids in sponge and symbiont cell types from the tropical marine sponge *Amphimedon terpenensis*. **Lipids**, v. 29, n. 7, p. 509-516, 1994.

GAUVIN, A. et al. Sterol composition and chemotaxonomic considerations in relation to sponges of the genus *Xestospongia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 5, p. 469-476, 2004.

GAZAVE, E. et al. No longer Demospongiae: Homoscleromorpha formal nomination as a fourth class of Porifera. **Hydrobiologia**, v. 687, n. 1, p. 3-10, 2012.

GIBBS, R. J. Water chemistry of the Amazon River. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 36, n. 9, p. 1061-1066, 1972.

GILLAN, F. et al. Fatty acids as biological markers for bacterial symbionts in sponges. **Lipids**, v. 23, n. 12, p. 1139-1145, 1988.

GINZBURG, B. et al. Identification of oligosulfide odorous compounds and their source in the Lake of Galilee. **Water Research**, v. 32, n. 6, p. 1789-1800, 1998.

GLASER, K. B. et al. Manoalide: structure-activity studies and definition of the pharmacophore for phospholipase A₂ inactivation. **Molecular Pharmacology**, v. 36, n. 5, p. 782-788, 1989.

GOAD, L. J. Steroid biochemistry of marine invertebrates. **Marine Chemistry**, v. 12, n. 2-3, p. 225, 1983.

GREY, J. E. On the chemical composition of sponges. In: PHILIPS, R. e BRAYLEY, E. W. (Ed.). **The Annals of Phylosophy**. Londres: Baldwin, Cradock, and Joy,, v.9, 1825. p.431-432.

GROSS, H.; KÖNIG, G. Terpenoids from Marine Organisms: Unique Structures and their Pharmacological Potential. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, n. 1, p. 115-141, 2006.

HAEFNER, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 12, p. 536-544, 2003.

HAHN, S. et al. Biosynthetic studies of marine lipids. 17. The course of chain elongation and desaturation in long-chain fatty acids of marine sponges. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 24, p. 8117-8124, 1988.

_____. Unusual pattern of fatty acid biosynthesis. Evidence for C-19 desaturase activity in freshwater sponges. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 35, p. 21043-21046, 1989.

HAMDAN, H. et al. ^{29}Si MAS NMR, XRD and FESEM studies of rice husk silica for the synthesis of zeolites. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 211, n. 1-2, p. 126-131, 1997.

HANSEN, I. V.; WEEKS, J. M.; DEPLEDGE, M. H. Accumulation of copper, zinc, cadmium and chromium by the marine sponge *Halichondria panicea* Pallas and the implications for biomonitoring. **Marine Pollution Bulletin**, v. 31, n. 1-3, p. 133-138, 1995.

HARE, L. Aquatic insects and trace metals: bioavailability, bioaccumulation and toxicity. . **Critical Reviews in Toxicology**, v. 22, n. 5-6, p. 327-369, 1992.

HEARING JR, V. J. Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): Purification, properties, and reactions catalyzed. In: SEYMOUR, K. (Ed.). **Methods in Enzymology**: Academic Press, v. Volume 142, 1987. p.154-165.

HENTSCHEL, U. et al. Genomic insights into the marine sponge microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 641-654, 2012.

HERMAWAN, I.; DE VOOGD, N. J.; TANAKA, J. An Acetylenic Alkaloid from the Calcareous Sponge *Leucetta* sp. **Marine Drugs**, v. 9, n. 3, p. 382-386, 2011.

HERNÁNDEZ-BALLESTEROS, L. M. et al. Sponge bioerosion on reef-building corals: Dependent on the environment or on skeletal density? **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 441, n. 0, p. 23-27, 2013.

HICKMAN JR, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Integrated principles of zoology**. 11 ed. Nova York: McGraw-Hill Science, 2000. 928.

HIRATA, Y. U., D. Halichondrins - antitumor polyether macrolides from a marine sponge. **Pure and Applied Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 701-710, 1986.

HU, J. M. et al. A new spongilipid from the freshwater sponge *Spongilla lacustris*. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 30, n. 5, p. 1170-1172, 2009.

IKAN, R. Thin-layer chromatography of tetracyclic triterpenes on silica impregnated with silver nitrate. **Journal of Chromatography A**, v. 17, p. 591-593, 1965.

IKAN, R.; CUDZINOVSKI, M. Separation of sterols and corresponding stanols on thin layers of silica impregnated with silver nitrate. **Journal of Chromatography A**, v. 18, p. 422-423, 1965.

IKEKAWA, N. Structures, biosynthesis and function of sterols in invertebrates. In: DANIELSSON, H. e SJÖVALL, J. (Ed.). **Sterols and bili acids**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1985. cap. 8, p.199-230.

ILER, R. K. **The chemistry of silica: Solubility, polymerization, colloid and surface properties and biochemistry of silica**. Wiley-Interscince, 1979. 866.

IMBS, A.; VERESHCHAGIN, A. Isolation and characteristic of overlong-chain unsaturated aldehydes from the freshwater sponge *Lubomirskia baicalensis*. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 31, n. 6, p. 588-592, 2005.

IMBS, A. B.; LATYSHEV, N. A. New Δ 5 and Δ 4 unsaturated medium- and long-chain fatty acids in the freshwater sponge *Baicalospongia bacilifera*. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 92, n. 2, p. 117-125, 1998.

IMBS, A. B.; RODKINA, S. A. Trans and positional ethylenic bonds in two dominant isomers of eicosapentaenoic acid from the freshwater sponge *Baicalospongia bacillifera*. **Lipids**, v. 40, n. 9, p. 963-968, 2005.

INBAKANDAN, D.; VENKATESAN, R.; AJMAL KHAN, S. Biosynthesis of gold nanoparticles utilizing marine sponge *Acanthella elongata* (Dendy, 1905). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 81, n. 2, p. 634-639, 2010.

JACKSON, K. L.; HENDERSON, J. A.; PHILLIPS, A. J. The halichondrins and E7389. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 7, p. 3044-3079, 2009.

JACKSON, J. B. C.; BUSS, L. Alleopathy and spatial competition among coral reef invertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 12, p. 5160-5163, 1975.

JADKOWSKI, T. K.; WILTSIE, E. A. BIODETERIORATION OF CONCRETE PILING IN THE ARABIAN GULF. 4th Middle East Oil Show, 1985, Manama, Bahrain. p.89-94.

JAMES, A. T.; MARTIN, A. J. P. Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. **Biochemical Journal**, v. 50, n. 5, p. 679-690, 1952.

JEFFERTS, E.; MORALES, R.; LITCHFIELD, C. Occurrence of cis -5, cis -9-Hexacosadienoic and cis -5, cis -9, cis -19-hexacosatrienoic acids in the marine sponge *Microciona prolifera*. **Lipids**, v. 9, n. 4, p. 244-247, 1974.

JENNINGS, W.; MITTLEFEHLDT, E.; STREMPLE, P. Selected Applications. In: (Ed.). **Analytical Gas Chromatography**. 2 ed. San Diego, CA: Academic Press, 1997. cap. 9, p.284-354.

JENSEN, M. et al. Biologically formed mesoporous amorphous silica. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 7, p. 2717-2721, 2009.

JENSEN, M.; KEDING, R.; YUE, Y. Microscopic features of biologically formed amorphous silica. In: PRAMATAROVA, L. (Ed.). **On Biomimetics**, 2011. cap. 20, p.439-452.

JEWELL, M. E. An ecological study of the freshwater sponge of Northern Wisconsin. **Ecological Monographs**, v. 5, n. 4, p. 461-504, 1935.

JIANG, Y.; RIDSDILL-SMITH, T. J.; GHISALBERTI, E. L. The effect of volatile metabolites of lipid peroxidation on the aggregation of redlegged earth mites *Halotydeus destructor* (Acarina: Penthaleidae) on damaged cotyledons of subterranean clover. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, n. 1, p. 163-174, 1997.

JÜTTNER, F. et al. Odour compounds of the diatom *Cocconeis scutellum*: effects on benthic herbivores living on *Posidonia oceanica*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 400, p. 63-73, 2010.

KAJIWARA, T. et al. Volatile compounds and long-chain aldehydes formation in conchocelis-filaments of a red alga, *Porphyra tenera*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 7, p. 2193-2195, 1990.

_____. Distribution of an enzyme system producing seaweed flavor: conversion of fatty acids to long-chain aldehydes in seaweeds. **Journal of Applied Phycology**, v. 5, n. 2, p. 225-230, 1993.

KALAPATHY, U.; PROCTOR, A.; SHULTZ, J. A simple method for production of pure silica from rice hull ash. **Bioresource Technology**, v. 73, n. 3, p. 257-262, 2000a.

_____. Silica xerogels from rice hull ash: Structure, density and mechanical strength as affected by gelation pH and silica concentration. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 75, n. 6, p. 464-468, 2000b.

_____. An improved method for production of silica from rice hull ash. **Bioresource Technology**, v. 85, n. 3, p. 285-289, 2002.

KALUZHNAIA, O. V. et al. Identification of silicateins in freshwater sponge *Lubomirskia baicalensis*. **Molecular Biology**, v. 41, n. 4, p. 554-561, 2007.

KAMATH, S. R.; PROCTOR, A. Silica gel from rice hull ash: Preparation and characterization. **Cereal Chemistry**, v. 75, n. 4, p. 484-487, 1998.

KANAZAWA, A.; GUARY, J.-C. B.; CECCALDI, H. J. Metabolism of [¹⁴C]β-sitosterol injected at various stages of the molting cycle in prawn *Penaeus japonicus* bate. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 54, n. 2, p. 205-208, 1976.

KAWASAKI, W. et al. Volatiles from *Zostera marina*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 1, p. 27-29, 1998.

KELLY-BORGES, M.; BERGQUIST, P. R.; BERGQUIST, P. L. Phylogenetic relationships within the order Hadromerida (Porifera, Demospongiae, Tetractinomorpha) as indicated by ribosomal RNA sequence comparisons. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 19, n. 2, p. 117-125, 1991.

KERR, R. G. et al. Biosynthetic studies of marine lipids-XXIX. Demonstration of sterol side chain dealkylation using cell-free extracts of marine sponges. **Tetrahedron Letters**, v. 31, n. 38, p. 5425-5428, 1990.

KERR, R. G.; KERR, S. L.; DJERASSI, C. Biosynthetic studies of marine lipids. 26. Elucidation of the biosynthesis of mutasterol, a sponge sterol with a quaternary carbon in its side chain. **Journal of Organic Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 63-66, 1991.

KERR, R. G. et al. Biosynthetic studies of marine lipids. 38. Mechanism and scope of sterol side chain dealkylation in sponges: Evidence for concurrent alkylation and dealkylation. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 1, p. 299-303, 1992.

_____. Biosynthetic studies of marine lipids 16. *De novo* sterol biosynthesis in sponges. Incorporation and transformation of cycloartenol and lanosterol into unconventional sterols of marine and freshwater sponges. **Tetrahedron**, v. 45, n. 7, p. 1893-1904, 1989.

KHALIL, M. W.; IDLER, D. R. Steroid biosynthesis in the whelk, *Buccinum undatum*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 55, n. 2, p. 239-242, 1976.

KHULBE, K. C.; MANN, R. S.; MACPHEE, J. A. Separation of acidic fraction from the Cold Lake bitumen asphaltenes and its relationship to enhanced oil recovery. **Fuel Processing Technology**, v. 46, n. 1, p. 63-69, 1996.

KITSON, F. G.; LARSEN, B. S.; MCEWEN, C. N. The Fundamentals of GC/MS. In: (Ed.). **Gas Chromatography and Mass Spectrometry: a practical guide**. 1 ed. San Diego: Academic Press, 1996. cap. 1, p.3-42.

KNIGHTS, B. A. Identification of plant sterols using combined GLC/mass spectrometry. **Journal of Gas Chromatography**, v. 5, n. 6, p. 273-282, 1967.

KOLESNIKOVA, I. A.; MAKARIEVA, T. N.; STONIK, V. A. Natural products from the Lake Baikal organisms - II. Sterols from the sponge Lubomirskia baicalensis. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 103, n. 2, p. 501-503, 1992.

KRAMAR, U. Advances in energy-dispersive X-ray fluorescence. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 58, n. 1 SPEC. ISS., p. 73-80, 1997.

KÜCHLER, I. L.; MIEKELEY, N.; FORSBERG, B. R. A contribution to the chemical characterization of rivers in the Rio Negro Basin, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 3, p. 286-292, 2000.

KULIKOVA, N. N. et al. Biogeochemistry of encrusting sponges of the family Lubomirskiidae in Southern Lake Baikal. **Geochemistry International**, v. 51, n. 4, p. 326-337, 2013.

LAGADITIS, P. O.; LOUGH, A. J.; MORRIS, R. H. Iron complexes for the catalytic transfer hydrogenation of acetophenone: steric and electronic effects imposed by alkyl substituents at phosphorus. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 21, p. 10057-10066, 2010.

LASETER, J.; POIRRIER, M. Free fatty acids in the protective coats of *Spongilla wagneri* gemmules. **Lipids**, v. 5, n. 8, p. 722-724, 1970.

LAWSON, M.; THOMPSON, J.; DJERASSI, C. Cell membrane localization of long chain C₂₄-C₃₀ fatty acids in two marine demosponges. **Lipids**, v. 23, n. 8, p. 741-749, 1988.

LE PENNEC, G. et al. Cultivation of primmorphs from the marine sponge *Suberites domuncula*: morphogenetic potential of silicon and iron. **Journal of Biotechnology**, v. 100, n. 2, p. 93-108, 2003.

LEENHEER, J. A. Origin and nature of humic substances in the waters of the Amazon River Basin. **Acta Amazônica**, v. 10, n. 3, p. 513-526, 1982.

LEYS, S. P. et al. The Sponge Pump: The Role of Current Induced Flow in the Design of the Sponge Body Plan. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. e27787, 2011.

LI, C.-W.; CHEN, J.-Y.; HUA, T.-E. Precambrian Sponges with Cellular Structures. **Science**, v. 279, n. 5352, p. 879-882, 1998.

LIMA, J. A. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of an acid fraction of the seeds of *Carpotroche brasiliensis* (Raddi) (Flacourtiaceae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1095-1103, 2005.

LIMA, S. R. M. et al. *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of *Copaifera multijuga* Hayne and its fractions. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 9, p. 1048-1053, 2003.

LING, T.; XIANG, A. X.; THEODORAKIS, E. A. Enantioselective Total Synthesis of Avarol and Avarone. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 38, n. 20, p. 3089-3091, 1999.

MACHADO, O. X. D. B. **Zoologia. Espogiários (Porifera)**. Rio de Janeiro - Brasil: Ministério da Agricultura 1947.

MACLEOD, A. J.; CAVE, S. J. Volatile flavour components of eggs. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 26, n. 3, p. 351-360, 1975.

MAFFEI, M. E.; GERTSCH, J.; APPENDINO, G. Plant volatiles: Production, function and pharmacology. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 8, p. 1359-1380, 2011.

MAGALHÃES, A. O. et al. Induction of cell migration and activation in mice by the freshwater sponge *Drulia uruguayensis* Bonetto & Ezcurra de Drago, 1968 (Porifera: Metaniidae). **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, p. 66-73, 2011.

MAKARIEVA, T. N. et al. Natural products from lake Baikal organisms, I. Baikalosterol, a novel steroid with an unusual side chain, and other metabolites from the sponge *Baicalospongia bacilifera*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 4, p. 953-958, 1991.

_____. Unusual marine sterols may protect cellular membranes against action of some marine toxins. In: LE GAL, Y. e HALVORSON, H. O. (Ed.). **New Developments in Marine Biotechnology**. Italy: Plenum Press, 1998. cap. 8, p.37-40.

MALDONADO, M.; URIZ, M. J. Microrefuge exploitation by subtidal encrusting sponges: patterns of settlement and post-settlement survival. **Marine Ecology Progress Series**, v. 174, p. 141-150, 1998.

MALIK, S.; KERR, R. G.; DJERASSI, C. Biosynthesis of marine lipids. 19. Dealkylation of the sterol side chain in sponges. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 20, p. 6895-6897, 1988.

MANCINI, I. et al. Adriadysiolide, the First Monoterpenoid Isolated from a Marine Sponge. **Helvetica Chimica Acta**, v. 70, n. 8, p. 2011-2018, 1987.

MANCONI, R. et al. Steroids in porifera, sterols from freshwater sponges *Ephydatia fluviatilis* (L.) and *Spongilla lacustris* (L.). **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and**, v. 91, n. 2, p. 237-245, 1988.

MANCONI, R.; PRONZATO, R. Global diversity of sponges (Porifera: Spongillina) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, n. 1, p. 27-33, 2008.

MATTA, A. D. Epidermatite erythematosa devida a espongiário de água doce. **Brasil - Médico**, v. 46, p. 435-436, 1932.

MAYER, A. M. S. et al. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. **Trends in pharmacological sciences**, v. 31, n. 6, p. 255-265, 2010.

MAZUR, A. 5,6-Dihydrostigmasterol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 63, n. 9, p. 2442-2444, 1941.

MCCAFFREY, M. A. et al. Paleoenvironmental implications of novel C₃₀ steranes in Precambrian to Cenozoic Age petroleum and bitumen. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 58, n. 1, p. 529-532, 1994.

MCCARTHY, R. D.; DUTHIE, A. H. A rapid quantitative method for the separation of free fatty acids from other lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 3, n. 1, p. 117-119, 1962.

MCNAIR, H. M.; MILLER, J. M. Detectors. In: (Ed.). **Basic Gas Chromatography**. 1 ed. Nova York: John Wiley & Sons, 1997. cap. 7, p.101-125.

MELNIKOV, P. et al. Physicochemical properties and morphology of spongolite from Mato Grosso do Sul (Brazil). **Materials Chemistry and Physics**, v. 78, n. 3, p. 835-839, 2003.

MIGLIUOLO, A.; PICCIALLI, V.; SICA, D. Steroidal ketones from the sponge *Geodia cydonium*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 5, p. 1262-1266, 1990.

MINALE, L.; RICCIO, R.; SODANO, G. Avarol a novel sesquiterpenoid hydroquinone with a rearranged drimane skeleton from the sponge *Disidea avara*. **Tetrahedron Letters**, v. 15, n. 38, p. 3401-3404, 1974.

MIRANDA, R. G. et al. Quality of water resources in the Amazon region- Rio Tapajós: assessing the case for chemical elements and physical-chemical parameters **Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 4, n. 2, p. 75-92 2009.

MISHRA, P. M.; SREE, A. Comparison of the antibacterial activity, volatiles and fatty acid composition of lipids of *Phycopsis* species collected at different locations from the Bay of Bengal (Orissa coast). **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 74, n. 2, p. 133-139, 2009a.

_____. Fatty acid profile, volatiles and antibacterial screening of lipids of the sponge *Siphonodictyon coralliphagum* collected from the Bay of Bengal (Orissa Coast). **Asian Journal of Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 4429-4434, 2009b.

MITSUOKA, K. et al. Gasification of woody biomass char with CO₂: The catalytic effects of K and Ca species on char gasification reactivity. **Fuel Processing Technology**, v. 92, n. 1, p. 26-31, 2011.

MOORE, M. Crystalline silica: Occurrence and use. **Indoor and Built Environment**, v. 8, n. 2, p. 82-88, 1999.

MOORE, P. G.; RAINBOW, P. S. Copper and zinc in an ecological series of talitroidean Amphipoda (Crustacea). **Oecologia**, v. 73, n. 1, p. 120-126, 1987.

MORALES, R. W.; LITCHFIELD, C. Unusual C₂₄, C₂₅, C₂₆ and C₂₇ polyunsaturated fatty acids of the marine sponge *Microciona prolifera*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 431, n. 2, p. 206-216, 1976.

MOTHES DE MORAES, B. Revisão do gênero *Drulia* GRAY, 1867 (Porifera, Spongillidae). **Iheringia. Série Zoologia**, v. 62, p. 13-36, 1983.

MÜLLER, W. E. Molecular phylogeny of Eumetazoa: genes in sponges (Porifera) give evidence for monophyly of animals. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**, v. 19, p. 89-132, 1998.

MÜLLER, W. et al. Formation of giant spicules in the deep-sea hexactinellid *Monorhaphis chuni* (Schulze 1904): electron-microscopic and biochemical studies. **Cell and Tissue Research**, v. 329, n. 2, p. 363-378, 2007.

MÜLLER, W. E. G. et al. Silicateins, the major biosilica forming enzymes present in demosponges: Protein analysis and phylogenetic relationship. **Gene**, v. 395, n. 1-2, p. 62-71, 2007.

_____. Biochemistry and cell biology of silica formation in sponges. **Microscopy Research and Technique**, v. 62, n. 4, p. 368-377, 2003.

_____. Establishment of a primary cell culture from a sponge: primmorphs from *Suberites domuncula*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 178, p. 205-219, 1999.

NAGLE, D. G.; PAUL, V. J.; ANN ROBERTS, M. Ypaoamide, a new broadly acting feeding deterrent from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 35, p. 6263-6266, 1996.

NANO, G. M.; MARTELLI, A. The separation of some pairs of allylic-propenylic isomers by TLC on silica impregnated with silver nitrate. **Journal of Chromatography A**, v. 21, n. 0, p. 349, 1966.

NAVA, H.; CARBALLO, J. L. Chemical and mechanical bioerosion of boring sponges from Mexican Pacific coral reefs. **Journal of Experimental Biology**, v. 211, n. 17, p. 2827-2831, 2008.

NECHEV, J. et al. Chemical composition of the sponge *Chondrosia reniformis* from the Canary Islands. **Hydrobiologia**, v. 489, n. 1-3, p. 91-98, 2002a.

_____. Lipid composition of the sponge *Verongia aerophoba* from the Canary Islands. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 104, n. 12, p. 800-807, 2002b.

_____. Chemical composition of the sponge *Hymeniacidon sanguinea* from the Canary Islands. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 137, n. 2, p. 365-374, 2004.

NICHOLS, S.; WÖRHEIDE, G. Sponges: New views of old animals. **Integrative and Comparative Biology**, v. 45, n. 2, p. 333-334, 2005.

NICOL, W.; REISMAN, H. Ecology of the boring sponge (*Cliona celata*) at Gardiner's Island, New York. **Chesapeake Science**, v. 17, n. 1, p. 1-7, 1976.

NIELSEN, C. Six major steps in animal evolution: are we derived sponge larvae? **Evolution & Development**, v. 10, n. 2, p. 241-257, 2008.

NIKOLOVA-DAMYANOVA, B.; CHRISTIE, W. W.; HERSLÖF, B. Mechanistic aspects of fatty acid retention in silver ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 749, n. 1-2, p. 47-54, 1996.

ORJALA, J. et al. Antillatoxin: an exceptionally ichthyotoxic cyclic lipopeptide from the tropical cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 31, p. 8281-8282, 1995.

PAGE, M. J. et al. Aquaculture trials for the production of biologically active metabolites in the New Zealand sponge *Mycale hentscheli* (Demospongidae: Poecilosclerida). **Aquaculture**, v. 250, n. 1-2, p. 256-269, 2005

PARADINA, L. P. et al. The Distribution of Chemical Elements in Sponges of the Family Lubomirskiidae in Lake Baikal. **Berliner Paläobiologische Abhandlungen**, v. 4, p. 151-156, 2003.

_____. Sampling, Sample Preparation and ICP-MS Chemical Analysis of Lake Baikal Sponges. **Geostandards and Geoanalytical Research**, v. 28, n. 2, p. 225-232, 2004.

PARFENOVA, V. V. et al. Microbial community of freshwater sponges in Lake Baikal. **Biology Bulletin**, v. 35, n. 4, p. 374-379, 2008. PARMENTIER, G.; EYSSEN, H. Mechanism

of biohydrogenation of cholesterol to coprostanol by *Eubacterium* ATCC 21408. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 348, n. 2, p. 279-284, 1974.

PARTRIDGE, L. G.; DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. 250. Characteristic fragmentations of cholesterol acetate. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 42, n. 17, p. 2799-2805, 1977.

PATEL, B.; BALANI, M. C.; PATEL, S. Sponge 'sentinel' of heavy metals. **The Science of the Total Environment**, v. 41, n. 2, p. 143-152, 1985.

PATNAIK, P. X-Ray Methods. In: (Ed.). **Dean's Analytical Chemistry Handbook**. 2 ed: McGraw-Hill Professional, 2004. cap. 9, p.9.1-9.25.

PAWLIK, J.; MCFALL, G.; ZEA, S. Does the odor from sponges of the genus *Ircinia* protect them from fish predators? **Journal of Chemical Ecology**, v. 28, n. 6, p. 1103-1115, 2002.

PEREZ, T. et al. Effects of 12 years' operation of a sewage treatment plant on trace metal occurrence within a Mediterranean commercial sponge (*Spongia officinalis*, Demospongiae). **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, n. 3, p. 301-309, 2005.

_____. Marine Sponges as Biomonitor of Polychlorobiphenyl Contamination: Concentration and Fate of 24 Congeners. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 10, p. 2152-2158, 2003.

PETTIT, G. R. et al. Isolation and structure of spongilipid from the Republic of Singapore marine porifera *Spongia* cf. *hispida*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 75, n. 6, p. 920-925, 1997.

PHILP, R. B. Cadmium content of the marine sponge *Microciona prolifera*, other sponges, water and sediment from the eastern Florida panhandle: possible effects on *Microciona* cell aggregation and potential roles of low pH and low salinity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 124, n. 1, p. 41-49, 1999.

PIEL, J. Metabolites from symbiotic bacteria. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 3, p. 338-362, 2009.

PIERI, F. A. et al. Antimicrobial activity of autoclaved and non autoclaved copaiba oil on *Listeria monocytogenes*. **Ciência Rural**, v. 40, p. 1797-1801, 2010.

PINTO, A. C. et al. Separation of acidic components of *Vellozia flavicans* by silica gel/potassium hydroxide chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 8, n. 1, p. 14-17, 1997.

_____. Separation of acid diterpenes of *Copaifera cearensis* Huber ex Ducke by flash chromatography using potassium hydroxide impregnated silica gel. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, p. 355-360, 2000.

PITARCH, A.; QUERALT, I. Energy dispersive X-ray fluorescence analysis of ancient coins: The case of Greek silver *drachmae* from the Emporion site in Spain. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 268, n. 10, p. 1682-1685, 2010.

POOLE, C. F.; COOKE, M.; WILSON, I. D. **Encyclopedia of Separation Science**. 1 ed. Edinburgo: Academic Press, 2000. 4502.

POZZOLINI, M. et al. Influence of rocky substrata on three-dimensional sponge cells model development. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 46, n. 2, p. 140-147, 2010.

PYKA, A.; KLIMCZOK, W. Influence of impregnation of a mixture of silica gel and kieselguhr with copper (II) sulphate (VI) on profile change of the spectrodensitograms and the rf values of nicotinic acid and its derivatives. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 31, n. 4, p. 526-542, 2008.

RADTKE, M.; VINCZE, L.; GORNER, W. Quantification of energy dispersive SRXRF for the certification of reference materials at BAMline. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, n. 5, p. 631-634, 2010.

RAINBOW, P. S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? **Environmental Pollution**, v. 120, n. 3, p. 497-507, 2002.

RAMESH, K. et al. Synthesis, characterization, and catalytic activity of phosphorus modified H-ZSM-5 catalysts in selective ethanol dehydration. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 9, p. 4080-4090, 2010.

RAMLJAK, Z. et al. Separation of acids from asphalts. **Analytical Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 1222-1225, 1977.

RAO, J. V. et al. *Petrosia testudinaria* as a biomarker for metal contamination at Gulf of Mannar, southeast coast of India. **Chemosphere**, v. 65, n. 4, p. 634-638, 2006.

REGALADO, E. L. et al. Polar alkaloids from the Caribbean marine sponge *Niphates digitalis*. **Natural Products Communication**, v. 5, n. 8, p. 1187-1190, 2010.

REN, D. et al. Mechanism of cholesterol reduction to coprostanol by *Eubacterium coprostanoligenes* ATCC 51222. **Steroids**, v. 61, n. 1, p. 33-40, 1996.

ŘEZANKA, T.; DEMBITSKY, V. M. Isoprenoid polyunsaturated fatty acids from freshwater sponges. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 11, p. 1898-1904, 1993.

_____. Multibranched Polyunsaturated and very-long-chain fatty acids of freshwater Israeli sponges. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 5, p. 709-713, 2002.

ŘEZANKA, T.; SIGLER, K. Odd-numbered very-long-chain fatty acids from the microbial, animal and plant kingdoms. **Progress in Lipid Research**, v. 48, n. 3-4, p. 206-238, 2009.

ŘEZANKA, T.; SIGLER, K.; DEMBITSKY, V. M. Syriacin, a novel unusual sulfated ceramide glycoside from the freshwater sponge *Ephydatia syriaca* (Porifera, Demospongiae, Spongillidae). **Tetrahedron**, v. 62, n. 25, p. 5937-5943, 2006.

REZENDE FILHO, A. T. et al. Hydrochemical variability at the upper Paraguay Basin and Pantanal wetland **Hydrology and Earth System Sciences** v. 16, n. 8, p. 2723-2737, 2012.

RHO, M.-C. et al. A Novel Monogalactosylacylglycerol with Inhibitory Effect on Platelet Aggregation from the Cyanophyceae *Oscillatoria rosea*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 3, p. 308-309, 1996.

ROBBINS, W. E. et al. Steroid Metabolism in insects. **Annual Review of Entomology**, v. 16, n. 1, p. 53-72, 1971.

ROCHA-LIMA, C. M. et al. A phase 1 trial of E7974 administered on day 1 of a 21-day cycle in patients with advanced solid tumors. **Cancer**, v. 118, n. 17, p. 4262-4270, 2012.

ROUSSIS, V. et al. Comparative study on the volatile metabolites of two marine sponge species of the genus *Plakortis*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, n. 4, p. 393-397, 1995.

RUDI, A.; BENAYAHU, Y.; KASHMAN, Y. Negombins A-I, new chlorinated polyfunctional diterpenoids from the marine sponge *Negombata* species. **Organic Letters**, v. 9, n. 12, p. 2337-2340, 2007.

RÜDIGER, A. L.; SILVA, C. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. EDXRF analysis of Amazonian Burseraceae oleoresins. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1077-1081, 2009.

RUIZ, C. et al. Mariculture and natural production of the antitumoural (+)-discodermolide by the caribbean marine sponge *Discodermia dissoluta*. **Marine Biotechnology**, p. 1-13, 2013.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6 ed. São Paulo-SP: Roca, 1996. 1088.

RÜTZLER, K. The role of burrowing sponges in bioerosion. **Oecologia**, v. 19, n. 3, p. 203-216, 1975.

SALIOT, A.; BARBIER, M. Stérols en solution dans l'eau de mer: Leur utilisation par les invertébrés marins. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 13, n. 3, p. 207-214, 1973.

SANDFORD, F. Physical and chemical analysis of the siliceous skeletons in six sponges of two groups (demospongiae and hexactinellida). **Microscopy Research and Technique**, v. 62, n. 4, p. 336-355, 2003.

SANTALOVA, E. A. et al. Sterols from six marine sponges. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 2, p. 153-167, 2004.

_____. Sterols and related metabolites from five species of sponges. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 7, p. 439-446, 2007.

SARIN, P. S. et al. Inhibition of replication of the etiologic agent of acquired immune deficiency syndrome (human T-lymphotropic retrovirus/lymphadenopathy-associated virus) by avarol and avarone. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 78, n. 4, p. 663-666, 1987.

SCHRÖDER, H. C. et al. Biofabrication of biosilica-glass by living organisms. **Natural Product Reports**, v. 25, n. 3, p. 455-474, 2008.

SCHULZE, F. E. The Hexactinellida. In: TIZARD, T. H.; MOSELEY, H. N., et al (Ed.). **Report on the Scientific Results of the Voyage of H.M.S. Challenger During the Years 1873-1876, under the Command of Captain George S. Nares, R.N., F.R.S. and the late Captain Frank Tourle Thomson, R.N. Narrative**. Londres: Longmans & Co, v. Narrative - Vol 1, 1885. p.437-451.

SCHULZE, P. Zum morphologischen feinbau der kieselschwammnadeln. **Zoomorphology**, v. 4, n. 4, p. 615-625, 1925.

SEGGIANI, M.; VITOLO, S. Recovery of silica gel from blast furnace slag. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 40, n. 1, p. 71-80, 2003.

SEGURA, J.; VENTURA, R.; JURADO, C. Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 713, n. 1, p. 61-90, 1998.

SEYLER, P. T.; BOAVENTURA, G. R. Distribution and partition of trace metals in the Amazon basin. **Hydrological Processes**, v. 17, n. 7, p. 1345-1361, 2003.

SHEIKH, Y. M.; DJERASSI, C. Steroids from sponges. **Tetrahedron**, v. 30, n. 23-24, p. 4095-4103, 1974.

SHIMIZU, K. et al. Silicatein α : Cathepsin L-like protein in sponge biosilica. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 11, p. 6234-6238, 1998.

SHOSTENKOT, Y.; GEORGIEVSKII, V.; LEVIN, M. History of the discovery of thinlayer chromatography. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 55, n. 9, p. 904-905, 2000.

SICA, D.; ZOLLO, F. Petrosterol, the major sterol with a cyclopropane side chain in the sponge *Petrosia ficiformis*. **Tetrahedron Letters**, v. 19, n. 9, p. 837-838, 1978.

SILVA, C. J.; DJERASSI, C. Biosynthetic studies of marine lipids 36. The origin of common sterol side chains in eleven sponges using [3- 3 H]-squalene. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 101, n. 1-2, p. 255-268, 1992.

SILVA, C. J.; WUNSCHE, L.; DJERASSI, C. Biosynthetic studies of marine lipids 35. The demonstration of *de novo* sterol biosynthesis in sponges using radiolabeled isoprenoid precursors. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 99, n. 4, p. 763-773, 1991.

SILVA, M. et al. Trace elements as tumor biomarkers and prognostic factors in breast cancer: a study through energy dispersive x-ray fluorescence. **BMC Research Notes**, v. 5, n. 1, p. 194, 2012.

SIOLI, H. Das Wasser im Amazonasgebiet. **Forschungen und Fortschritte**, v. 26, p. 274-280, 1950.

_____. As águas do alto rio Negro. **Boletim Técnico do Instituto Agronômico do Norte**, v. 32, p. 117-155, 1960.

_____. Hydrochemistry and Geology in the Brasilian Amazon Region. **Amazoniana**, v. 3, p. 267-277, 1968.

_____. **Amazônia: Fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais**. 2 ed. Petrópolis, RJ: Editora Vozes Ltda., 1991. 77p.

SIPKEMA, D. et al. Large-scale production of pharmaceuticals by marine sponges: Sea, cell, or synthesis? **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, n. 2, p. 201-222, 2005.

SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SLATE, D. L. et al. The marine natural product, halistanol trisulfate, inhibits pp60^{v-src} protein tyrosine kinase activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 203, n. 1, p. 260-264, 1994.

SMITH, E. F.; CRAIG, M. E.; WALTERS, C. C. Petroleum and Petrochemical Analysis by Gas Chromatography. In: GROB, R. L. e BARRY, E. F. (Ed.). **Modern practice of gas chromatography**. 4 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. cap. 13, p.643-738.

SNYDER, J. L. Environmental Applications of Gas Chromatography. In: GROB, R. L. e BARRY, E. F. (Ed.). **Modern practice of gas chromatography**. 4 ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. cap. 15, p.769-882.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. **Introduction to modern liquid chromatography**. 2 ed. USA: John Wiley & Sons. Inc., 1979. 863.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development.** 2 ed. USA: John & Wiley & Sons, 1997. 765.

SONG, S. et al. Impacts of morphology and crystallite phases of titanium oxide on the catalytic ozonation of phenol. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 10, p. 3913-3918, 2010.

SPELING, E. A. et al. Where's the glass? Biomarkers, molecular clocks, and microRNAs suggest a 200-Myr missing Precambrian fossil record of siliceous sponge spicules. **Geobiology**, v. 8, n. 1, p. 24-36, 2010.

STALLARD, R. F.; EDMOND, J. M. Geochemistry of the Amazon: 2. The influence of geology and weathering environment on the dissolved load. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, v. 88, n. C14, p. 9671-9688, 1983.

STEVENS, P. J. Thin layer chromatography of synthetic steroids on silica gel impregnated with silver nitrate. **Journal of Chromatography A**, v. 36, p. 253-258, 1968.

STILL, W. C.; KAHN, M.; MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 43, n. 14, p. 2923-2925, 1978.

SULLIVAN, B.; FAULKNER, D. J.; WEBB, L. Siphonodictidine, a metabolite of the burrowing sponge *Siphonodictyon* sp. that inhibits coral growth. **Science**, v. 221, n. 4616, p. 1175-1176, 1983.

TALPIR, R. et al. Hemiamsterlin and geodiamolide TA; Two new cytotoxic peptides from the marine sponge *Hemiamsterella minor* (Kirkpatrick). **Tetrahedron Letters**, v. 35, n. 25, p. 4453-4456, 1994.

TAYLOR, M. W. et al. Soaking it up: the complex lives of marine sponges and their microbial associates. **The ISME Journal**, v. 1, n. 3, p. 187-190, 2007.

TESHIMA, S.-I.; KANAZAWA, A. Bioconversion of the dietary ergosterol to cholesterol in *Artemia salina*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 603-607, 1971.

TESHIMA, S.-I.; KANAZAWA, A.; MIYAWAKI, H. Metabolism of β -sitosterol in the mussel and the snail. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 63, n. 3, p. 323-327, 1979.

THIEL, V. et al. A chemical view of the most ancient metazoa – biomarker chemotaxonomy of hexactinellid sponges. **Naturwissenschaften**, v. 89, n. 2, p. 60-66, 2002.

THOMSON, J. J. **Rays of Positive Electricity and their Application to Chemical Analyses**. 2 ed. Londres: Longmans, Green and CO., 1921. 276p.

TOKES, L.; JONES, G.; DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CLXI. Elucidation of the course of the characteristic ring D fragmentation of steroids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 90, n. 20, p. 5465-5477, 1968.

TOWLE, M. J. et al. *In vitro* and *in vivo* anticancer activities of synthetic macrocyclic ketone analogues of halichondrin B. **Cancer Research**, v. 61, n. 3, p. 1013-1021, 2001.

TSWETT, M. Adsorption analysis and chromatographic method. Application on the chemistry of the chlorophylls. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v. 24, p. 384-393, 1906a.

_____. Physicochemical studies over the chlorophyll. The adsorptions. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v. 24, p. 316-323, 1906b.

URIZ, M.-J. Mineral skeletogenesis in sponges. **Canadian Journal of Zoology**, v. 84, n. 2, p. 322-356, 2006.

URIZ, M. J. et al. Siliceous spicules and skeleton frameworks in sponges: Origin, diversity, ultrastructural patterns, and biological functions. **Microscopy Research and Technique**, v. 62, n. 4, p. 279-299, 2003.

VAN FRIEKEN, R. Introduction. In: TSUJI, K.;INJUK, J., *et al* (Ed.). **X-Ray Spectrometry: Recent Technological Advances**. 1 ed. Chichester, Inglaterra: John Wiley & Sons, Ltd, 2004. cap. 1, p.1-12.

VAN SOEST, R. W. M. et al. Global diversity of sponges (Porifera). **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35105, 2012.

VEREMEICHIK, G. et al. Occurrence of a silicatein gene in glass sponges (Hexactinellida: Porifera). **Marine Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 810-819, 2011.

VICHENEWSKI, W. Cromatografia por Adsorção. In: COLLINS, C. H.;BRAGA, G. L., *et al* (Ed.). **Fundamentos de Cromatografia**. 1 ed. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006. cap. 4, p.87-102.

VOLKMER RIBEIRO, C. Porifera. In: HURLBERT, S. H.;RODRIGUES, G., *et al* (Ed.). **Aquatic Biota of Tropical South America, Part 2: Anarthropoda**. San Diego, California: San diego State University, 1981. p.86 - 94.

VOLKMER RIBEIRO, C.; BECKER MACIEL, S. New freshwater sponges from Amazonian waters. **Amazoniana**, v. 8, n. 2, p. 255-264, 1983.

VOLKMER RIBEIRO, C.; ROSA BARBOSA, R. D. On *Acalle recurvata* (Bowerbank, 1863) and an associated fauna of other freshwater sponges. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 22, p. 15, 1972.

VOLKMER-RIBEIRO, C. A new monotypic genus of neotropical freshwater sponges (Porifera-Spongillidae) and evidence of a speciation via hybridism. **Hydrobiologia**, v. 50, n. 3, p. 271-283, 1976.

_____. Evolutionary study of genus *Metania* GRAY, 1867 (Porifera-Spongillidae): I. The new species. **Amazoniana**, v. 6, n. 4, p. 639-649, 1979.

_____. Evolutionary study of the genus *Metania* GRAY, 1867 (Porifera: Spongillidae): II. Redescription of two neotropical species. **Amazoniana**, v. 8, n. 4, p. 541-553, 1984.

- _____. **Esponjas de água doce.** São Paulo: Sociedade Brasileira de Zoológia, 1985. 6.
- _____. Evolutionary study of the freshwater sponge genus *Metania* GRAY, 1867: III. Metanidae, new family. **Amazoniana**, v. 9, n. 4, p. 493-509, 1986.
- _____. The freshwater sponges in some peat-bog ponds in Brazil. **Amazoniana**, v. 12, n. 2, p. 317-335, 1992.
- _____. Esponjas. In: ISMAEL, D.; VALENTI, W. C., *et al* (Ed.). **Biodiversidade do Estado de São Paulo - Síntese do conhecimento ao final do século XX.** São Paulo: FAPESP, v.4: Invertebrados de água doce, 1999. cap. 1, p.1-9.
- VOLKMER-RIBEIRO, C.; ALMEIDA, F. B. D. As esponjas do Lago Tupé. In: SANTOS-SILVA, E. N.; APRILE, F. M., *et al* (Ed.). **Biotupé: Meio Físico, Diversidade Biológica e Sociocultural do Baixo Rio Megro, Amazônia Central.** Manaus-AM: Editora INPA, 2005. cap. 8, p.123-134.
- VOLKMER-RIBEIRO, C.; BATISTA, T. C. A. Levantamento de cauxi (Porifera, Demospongiae), provável agente etiológico de doença ocular em humanos, Araguatins, rio Araguaia, Estado do Tocantins, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, p. 133-143, 2007.
- VOLKMER-RIBEIRO, C. et al. Anthropically dislodged assemblages of sponges (Porifera: Demospongiae) in the River Araguaia at Araguatins, Tocantins State, Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensis**, v. 20, n. 2, p. 169-175, 2008.
- VOLKMER-RIBEIRO, C.; COSTA, P. R. C. On *Metania spinata* (CARTER, 1881) and *Metania kiliani* n. sp.: Porifera, Metaniidae VOLKMER-RIBEIRO, 1986. **Amazoniana**, v. 12, n. 1, p. 7-16, 1992.
- VOLKMER-RIBEIRO, C.; DE ROSA-BARBOSA, R. Redescription of the freshwater sponges *Trochospongilla repens* (Hinde, 1888) and *Trochospongilla amazonica* (Weltner,

1895) with an account of the South American species of *Trochospongilla* (Porifera, Spongillidae). **Iheringia. Série Zoologia**, v. 65, p. 77-93, 1985.

VOLKMER-RIBEIRO, C.; MOTHES DE MORAES, B. *Drulia ctenosclera*, a new species of neotropical spongillid (Porifera, Spongillidae). **Iheringia. Série Zoologia**, v. 60, p. 117-121, 1981.

VOLKMER-RIBEIRO, C.; MOTTA, J. F. M. Esponjas formadoras de espongilitos em lagoas no triângulo mineiro e adjacências, com indicação de preservação de habitat. **Biociências**, v. 3, n. 2, p. 25, 1995.

VOLKMER-RIBEIRO, C.; PAULS, S. Freshwater sponges (Porifera, Demospongiae) from Venezuela. **Acta Biologica Venezuelica**, v. 20, p. 1-20, 2000.

VOLKMER-RIBEIRO, C.; TAVARES, M. C. M.; DE OLIVEIRA, K. F. *Acanthotylotra alvarengai* (Porifera, Demospongiae) new genus and species of sponge from Tocantins river, Pará State, Brazil. **Acanthotylotra alvarengai (Porifera, Demospongiae) novo gênero e espécie de esponja do rio tocantins, estado do pará, Brasil**, v. 99, n. 4, p. 345-348, 2009.

VOLKMER-RIBEIRO, C.; TAVARES, M. D. C. M. Redescrição de *Drulia uruguayensis* BONETTO & EZCURRA DE DRAGO, 1968 com redefinição do gênero *Drulia* GRAY, 1867 (Porifera: Metaniidae). **Biociências**, v. 3, n. 1, p. 183-205, 1995.

_____. Redescrição das esponjas de água doce *Oncosclera navicella* (CARTER, 1881) (POTAMOLEPIDAE) e *Spongilla spoliata* VOLKMER-RIBEIRO & MACIEL, 1983 (SPONGILLIDAE). **Biociências**, v. 5, n. 1, p. 97-111, 1997.

VOLKMER-RIBEIRO, C.; TURCQ, B. Analysis of silicious spicules of a freshwater sponge indicate paleoenvironmental changes. **Acta Microscópica**, v. 5, n. B, p. 186-187, 1996.

VOLKMER-RIBEIRO, C. B., TWIGGY CRISTINA ALVES; MELÃO, M. D. G. G.; FONSECA-GESSNER, A. A. Anthropically dislodged assemblages of sponges (Porifera: Demospongiae) in the River Araguaia at Araguatins, Tocantins State, Brazil. **Acta Limnologica Brasiliensis**, v. 20, n. 2, p. 169-175, 2008.

VON DEAK, D. et al. The effect of phosphorus in nitrogen-containing carbon nanostructures on oxygen reduction in PEM fuel cells. **Carbon**, v. 48, n. 12, p. 3637-3639, 2010.

VOULTSIADOU, E. Sponges: An historical survey of their knowledge in Greek antiquity. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 87, n. 6, p. 1757-1763, 2007.

VOULTSIADOU, E.; GKELIS, S. Greek and the phylum Porifera: a living language for living organisms. **Journal of Zoology**, v. 267, n. 2, p. 143-157, 2005.

VROMAN, H. E.; COHEN, C. F. Separation of sterol acetates by column and thin-layer argentation chromatography. **Journal of Lipid Research**, v. 8, n. 2, p. 150-152, 1967.

WALKER, I. Amazonian streams and small rivers. In: TUNDISI, J. G.;BICUDO, C. E. M., *et al* (Ed.). **Limnology in Brazil**. Rio de Janeiro: ABC/SBL, 1995. p.167-193.

WANG, S.; GHISALBERTI, E. L.; RIDSDILL-SMITH, J. Volatiles from Trifolium as feeding deterrents of redlegged earth mites. **Phytochemistry**, v. 52, n. 4, p. 601-605, 1999.
WANG, W.-X.; RAINBOW, P. S. Comparative approaches to understand metal bioaccumulation in aquatic animals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 148, n. 4, p. 315-323, 2008.

WANG, X. et al. Silicateins, silicatein interactors and cellular interplay in sponge skeletogenesis: formation of glass fiber-like spicules. **FEBS Journal**, v. 279, n. 10, p. 1721-1736, 2012.

WANG, Z. et al. Pyrolysis of pine wood in a slowly heating fixed-bed reactor: Potassium carbonate versus calcium hydroxide as a catalyst. **Fuel Processing Technology**, v. 91, n. 8, p. 942-950, 2010.

WEBB, J. L.; SMITH, V. E.; WELLS, H. W. The Use of Sponge Spicules as a Column Support in Gas Chromatography. **Journal of Chromatographic Science**, v. 3, n. 11, p. 384-387, 1965.

WEBSTER, N. S.; TAYLOR, M. W. Marine sponges and their microbial symbionts: love and other relationships. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 2, p. 335-346, 2012.

WHITTAKER, R. H.; FEENY, P. P. Allelochemics: Chemical Interactions between Species **Science**, v. 171, n. 3973, p. 757-770, 1971.

WILKINSON, C. R.; GARRONE, R.; VACELET, J. Marine Sponges Discriminate between Food Bacteria and Bacterial Symbionts: Electron Microscope Radioautography and in situ Evidence. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences**, v. 220, n. 1221, p. 519-528, 1984.

WINKLER, E. M. Important agents of weathering for building and monumental stone. **Engineering Geology**, v. 1, n. 5, p. 381-400, 1966.

WINSTEIN, S.; LUCAS, H. J. The Coördination of Silver Ion with Unsaturated Compounds. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, n. 4, p. 836-847, 1938.

WYLLIE, S. G.; AMOS, B. A.; TÖKÉS, L. Electron impact induced fragmentation of cholesterol and related C-5 unsaturated steroids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 725-732, 1977.

XUE, N. et al. Synergistic effects of tungsten and phosphorus on catalytic cracking of butene to propene over HZSM-5. **Applied Catalysis A: General**, v. 352, n. 1-2, p. 87-94, 2009.
ZHANG, J.-L. et al. Steroids with inhibitory activity against the prostate cancer cells and chemical diversity of marine alga *Tydemania expeditionis*. **Fitoterapia**, v. 83, n. 5, p. 973-978, 2012.

ZHOU, S.-M.; ZHOU, K.; XIAO, D.-J. A series of sterone compounds from the south China sea marine sponge *Clathria fasciculata*. **Natural Product Research and Development**, v. 17, n. 4, p. 428-430, 2005.

ZIMMERMAN, M. P. et al. The distribution of lipids and sterols in cell types from the marine sponge *Pseudaxinyssa* sp. **Lipids**, v. 24, n. 3, p. 210-216, 1989.

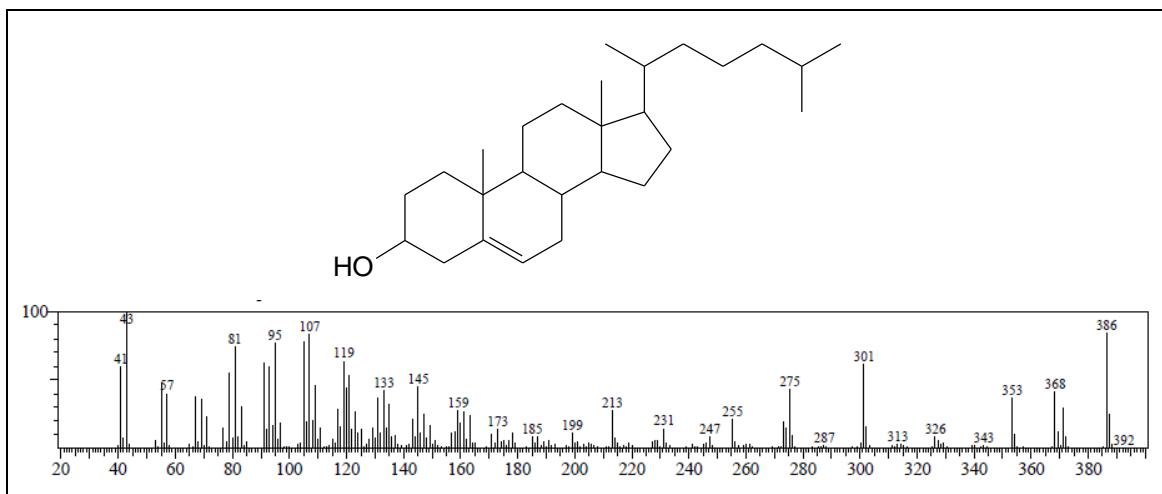
ANEXO I

Figura 88: Estrutura e espectro de massas do colesterol.

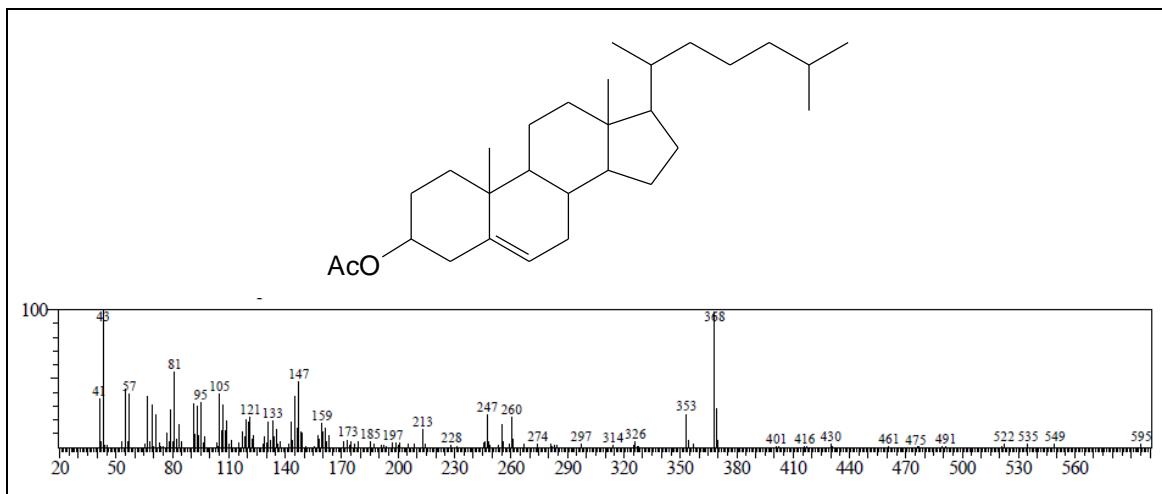


Figura 89: Estrutura e espectro de massas do colesterol acetilado.

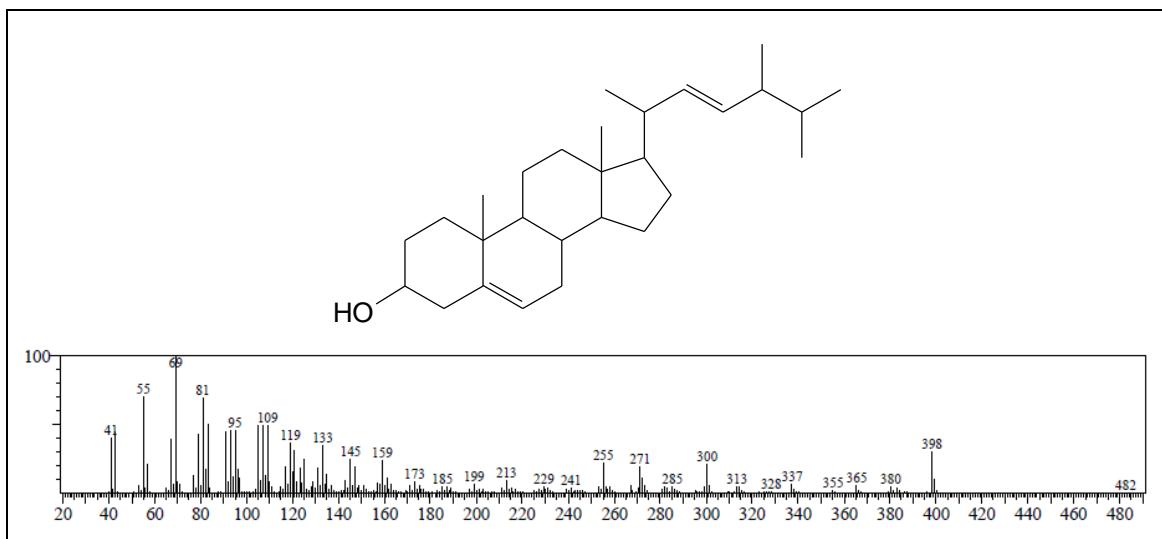


Figura 90: Estrutura e espectro de massas do 24-metil-coesta-5,22-dieno-3 β -ol.

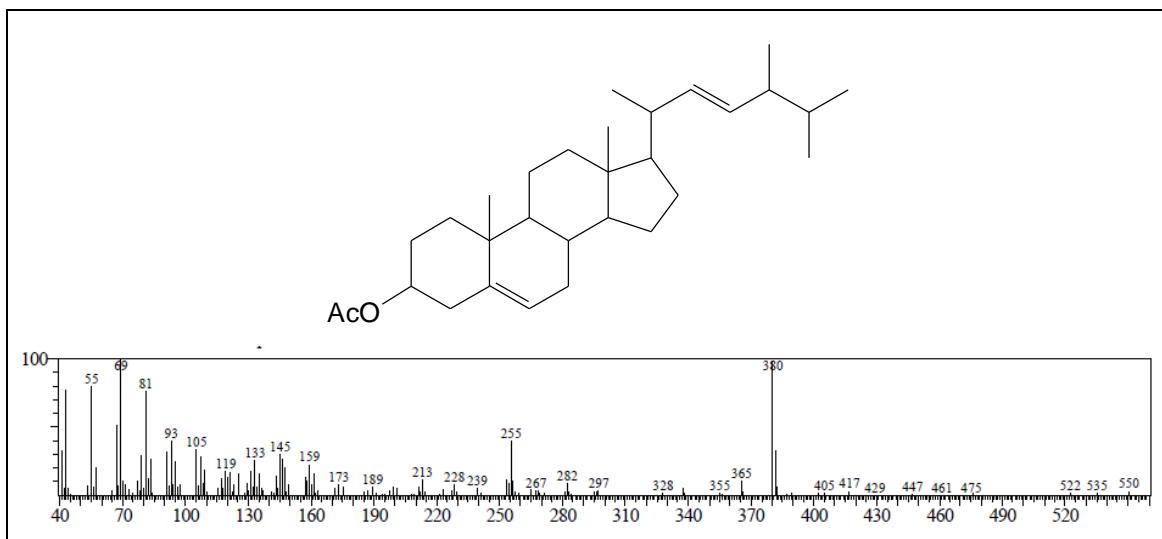


Figura 91: Estrutura e espectro de massas do 24-metil-coesta-5,22-dieno-3 β -ol acetilado.

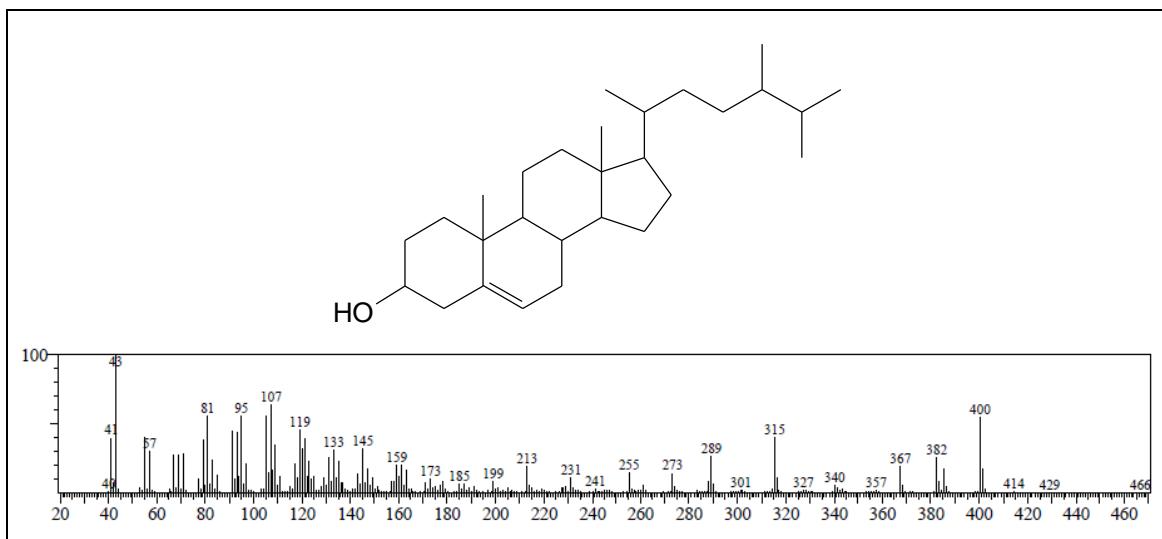


Figura 92: Estrutura e espectro de massas do 24-metil-colesta-5-eno-3 β -ol.

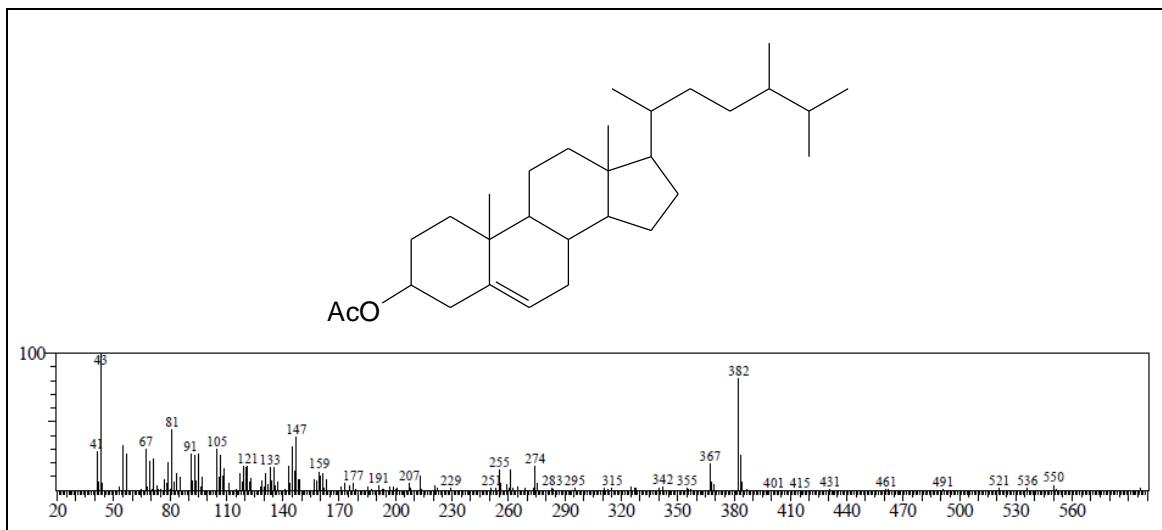


Figura 93: Estrutura e espectro de massas do 24-metil-colesta-5-eno-3 β -ol acetilado.

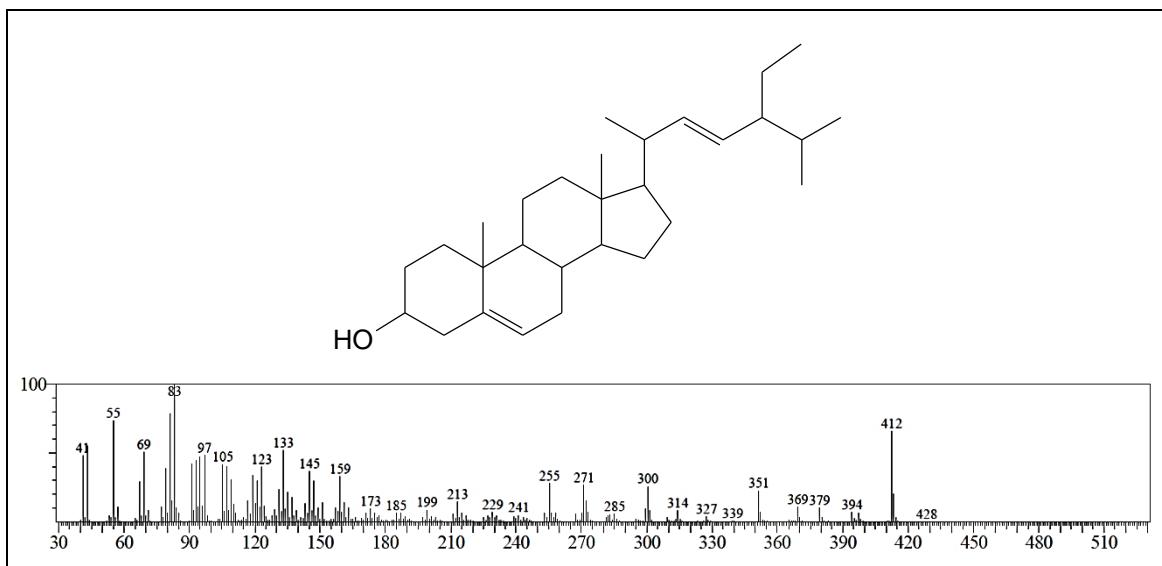


Figura 94: Estrutura e espectro de massas do 24-etil-coesta-5,22-dieno-3 β -ol.

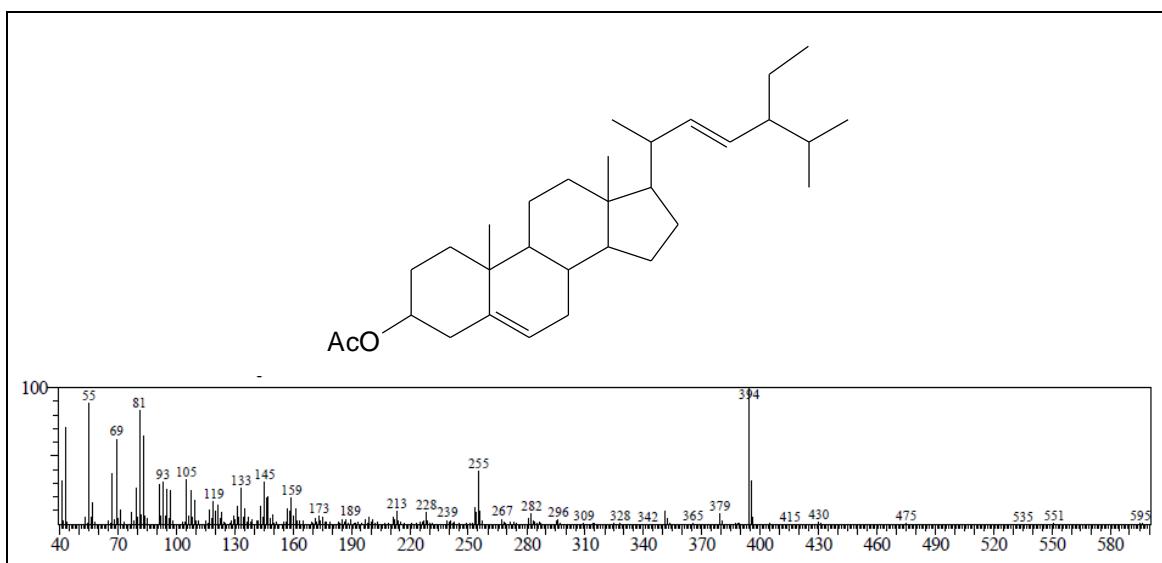


Figura 95: Estrutura e espectro de massas do 24-etil-coesta-5,22-dieno-3 β -ol acetilado

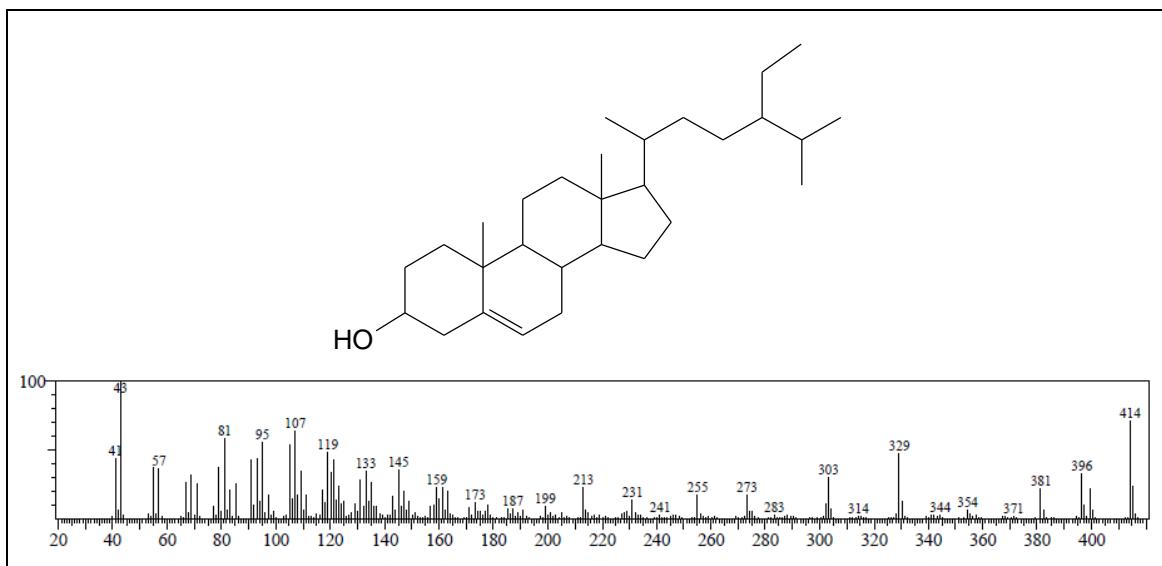


Figura 96: Estrutura e espectro de massas do 24-etyl- colesta-5-eno-3 β -ol

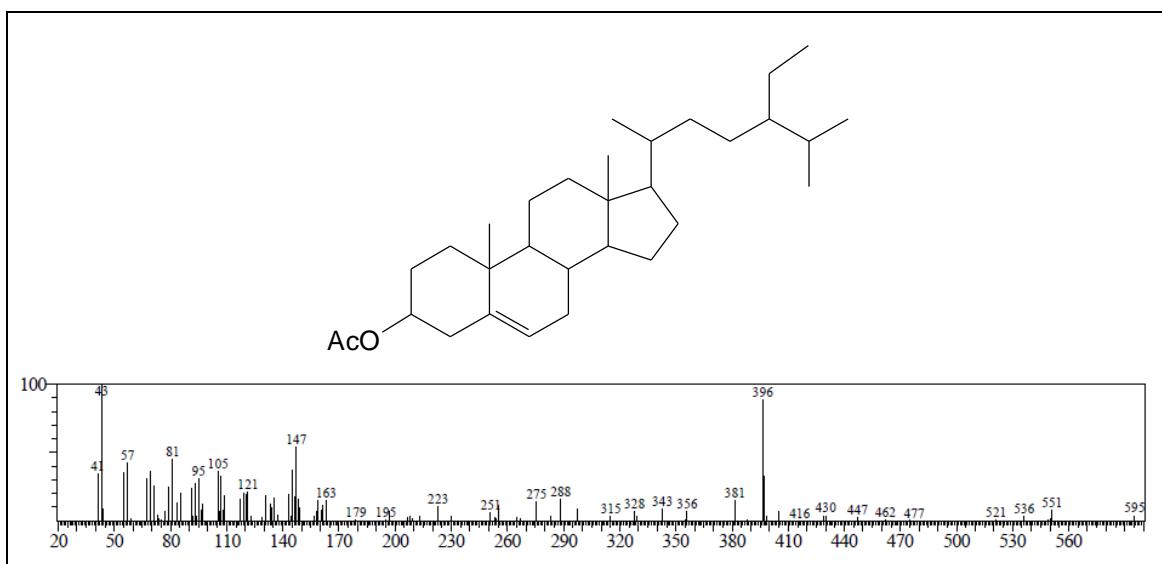


Figura 97: Estrutura e espectro de massas do 24-etyl- colesta-5-eno-3 β -ol acetilado.